

НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет
имени Сакена Сейфуллина»

УДК 661.746.5

На правах рукописи

ШАЙМЕНОВА БАХЫТ САЙЛАУОВНА

**Совершенствование технологии производства лимонной кислоты
на основе углеводсодержащего сырья путем оптимизации
процесса ферментации**

6D072800 - Технология перерабатывающих производств

Диссертация на соискание
степени доктора философии (PhD)

Научный консультант:
к.б.н., профессор Оспанкулова Г.Х.
НАО «КАТИУ им.С.Сейфуллина»

Зарубежный научный консультант:
PhD, профессор Lü Xin
Северо-западный университет сельского
и лесного хозяйства, КНР

Республика Казахстан
Астана, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Анализ потенциала глубокой переработки растительного сырья и рынка лимонной кислоты.....	11
1.2 Применение лимонной кислоты в пищевой промышленности.....	12
1.3 Физические и химические свойства лимонной кислоты.....	14
1.4 История производства лимонной кислоты.....	15
1.5 Микроорганизмы – продуценты лимонной кислоты.....	17
1.6 Производство лимонной кислоты с использованием грибов <i>A.niger</i>	18
1.7 Метаболизм лимонной кислоты у <i>A. niger</i>	21
1.8 Методы и условия культивирования.....	23
1.9 Факторы, влияющие на производство лимонной кислоты.....	24
1.10 Оптимизация условий ферментации.....	35
1.11 Получение высокоочищенной лимонной кислоты.....	36
Выводы по разделу 1.....	37
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	39
2.1 Объекты исследования.....	39
2.2 Методы исследования	40
Выводы по разделу 2.....	52
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53
3.1 Поиск активных продуцентов, способа и условий культивирования микроорганизмов для производства лимонной кислоты.....	53
3.2 Исследования по усилению продуцирующей способности штаммов <i>A.niger</i>	60
3.3 Исследование физико-химических свойств растительного сырья, используемого для производства лимонной кислоты.....	64
3.4 Выбор оптимальных режимов и состав питательной среды для производства лимонной кислоты.....	65
3.5 Оптимизация параметров озонирования ферментера при подготовке к биосинтезу лимонной кислоты штаммом <i>A. niger R5/4</i>	84
3.6 Оптимизация процесса биосинтеза лимонной кислоты штаммом <i>A. niger R5/4</i> в масштабированных условиях опытной апробации...	89
3.7 Исследование процессов выделения, очистки и кристаллизации лимонной кислоты из ферментационного раствора	95
3.8 Усовершенствование технологии производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала.....	97
3.9 Качественная характеристика полученной лимонной кислоты и оценка её функциональных свойств.....	99

Выводы по разделу 3.....	106
4 ОЦЕНКА ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ.....	107
Выводы по разделу 4.....	109
ЗАКЛЮЧЕНИЯ.....	110
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	112
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Технология производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала.....	126
ПРИЛОЖЕНИЕ Б –Акт производственных испытаний технологии производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала.....	136
ПРИЛОЖЕНИЕ В – Рекомендация по получению лимонной кислоты из кукурузного крахмала.....	139
ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Протоколы испытаний готовой продукции.....	157
ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Документы на интеллектуальную собственность...	161
ПРИЛОЖЕНИЕ Е – Паспорт штамма, свидетельство о депонировании штамма микроорганизма	162
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж – Отчет НИР и проектов, в рамках которых была выполнена диссертационная работа.....	164
ПРИЛОЖЕНИЕ И – Наличие сертификата о прохождении стажировки	166
ПРИЛОЖЕНИЕ К – Сертификаты о повышении квалификации.....	167
ПРИЛОЖЕНИЕ Л – Справка о наличии публикации в базе данных Scopus.....	169

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты: Государственные общеобязательные стандарты высшего и послевузовского образования, утвержденные приказом МНВО РК от 20 июля 2022 года № 2. Методическая инструкция «Порядок оформления и написания докторской диссертации», МИ СМК 110.26 – 2016.

Международный библиографический стандарт АРА (American Psychological Association). ВНД 110. 26 – 2023. Внутренние нормативные документы. Порядок оформления и написания докторской диссертации.

ГОСТ Р 55228-2012 Добавки пищевые. Метод определения массовой доли лимонной и сопутствующих кислот в производстве лимонной кислоты.

ГОСТ 31935-2012 «Крахмал пшеничный. Технические условия».

ГОСТ 32159-2013 «Крахмал кукурузный. Общие технические условия

ГОСТ Р 55802-2013 "Крахмал. Методы определения влаги".

