

Г. И. ЖУРАВСКИЙ

ГЛУБИННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ С ПОМОЩЬЮ ГРИБОВ РОДА ASPERGILLUS

(Представлено академиком А. И. Опариным 16 V 1951)

Для биологического производства лимонной кислоты с помощью грибов рода *Aspergillus* обычно применяется так называемый поверхностный способ. Высейнные в питательный раствор споры гриба всплывают на его поверхность и прорастают в сплошную мицелиальную пленку. В клетках мицелия, получающих углевод из питательного субстрата, происходит сложный биологический синтез лимонной кислоты, которая выделяется затем обратно в субстрат. Благодаря работам В. С. Буткевича, С. П. Костычева и особенно учеников последнего (¹) в Советском Союзе создан новый вид микробиологического производства и достигнуты крупнейшие успехи в части получения максимальных выходов лимонной кислоты с единицы поверхности грибной пленки.

Получение лимонной кислоты в глубинных условиях встретило значительные трудности в связи с изменением условий питания и аэрации погруженной культуры, а также из-за вмешательства новых неустойчивых, трудно уловимых, но существенно влияющих на процесс факторов (например, степень диспергирования воздуха, механическое перемешивание погруженной культуры и влияние его на жизнеспособность мицелия и пр.), в своей совокупности значительно затрудняющих положительное решение данной проблемы. В литературе имеются указания на безуспешность получения лимонной кислоты в погруженных условиях (^{3, 7-9}).

Между тем получение лимонной кислоты в глубинных условиях увеличило бы мощность существующего производства лимонной кислоты за счет более полного использования кубатуры бродильных помещений и одновременного вовлечения в производство больших объемов сбрасываемых растворов, снизило бы потери от инфекции и способствовало бы механизации всего процесса.

Необходимо было выяснить условия, обеспечивающие наиболее полное выявление способности гриба к биосинтезу лимонной кислоты, усиление и закрепление этой способности. При решении этих вопросов, связанных с переделкой природы возбудителя процесса, особое значение имеет отбор штаммов гриба, способ их культивирования и особенно условия питания погруженной культуры, способствующие формированию мицелия, наиболее активно синтезирующего лимонную кислоту.

Для работ (1948—1949 гг.) с погруженными культурами лабораторией были отобраны лучший штамм *Aspergillus niger* № 6/5 и физиологически близкий ему штамм Г гриба *Aspergillus Wentii*, выделенный из посторонней микрофлоры, сопутствующей производству лимонной кислоты. Для выращивания конидий гриба применялась среда Журавско-го — Терентьевой (¹⁰), обеспечивающая устойчивое и обильное спороношение и сохранение в спорах высокой кислотообразующей способности штамма. Состав среды: NH_4Cl 2,0 г, KH_2PO_4 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,025 г в 1000 мл разбавленного до 3—5° по Баллингу неохмеленного пивного сусла. Опыты проводились в литровых склянках, содержащих 400 мл сбрасываемого раствора.

Аэрация погруженной культуры достигалась путем периодического

продувания через опытные сосуды стерильного воздуха и непрерывно-го встряхивания их на качалке с горизонтальным возвратно-поступательным движением. После разработки питательной среды исследования проводились также и в сосудах значительно больших размеров — 18-литровых бутылках, содержащих 10 л сбраживаемого раствора. Здесь аэрация погруженной культуры достигалась путем непрерывного продувания воздуха и перемешивания раствора с помощью 2-пропеллерной мешалки, вращающейся со скоростью 180—300 об/мин. Споры гриба вносились в питательный раствор в количестве от 700 000 до 2 500 000 на 1 мл. Процесс протекал при температуре 32—28°.

В результате анализа жизнедеятельности гриба в погруженных условиях лабораторией была разработана специальная питательная среда В-В₂, которая не только обеспечила рост и формирование наиболее активного к кислотообразованию в погруженных условиях мицелия, но и позволила направить процесс в сторону синтеза, главным образом, лимонной кислоты.

В 1 л среды В-В₂ содержится: мочевины 1,00 г, NH₄Cl 0,80 г, КН₂РO₄ 0,16 г, КСl 0,075 г, MgSO₄·7H₂O 0,50 г, MnSO₄·7H₂O 0,02 г, ZnSO₄·7H₂O 0,01 г, сахара 150,00 г. рН среды доводится соляной кислотой до 4,5—5,5.

