

4. Кречетов, А.А. Физико-химические свойства хитин-глюкоановых комплексов из биомассы грибов *Aspergillus niger*: автореф. дис. ...канд. х. наук: 02.00.04 / А.А. Кречетов; Марийский госуд. ун-т. – Йошкар-Ола, 2002. – 17 с.
5. Baldrian, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi // *Enzyme and Microbial technology* – 2003. – Vol. 32. – P. 78–91.
6. Уголь активный осветляющий древесный порошкообразный: ГОСТ 4453-74. – Введ. 01.01.76. – Москва: Издательство стандартов, 1976. – 19 с.

УДК 661.746.56

ОПТИМИЗАЦИЯ КОМПОЗИЦИОННОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ – *ASPERGILLUS NIGER*

Павлова О.В., аспирант, Троцкая Т.П., д-р техн. наук, профессор
РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по продовольствию», г. Минск, Республика Беларусь

*Изучено влияние концентрации компонентов питательной среды на рост культуры продуцента лимонной кислоты – *Aspergillus niger*. Проведен полный многофакторный эксперимент по оптимизации состава питательной среды для получения посевного материала при глубинном культивировании *Aspergillus niger*.*

*The influence of the concentration of the components of the nutrient medium on the growth of the culture producing citric acid - *Aspergillus niger*. A complete multivariate experiment on optimizing the composition of the nutrient medium for seed cultivation in submerged *Aspergillus niger*.*

Ключевые слова: лимонная кислота, продуцент, глубинное культивирование.

Введение

Важнейшие тенденции развития промышленности сегодня – это снижение себестоимости, увеличение ассортимента и повышение качества выпускаемой продукции. В связи с этим возникает необходимость разработки и внедрения способов, направленных на оптимизацию основных технологических стадий и улучшение качества сырья без значительных затрат материальных и топливно-энергетических ресурсов.

Создание биотехнологического производства представляет собой сложную многоступенчатую задачу, предполагающую выполнение нескольких этапов: составление технологической цепочки процесса; определение параметров процесса наработки культуры; режима выделения и концентрирования продукта. Некоторые из этих стадий сами по себе представляют комплекс задач, требующих решения. Так, например, процесс культивирования включает в себя выбор источников питания, подбор количества посевного материала, подбор оптимальных условий роста (значения температуры, pH среды, режим аэрации и т.д.). Конечная стоимость продукта будет складываться из суммы всех затрат на каждую стадию процесса, а также расходов на электроэнергию, пар, воду, воздух для аэрации культуры. Для снижения себестоимости готового продукта решение каждого этапа по планированию производства должно проводиться с учетом экономической целесообразности. Немаловажным аспектом в решении такого рода задач является нахождение оптимальной питательной среды и определение степени влияния ее компонентов на параметры роста микроорганизмов.

Объекты и методы исследований

Изучалась способность производственного штамма *Aspergillus niger* Б-1 – продуцента лимонной кислоты использовать различные по концентрации компоненты питательной среды, приготовленной на основе свекловичной мелассы. Определение особенностей роста продуцента лимонной кислоты проводилось путём глубинного культивирования исследуемого штамма. Для исследования использовали препарат сухих конидий, выпускаемых на ООО «Цитробел» г. Белгород, из которого получали суспензию (30 мг препарата конидий/10 мл стерильной воды).

С целью изучения влияния концентрации компонентов питательной среды на рост культуры продуцента лимонной кислоты проведен полный многофакторный эксперимент по оптимизации состава питательной среды для глубинного культивирования *Aspergillus niger*. Культивирование продуцента осуще-

ствляли в колбах Эрленмейера на качалке (160-200 об/мин) для обеспечения глубинного роста мицелия в объёме питательной среды в течение 2 суток при температуре 30 °С [5]. Суспензию в количестве 1 мл вносили в 100 мл питательной среды 81 варианта, питательные среды готовили в двух повторностях. Исходные концентрации основных питательных компонентов сред и полученные данные приведены в таблице 2.