ГОСТ Р 55800-2013 "Крахмал. Метод определения общей золы".

ГОСТ 13496.15–97 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения содержания жира».

АОАС 2011.11 “Protein (crude) in animal feed, plant tissue, grain, and oilseeds”.

ГОСТ 13496.4-93 «Комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения азота и расчета содержания сырого протеина».

Содержание фосфатов в нативных крахмалах определяли по ГОСТ 7698-93 «Крахмал. Правила приемки и методы анализа».

ГОСТ 908-2004 «Кислота лимонная моногидрат пищевая. Технические условия».

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

РК	Республика Казахстан
ЕС	Европейский Союз
ГОСТ	Межгосударственный стандарт
СТ РК	Государственный стандарт Республики Казахстан
GRAS	Generally Recognized As Safe
TCA	Цикл Кребса
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ФАО	Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН
DE	декстрозный эквивалент
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
ЛК	лимонная кислота
SMF	глубинная ферментация
SSF	твердофазная ферментация
СВ	сухие вещества
pH	водородный показатель
мл	миллилитр
%	процент
кг	килограмм
л	литр
см	сантиметр
с	секунда
°C	градус Цельсия
R	коэффициент корреляции

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Глубокая переработка зерна – это технологический процесс, направленный на максимальное извлечение и использование всех компонентов зерна (крахмала, белков, жиров, клетчатки, витаминов, микроэлементов) для получения ценных пищевых и непищевых продуктов

Лимонная кислота (2-гидрокси-1,2,3-пропантрикарбоновая кислота) это бесцветное кристаллическое органическое соединение, принадлежащее к семейству карбоновых кислот.

Декстрозный эквивалент - относительная величина, определяющая восстанавливающую способность сиропа, выраженная в граммах D-глюкозы (декстрозы) на 100 г сухого вещества

Нативный крахмал – крахмал, полученный промышленным или лабораторным методами, свойства которого условно принимают аналогичными свойствам крахмала, содержащегося в органах растений

Цикл Кребса – это цепочка химических реакций, происходящих в митохондриях, которая называется циклом потому, что продолжается непрерывно. Она же является и общим конечным путем окисления ацетильных групп (в виде ацетил-КоА), в которые превращается в процессе распада большая часть органических молекул, играющих роль «клеточного топлива» или «субстратов окисления»: углеводов, жирных кислот и аминокислот

Ферментация – процесс, в котором происходит преобразование исходного сырья в продукт с использованием биохимической деятельности микроорганизмов или изолированных клеток.

Штамм-продуцент – штамм микроорганизмов, биологический объект, предназначенный для осуществления биотехнологического производства.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Технологии по глубокой переработке сырья в мировой научной практике являются востребованными и передовыми. Для многих зарубежных стран глубокая переработка является сформированной отраслью, приносящей стабильные высокие доходы. Для Казахстана является стратегическим направлением развития агропромышленного комплекса и одним из ключевых приоритетов государственной политики, что неоднократно подчёркнуто в Посланиях Президента Республики Казахстан [1].

Продукт глубокой переработки растительного сырья - лимонная кислота – наиболее широко используемый регулятор кислотности. Являясь натуральным антиоксидантом, лимонная кислота широко применяется в пищевой промышленности, производстве синтетических моющих средств, в сельском хозяйстве, косметической и фармацевтической промышленности и других отраслях.

В настоящее время объём мирового рынка лимонной кислоты увеличился с 3,87 млрд долларов США в 2022 году до 4,2 млрд долларов США в 2023 году. Анализ текущих тенденций позволяет прогнозировать рост рынка лимонной кислоты будет расти. Потребность к 2027 году его объём может достичь 5,52 млрд долларов США [2].

В стране лимонная кислота импортируется, вследствие чего внутренний рынок зависит от внешних поставок. Вместе с тем Казахстан располагает существенными ресурсами углеводсодержащего сырья, включая кукурузный и пшеничный крахмал, которые могут быть использованы в качестве сырьевой базы для её производства.

В республике функционируют три крупных завода по глубокой переработке зерна, а ещё четыре проекта находятся на стадии реализации: ТОО «Жаркентский крахмало-паточный завод» (150 тыс. тонн переработки кукурузы в год), ТОО «АзияАгроФуд» (60 тыс. тонн кукурузы в год – производство крахмала, патоки и сиропов), ТОО «Биооперейшн» (300 тыс. тонн пшеницы – производство крахмала, глютена, биоэтанола и кормов). Эти предприятия создают основу отечественной крахмалопаточной отрасли и обеспечивают переработку значительных объёмов местного углеводсодержащего сырья. До 2028 года предприятия планируют запустить несколько крупных новых проектов, и эти проекты помогут расширить глубокую переработку зерна.