Исследования показали, что при формировании высокоактивного мицелия решающее значение имеют азот и фосфор. Изменение их концентрации в питательном растворе резко изменяет как синтетическую способность клеток мицелия, так и характер вырабатываемых ими кислот. Так, значительное уменьшение фосфора (см. табл. 1) приводит к усилению синтеза побочной, глюконовой кислоты и, наоборот, увеличение его сверх оптимума снижает не только образование лимонной кислоты, но и резко ограничивает нарастание общей титруемой кислотности раствора. Увеличение содержания КН₂РO₄ до 0,28 г на литр питательной

Таблица 1

Влияние различных дозировок фосфора на фоне среды В-В₂ на процесс кислотообразования погруженной культуры

№ вариантов	Содержание КН ₂ РO ₄ в литр. среде в г/л	Содерж. к. лимонной в % от общей кислотности	Абс. со-держ. лимонной к-ты в г/л	Выход лимонной к-ты в % к контролю (В-В ₂)
1	0,08	62,8	13,62	64,40
2	0,12	90,1	20,37	96,31
3	0,16	88,5	21,15	100,00
4	0,20	85,9	17,50	82,75
5	0,24	82,3	12,90	61,00
6	0,28	72,3	6,43	30,40

среды снижает выход лимонной кислоты на 70%. В связи с этим видоизмененная среда Ролена, с успехом применяемая при поверхностном способе (2), но содержащая 0,50 г КН₂РO₄ на литр, непригодна для получения лимонной кислоты в глубинных условиях; она вызывает пышное нарастание массы погруженного мицелия, клетки которого не способны к активному синтезу лимонной кислоты.

При поверхностном способе повышенная концентрация фосфора в питательной среде необходима, так как развивающийся на поверхности питательного раствора мицелий уже в первые часы своего роста энергично потребляет питательные элементы, в том числе и фосфор, из верхних слоев питательного раствора. Гифы мицелия через некоторое время оказываются на среде, значительно обедненной фосфором, так как диффузия последнего из нижних слоев в верхние совершается медленно. Поэтому в отличие от погруженной культуры, находящейся в постоянно перемешивающейся питательной среде, для формирования полноценного мицелия поверхностным способом необходима повышенная концентрация фосфора, как это имеет место в среде Ролена. По этой же причине среда Шу и Джонсона (5, 6), содержащая 2,5 г КН₂РO₄ на литр и рекомендованная авторами специально для глубин-

ного способа, оказалась, так же как и среда Ролена, непригодной для погруженных культур. Среда Ваксмана и Кероу (4), рекомендованная специально для глубинного брожения, наоборот, содержит слишком мало фосфора — 0,08 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ на литр питательной среды. Среда, до такой степени обедненная фосфором, способствует формированию слишком ослабленного мицелия, синтезирующего наряду с лимонной кислотой, вопреки утверждению авторов, 40—50% глюконовой кислоты, что снижает выход лимонной кислоты (см. табл. 2). Увеличение содержания $\text{KН}_2\text{PО}_4$ до 0,12—0,16 г/л повышает содержание лимонной кислоты в сброживаемом растворе до 90%, но недостаточно интенсифицирует процесс.

Таблица 2

Влияние органического и минерального азота при различных дозировках фосфора на процесс кислотообразования погруженной культуры

№ опытов	Среда	Дано в г на 1 л среды			Содерж. лимонной к-ты в % от общей кислотности	Абс. со-держ. лимонной к-ты в г/л	Выход лимонной к-ты в % к контролю (В-В ₂)
		мочевина	NH_4Cl	$\text{KН}_2\text{PО}_4$			
1	В-В ₂	1,0	1,0	0,16	89,23	23,70	100,00
	№ 1	1,0	1,0	0,08	55,00	13,75	58,99
	Ваксман—Кероу	1,0	—	0,08	50,12	13,48	56,88
	№ 2	1,0	—	0,32	56,28	4,78	20,17
	№ 4	1,0	1,0	0,32	72,60	5,66	23,89
2	В-В ₂	1,0	1,0	0,16	86,74	26,93	100,00
	Вариант № 1	1,0	—	0,16	90,30	12,73	47,27
	Вариант № 2	—	1,0	0,16	75,51	5,33	19,79

Наблюдения показали, что введение органического азота и, в частности, мочевины способствует более равномерному нарастанию способного к интенсивному биосинтезу лимонной кислоты погруженного мицелия. Однако активное усвоение азота мочевины возможно лишь с появлением определенной массы мицелия, в достаточном количестве продуцирующего уреазу. Поэтому введение в питательную среду наряду с мочевиной ограниченного количества легкоусвояемого минерального азота обеспечивает с самого начала более интенсивное питание и нарастание мицелия, которое в дальнейшем протекает более равномерно, преимущественно за счет азота мочевины. Существенным недостатком среды Ваксмана и Кероу, содержащей только органическую форму азота, является отсутствие в ней минерального азота, что приводит к снижению активности кислотообразования.