Посев осуществляли при соблюдении асептических условий (ламинарный шкаф I класса защиты БАВ – «Ламинар-С» 1,5 (110.150)) для предотвращения заражения посторонней микрофлорой.

В ходе работы в питательной среде и в культуральной жидкости проводилось определение активной кислотности и концентрации сухой биомассы в культуральной жидкости – фильтрационным методом, массу сухого мицелия (X) рассчитывали по формуле:

$$X = M_m - M_{\phi}$$

где X – масса сухого мицелия, г; M_{ϕ} – масса пустого фильтра, г; M_m – масса фильтра с высушенным мицелием, г [6].

Результаты и обсуждение

Основной целью работы было изучение влияния концентраций субстратов на рост культуры производственного штамма *Aspergillus niger B-1* и проведение оптимизации состава питательной среды для глубинного культивирования. С этой целью проведен полный многофакторный эксперимент. Факторы варьирования и уровни варьирования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Единицы варьирования и концентрации компонентов среды на нижнем, среднем и верхнем уровнях

| Компонент среды | Фактор | Уровень г/л | | | Единица варьирования (λ) |
|---------------------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| | | Нижний (-) | Средний (0) | Верхний (+) | |
| Меласса свекловичная | X ₁ | 70 | 140 | 210 | 70 |
| NH ₄ NO ₃ | X ₂ | 0 | 2,5 | 5,0 | 2,5 |
| KH ₂ PO ₄ | X ₃ | 0 | 0,16 | 0,32 | 0,16 |
| MgSO ₄ | X ₄ | 0 | 0,25 | 0,50 | 0,25 |
| Вода до 1 л | | | | | |

Согласно матрице полного факторного эксперимента, составленной с помощью программы генерации матриц значений, были приготовлены 81 вариант питательной среды. Результаты опыта оценивались по концентрации сухой биомассы. Исходные концентрации основных компонентов питательных сред и полученные данные приведены в таблице 2. Полученные данные о росте исследуемых грибных культур на полусинтетических питательных средах с различной концентрацией компонентов явились основой разработки состава оптимальной питательной среды для выращивания посевного материала продуцента лимонной кислоты при глубинном культивировании.

Анализируя изменение активной кислотности в процессе культивирования можно сделать вывод, что подобранный состав питательных сред обеспечивает активное развитие данной культуры производственного штамма. При культивировании на средах № 5, 9 при высоком выходе биомассы наблюдается значительное изменение активной кислотности, т.е. среда в большей мере обеспечивает кислотообразующую активность исследуемой культуры. Следует также отметить, что при достижении значения pH в исходной питательной среде до 6,7±0,05 единиц для данного производственного штамма снижение показателя активной кислотности значительно уменьшается, что свидетельствует о торможении биосинтетической способности культуры, которое может быть вызвано как недостатком нутриентов в среде, так и ингибированием развития продуктами метаболизма.

Таблица 2 – Исходные концентрации основных компонентов питательных сред и полученные данные

| Вариант среды | pH исх. | pH кон. | Меласса свекловичная, г/л | NH ₄ NO ₃ , г/л | KH ₂ PO ₄ , г/л | MgSO ₄ , г/л | Сухая биомасса, г/л |
|---------------|---------|---------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| 1 | 6,2 | 3,1 | 70 | 0 | 0 | 0 | 4,4±0,01 |
| 2 | 6,2 | 3,1 | 70 | 0 | 0 | 0,25 | 4,3±0,18 |
| 3 | 6,2 | 3,0 | 70 | 0 | 0 | 0,50 | 4,0±0,01 |
| 4 | 6,2 | 3,1 | 70 | 0 | 0,16 | 0 | 8,2±0,03 |
| 5 | 6,2 | 3,0 | 70 | 0 | 0,16 | 0,25 | 10,1±0,33 |
| 6 | 6,2 | 3,1 | 70 | 0 | 0,16 | 0,50 | 8,0±0,13 |