Для коммерческого производства лимонной кислоты, как правило, основаны на глубинном культивировании углеводных субстратов с использованием штаммов *Aspergillus niger* (*A. niger*). Этот способ отличается высокой производительностью, экологичностью и стабильностью процесса при низких значениях pH, что позволяет избежать образования токсичных побочных метаболитов. Однако природные штаммы *A. niger* обладают ограниченной способностью к гидролизу крахмала, что снижает эффективность биосинтеза. В связи с этим главной задачей является получение мутантных штаммов,

способных эффективно использовать крахмальные гидролизаты как основной источник углерода.

Таким образом, создаются условия для разработки и внедрения отечественных технологий получения лимонной кислоты с использованием местных ресурсов.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является совершенствование технологии производства лимонной кислоты из углеводсодержащего сырья путем оптимизации процесса ферментации с использованием нового высокоэффективного штамма *A. niger R5/4*.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Проведение скрининга активных продуцентов лимонной кислоты, изучение их молекулярно-генетических характеристик и усиление его свойств к продуцированию лимонной кислоты;
2. Исследование физико-химических свойств крахмалосодержащего сырья;
3. Определение оптимального состава питательной среды и параметров культивирования;
4. Применение озонирования для стерилизации ферментационного оборудования и определение оптимальных параметров процесса.
5. Оптимизация процесса биосинтеза лимонной кислоты в условиях масштабированной опытной апробации.
6. Определение качественной характеристики готовой продукции и оценка её функциональных свойств.
7. Определение экономической эффективности технологии производства лимонной кислоты на основе кукурузного крахмала.
8. Разработка усовершенствованной технологии получения лимонной кислоты с использованием нового высокоэффективного штамма.

Научная новизна:

- усовершенствована технология производства лимонной кислоты на основе применения мальтодекстрина и высокоэффективного штамма *A. niger R5/4*, полученного способом комбинированного мутагенеза, обеспечивающая высокий выход конечного продукта;
- в технологии производства лимонной кислоты для стерилизации ферментеров предложено и обосновано использование способа озонирования, которое повышает продуктивность и активность штаммов микроорганизмов, тем самым увеличивает выход лимонной кислоты.

Практическая ценность работы. Результаты исследования имеют высокую прикладную ценность для перерабатывающей и пищевой промышленности Республики Казахстан. Усовершенствованная технология производства лимонной кислоты на основе углеводсодержащего сырья может быть внедрена на предприятиях пищевой и перерабатывающей промышленности, в том числе на крахмалопаточных и биотехнологических производствах.

Практическая значимость работы заключается в повышении выхода лимонной кислоты, снижении себестоимости продукции за счёт использования доступного сырья, а также в повышении эффективности технологического процесса путём оптимизации параметров ферментации и внедрения озонирования для стерилизации оборудования. Практическая реализуемость и новизна предложенных решений подтверждены патентами на изобретения Республики Казахстан №34800 «Мутантный штамм *Aspergillus niger* R5/4 - продуцент лимонной кислоты» и №35429 «Способ получения мальтодекстринов из пшеничного крахмала». Внедрение данной технологии способствует снижению зависимости от импортной лимонной кислоты и развитию отечественного производства.

Область применения. Результаты исследования могут быть широко внедрены на малых и средних предприятиях пищевой и перерабатывающей промышленности, а также в биотехнологических производствах органических кислот, способствуя расширению ассортимента продукции, повышению эффективности использования углеводсодержащего сырья и снижению зависимости от импортной продукции.

Личный вклад автора. Заключается в самостоятельной постановке цели и задач исследования, разработке методологии и программы экспериментов, выполнении теоретических и экспериментальных исследований, а также в обработке и интерпретации полученных результатов. Автором проведён анализ научной литературы, обоснованы актуальность и научная новизна темы, осуществлён отбор и исследование микроорганизмов, оптимизированы условия процесса.

Апробация и публикации. Опытно-промышленная апробация технологии проведена на базе ТОО «Жаркентский крахмало-паточный завод», что подтверждено актом производственных испытаний.