Таким образом, благоприятной для глубинного процесса средой будет среда, содержащая и органическую и минеральную форму азота. Азотное питание должно находиться в строго определенном соотношении с фосфорным питанием, нарушение которого особенно чувствительно сказывается на поведении культуры гриба в погруженных условиях. Такой средой, как видно из табл. 2, является разработанная лабораторией среда В-В₂. Как показывают наши исследования, на среде Ваксмана и Кероу выход лимонной кислоты ниже в 1,5—2,0 раза, чем на среде В-В₂.

Количественные изменения азота и фосфора в питательной среде могут существенным образом влиять и на развитие организма. Исключением минерального азота из питательной среды или резким уменьшением в ней фосфора можно вызвать переход к нормальному конидиеобразованию и у погруженного в жидкую питательную среду аэробного организма. В этих случаях микроскопический анализ показывает быстрое развитие организма и образование на погруженном мицелии

конидиеносцев с головками и стеригмами, которые в дальнейшем отшнуровывают конидии (см. рис. 1). Это обстоятельство открывает перспективы для направленной переделки и приспособления кислотообразователей рода *Aspergillus* применительно к глубинным условиям образования лимонной кислоты.

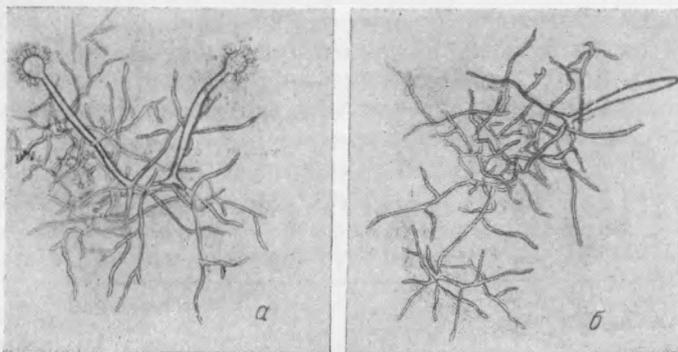


Рис. 1. Слева — мицелий, выращенный на среде, лишенной минерального азота. Справа — мицелий, выращенный на среде В-В₂

Отбор штаммов, активных к кислотообразованию в погруженных условиях, и разработка питательной среды, позволившей вскрыть способность погруженной культуры к биосинтезу лимонной кислоты, обеспечили положительное решение вопроса о возможности кислотообразования в глубинных условиях.

Следует отметить, что положительное решение вопроса было бы невозможно без одновременного изучения целого ряда других факторов, связанных с аэрацией погруженной культуры, ее перемешиванием, температурным режимом, сменностью растворов и т. д. В результате изучения всех этих вопросов был получен глубинным способом в бутылках с 10 л сбрасываемого раствора выход лимонной кислоты, равный 50—55 г на 1 л исходного раствора. При проверке процесса в полупроизводственных масштабах за 9-суточный цикл из 110 л сбрасываемой среды В-В₂ было получено 4,4 кг лимонной кислоты, что составит 40 кг/м³.

Настоящими исследованиями выявлены факторы, обеспечивающие интенсификацию процесса кислотообразования погруженным мицелием и позволяющие направить этот процесс в сторону биосинтеза, главным образом, лимонной кислоты. Тем самым, вопреки существовавшему противоречивым мнениям, показана безусловная возможность получения лимонной кислоты с помощью аэробных организмов грибов рода *Aspergillus* в глубинных условиях.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
кондитерской промышленности и
Ленинградский завод лимонной кислоты

Поступило
30 III 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. П. Протоdjяконов, Микробиология, 8, в. 3—4 (1939). ² Г. И. Журавский, там же, 8, в. 3—4 (1939). ³ В. Bleyer, Germ. Pat., 434, 729, Okt. 6. 1926. ⁴ E. Karow and S. Waksman, Ind. and Eng. Chem., 39, No. 7, 821 (1947). ⁵ P. Shu and M. Johnson, *ibid.*, 40, No. 7, 1202 (1948). ⁶ P. Shu and M. Johnson, Journ. Bacter., 56, No. 5, 577 (1948). ⁷ S. Waksman, The Fruit Products Journal and American Food Manufacturer, 25, No. 8 (1946). ⁸ S. Waksman, V. S. Pat. 2400143, 1946. ⁹ P. Wells and G. Ward, Ind. and Eng. Chem., 31, 172 (1939). ¹⁰ Г. И. Журавский и О. Ф. Терентьева, Тр. Всесоюз. н.-и. ин-та конд. пром., в. 7, 136 (1951).