Продолжение таблицы 2

| Вариант среды | pH исх. | pH кон. | Меласса свекловичная, г/л | NH ₄ NO ₃ , г/л | KH ₂ PO ₄ , г/л | MgSO ₄ , г/л | Сухая биомасса, г/л |
|---------------|---------|---------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| 7 | 6,2 | 3,1 | 70 | 0 | 0,32 | 0 | 8,9±0,10 |
| 8 | 6,2 | 3,1 | 70 | 2,5 | 0,32 | 0,25 | 8,9±0,18 |
| 9 | 6,2 | 3,0 | 70 | 2,5 | 0,32 | 0,50 | 10,1±0,21 |
| 10 | 6,2 | 3,3 | 70 | 2,5 | 0 | 0 | 4,8±0,03 |
| 11 | 6,2 | 3,5 | 70 | 2,5 | 0 | 0,25 | 4,2±0,01 |
| 12 | 6,2 | 3,8 | 70 | 2,5 | 0 | 0,50 | 2,7±0,07 |
| 13 | 6,2 | 3,6 | 70 | 2,5 | 0,16 | 0 | 6,6±0,02 |
| 14 | 6,2 | 3,8 | 70 | 2,5 | 0,16 | 0,25 | 5,7±0,13 |
| 15 | 6,2 | 3,5 | 70 | 2,5 | 0,16 | 0,50 | 4,4±0,01 |
| 16 | 6,2 | 3,7 | 70 | 2,5 | 0,32 | 0 | 5,9±0,13 |
| 17 | 6,2 | 3,7 | 70 | 2,5 | 0,32 | 0,25 | 10,2±0,03 |
| 18 | 6,2 | 3,8 | 70 | 2,5 | 0,32 | 0,50 | 5,2±0,14 |
| 19 | 6,2 | 3,8 | 70 | 5,0 | 0 | 0 | 3,1±0,03 |
| 20 | 6,2 | 3,8 | 70 | 5,0 | 0 | 0,25 | 3,1±0,03 |
| 21 | 6,2 | 3,9 | 70 | 5,0 | 0 | 0,50 | 2,9±0,05 |
| 22 | 6,2 | 3,9 | 70 | 5,0 | 0,16 | 0 | 3,9±0,10 |
| 23 | 6,2 | 3,6 | 70 | 5,0 | 0,16 | 0,25 | 10,2±0,06 |
| 24 | 6,2 | 3,6 | 70 | 5,0 | 0,16 | 0,50 | 6,2±0,03 |
| 25 | 6,2 | 3,6 | 70 | 5,0 | 0,32 | 0 | 7,8±0,16 |
| 26 | 6,2 | 3,7 | 70 | 5,0 | 0,32 | 0,25 | 7,9±0,02 |
| 27 | 6,2 | 3,7 | 70 | 5,0 | 0,32 | 0,50 | 5,5±0,08 |
| 28 | 6,5 | 4,2 | 140 | 0 | 0 | 0 | 5,3±0,01 |
| 29 | 6,5 | 4,5 | 140 | 0 | 0 | 0,25 | 6,7±0,04 |
| 30 | 6,5 | 4,6 | 140 | 0 | 0 | 0,50 | 6,8±0,03 |
| 31 | 6,5 | 4,8 | 140 | 0 | 0,16 | 0 | 9,1±0,02 |
| 32 | 6,5 | 4,9 | 140 | 0 | 0,16 | 0,25 | 9,7±0,06 |
| 33 | 6,5 | 5,2 | 140 | 0 | 0,16 | 0,50 | 5,0±0,02 |
| 34 | 6,5 | 5,0 | 140 | 0 | 0,32 | 0 | 6,7±0,13 |
| 35 | 6,5 | 4,9 | 140 | 0 | 0,32 | 0,25 | 7,2±0,01 |
| 36 | 6,5 | 5,1 | 140 | 0 | 0,32 | 0,50 | 9,1±0,05 |
| 37 | 6,5 | 4,7 | 140 | 2,5 | 0 | 0 | 5,5±0,05 |
| 38 | 6,5 | 4,6 | 140 | 2,5 | 0 | 0,25 | 7,0±0,04 |
| 39 | 6,5 | 4,4 | 140 | 2,5 | 0 | 0,50 | 6,2±0,01 |
| 40 | 6,5 | 4,9 | 140 | 2,5 | 0,16 | 0 | 10,2±0,04 |
| 41 | 6,5 | 4,7 | 140 | 2,5 | 0,16 | 0,25 | 6,5±0,12 |
| 42 | 6,5 | 5,0 | 140 | 2,5 | 0,16 | 0,50 | 9,3±0,09 |
| 43 | 6,5 | 4,9 | 140 | 2,5 | 0,32 | 0 | 8,4±0,15 |
| 44 | 6,5 | 4,8 | 140 | 2,5 | 0,32 | 0,25 | 5,4±0,13 |
| 45 | 6,5 | 4,9 | 140 | 2,5 | 0,32 | 0,50 | 10,3±0,04 |
| 46 | 6,5 | 4,7 | 140 | 5,0 | 0 | 0 | 7,1±0,03 |
| 47 | 6,5 | 4,3 | 140 | 5,0 | 0 | 0,25 | 7,5±0,02 |
| 48 | 6,5 | 4,2 | 140 | 5,0 | 0 | 0,50 | 6,3±0,04 |
| 49 | 6,5 | 4,8 | 140 | 5,0 | 0,16 | 0 | 8,7±0,03 |
| 50 | 6,5 | 4,7 | 140 | 5,0 | 0,16 | 0,25 | 8,2±0,03 |
| 51 | 6,5 | 4,6 | 140 | 5,0 | 0,16 | 0,50 | 6,4±0,09 |
| 52 | 6,5 | 4,4 | 140 | 5,0 | 0,32 | 0 | 8,8±0,18 |
| 53 | 6,5 | 4,1 | 140 | 5,0 | 0,32 | 0,25 | 10,7±0,16 |
| 54 | 6,5 | 4,5 | 140 | 5,0 | 0,32 | 0,50 | 9,2±0,03 |
| 55 | 6,7 | 5,8 | 210 | 0 | 0 | 0 | 7,6±0,14 |
| 56 | 6,7 | 5,6 | 210 | 0 | 0 | 0,25 | 7,8±0,03 |
| 57 | 6,7 | 5,7 | 210 | 0 | 0 | 0,50 | 7,1±0,15 |
| 58 | 6,7 | 6,0 | 210 | 0 | 0,16 | 0 | 8,4±0,20 |
| 59 | 6,7 | 5,8 | 210 | 0 | 0,16 | 0,25 | 8,0±0,02 |

Продолжение таблицы 2

| Вариант среды | pH исх. | pH кон. | Меласса свекловичная, г/л | NH ₄ NO ₃ , г/л | KH ₂ PO ₄ , г/л | MgSO ₄ , г/л | Сухая биомасса, г/л |
|---------------|---------|---------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| 60 | 6,7 | 6,1 | 210 | 0 | 0,16 | 0,50 | 7,3±0,16 |
| 61 | 6,7 | 5,9 | 210 | 0 | 0,32 | 0 | 8,1±0,01 |
| 62 | 6,7 | 6,3 | 210 | 0 | 0,32 | 0,25 | 7,8±0,20 |
| 63 | 6,7 | 5,8 | 210 | 0 | 0,32 | 0,50 | 10,0±0,10 |
| 64 | 6,7 | 5,1 | 210 | 2,5 | 0 | 0 | 8,1±0,21 |
| 65 | 6,7 | 4,9 | 210 | 2,5 | 0 | 0,25 | 7,4±0,09 |
| 66 | 6,7 | 5,5 | 210 | 2,5 | 0 | 0,50 | 5,2±0,01 |
| 67 | 6,7 | 5,8 | 210 | 2,5 | 0,16 | 0 | 7,3±0,15 |
| 68 | 6,7 | 5,9 | 210 | 2,5 | 0,16 | 0,25 | 5,6±0,09 |
| 69 | 6,7 | 5,6 | 210 | 2,5 | 0,16 | 0,50 | 7,7±0,18 |
| 70 | 6,7 | 6,0 | 210 | 2,5 | 0,32 | 0 | 9,1±0,11 |
| 71 | 6,7 | 5,9 | 210 | 2,5 | 0,32 | 0,25 | 10,5±0,14 |
| 72 | 6,7 | 5,8 | 210 | 2,5 | 0,32 | 0,50 | 8,4±0,16 |
| 73 | 6,7 | 5,7 | 210 | 5,0 | 0 | 0 | 6,1±0,07 |
| 74 | 6,7 | 5,7 | 210 | 5,0 | 0 | 0,25 | 9,1±0,23 |
| 75 | 6,7 | 5,7 | 210 | 5,0 | 0 | 0,50 | 8,0±0,09 |
| 76 | 6,7 | 5,8 | 210 | 5,0 | 0,16 | 0 | 7,5±0,33 |
| 77 | 6,7 | 5,7 | 210 | 5,0 | 0,16 | 0,25 | 8,1±0,08 |
| 78 | 6,7 | 5,6 | 210 | 5,0 | 0,16 | 0,50 | 7,9±0,18 |
| 79 | 6,7 | 5,7 | 210 | 5,0 | 0,32 | 0 | 7,7±0,01 |
| 80 | 6,7 | 5,6 | 210 | 5,0 | 0,32 | 0,25 | 7,4±0,01 |
| 81 | 6,7 | 5,8 | 210 | 5,0 | 0,32 | 0,50 | 7,0±0,02 |

Данные таблицы 2 позволяют сделать вывод о том, что максимальный выход сухой биомассы – 10,70 г/л достигнут в 53 варианте питательной среды. На основании полученных значений составлена питательная среда, соответствующая следующей прописи: меласса свекловичная – 140 г/л; калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,32 г/л; аммоний сернокислый – 5,0 г/л; магний сернокислый – 0,25 г/л.

Выводы

Исследовано влияние компонентов посевных питательных сред на рост культуры производственного штамма *Aspergillus niger* Б-1. Показано, что оптимизация состава комплексной питательной среды способствовала увеличению количества грибной биомассы. Полученные данные направлены на решение задачи повышения процента выхода посевного материала для микробиологического процесса синтеза лимонной кислоты.

Литература

1. Журавский, Г.И. Физиолого-биохимические основы производства лимонной кислоты с помощью грибов рода *Aspergillus*: автореф. дис. ...д-ра биол. наук: 03.00.07 / Г.И. Журавский; Ин-т микробиологии. – Москва, 1964. – 47 с.
2. Карклин, Р.Я. Микробный биосинтез лимонной кислоты / Р.Я. Карклин. – Рига: Зинатне. – 1993. – 240 с.
3. Смирнов, В.А. Пищевые кислоты / В.А. Смирнов. – М.: Лёгкая и пищевая промышленность. – 1984. – 264 с.
4. Беккер, З.Э. Физиология и биохимия грибов / З.Э. Беккер. – Москва: Из-во Моск. ун-та. – 1988. – 230 с.
5. Материал посевной (конидии плесневого гриба *Aspergillus niger*) для производства лимонной кислоты. – Введ. 06.01.2002. – СПб: ГУ ВНИИПАКК. – 2002. – 32 с.