Публикаций. Результаты диссертационной работы опубликованы в 2 статьях в журналах, индексируемых в базе данных Scopus;

1. Shaimenova B., Ospankulova G., Saduakhasova S., Murat L., Toimbayeva D. Improving the citric acid production by mutant strains *A. niger* using carbohydrate-containing raw materials as a carbon source// Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences., 2024, 18, pp. 157–173// DOI:<https://doi.org/10.5219/1948>. Percentile – 45;

2. Saduakhasova S., Shaimenova B, Yermekov Y, Murat L, Kiyan V, Ospankulova G. Obtaining pesticides and fertilisers for hyper production of citric acid application in smart agriculture system// International journal of agricultural resources, governance and ecology volume 17, issue 2-4, pages 271 – 286, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1504/IJARGE.2021.121682>. Percentile – 25;

Опубликованы 2 статьи в журналах, рекомендованных КОКШВО МНВО РК;

1. Шайменова, Б. С., Садуахасова, С. А., Каманова, С. Г., Тоймбаева, Д. Б., Оспанкулова, Г. Х. Влияние макро-и микроэлементов на производство лимонной кислоты в биотехнологическом процессе //Вестник Университета Шакарима.

Серия технические науки. – 2025. – №. 2. – С. 353-359;
[https://doi.org/10.53360/2788-7995-2025-2\(18\)-43](https://doi.org/10.53360/2788-7995-2025-2(18)-43).

2. Шайменова Б.С., Садуахасова С.А., Каманова С.Г., Lü X., Оспанкулова Г.Х. *Aspergillus niger* R5/4 штаммы негізінде лимон қышқылының шығымын арттыру үшін озондау режимдерін қолдану//Вестник Университета Шакарима. Серия технические науки. – 2025. – №. 4. С. 424-432.
[https://doi.org/10.53360/2788-7995-2025-4\(20\)-50](https://doi.org/10.53360/2788-7995-2025-4(20)-50).

Результаты работы представлены в 7 материалах международных научных конференций.

Получены 2 патента на изобретения Республики Казахстан:

1. №34800 от 25.12.2020 – «Мутантный штамм *Aspergillus niger* R5/4 - продуцент лимонной кислоты»;

2. №35429 от 24.12.2021 – «Способ получения мальтодекстринов из пшеничного крахмала».

Работа выполнена в рамках программно-целевого финансирования ИРН BR06249419 (2018-2020г.) «Научно-технологическое обеспечение перерабатывающих предприятий агропромышленного комплекса с целью повышения их эффективности и конкурентоспособности» на базе НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени Сакена Сейфуллина».

Положения, выносимые на защиту:

1. Научное обоснование выбора высокоактивного штамма-продуцента *Aspergillus niger* R5/4 и параметров его культивирования, обеспечивающих эффективный биосинтез лимонной кислоты.

2. Оптимальные технологические режимы ферментации, обеспечивающие максимальное накопление лимонной кислоты.

3. Эффективность применения озонирования для стерилизации ферментационного оборудования, а также оптимальные параметры процесса, обеспечивающие подготовку биореактора к ферментации.

4. Усовершенствованная технология получения лимонной кислоты на основе мальтодекстрина из кукурузного крахмала с использованием нового штамма-продуцента и озонирования на стадии подготовки ферментационного оборудования.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает нормативные ссылки, определения, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение, заключения и список использованных источников.

Общий объем работы составляет 170 страниц, содержит 25 таблиц, 33 рисунков. Список использованных источников включает 169 наименований отечественной и зарубежной литературы.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Анализ потенциала глубокой переработки растительного сырья и рынка лимонной кислоты

Анализ потенциала глубокой переработки растительного сырья и рынка лимонной кислоты демонстрирует значительное значение этих процессов для развития агропромышленного комплекса Казахстана. Введение глубокой переработки зерна позволяет значительно увеличить добавленную стоимость продукции, расширить ассортимент экспортируемых товаров, создать новые рабочие места и снизить зависимость от импорта готовой продукции. Кроме того, это способствует укреплению продовольственной безопасности страны и стимулированию научных исследований и разработок в данной области.

Одним из ключевых продуктов глубокой переработки растительного сырья является лимонная кислота, которая находит широкое применение как регулятор кислотности. Она играет важную роль на рынке пищевых добавок, влияя на вкус продуктов и продлевая их срок хранения. Лимонная кислота также используется в различных отраслях, включая производство синтетических моющих средств, сельское хозяйство, косметическую и фармацевтическую промышленности. Мировой рынок лимонной кислоты занимает лидирующие позиции среди регуляторов кислотности благодаря её применению в производстве безалкогольных напитков и растущему спросу на безопасные пищевые продукты. Согласно данным за 2016 год, около 67% лимонной кислоты используется в пищевой промышленности, 16% – в химической, 8% – в фармацевтической и косметической отраслях, а 7% – в текстильной и металлургической промышленности [3].

На территории Таможенного союза сегодня производство лимонной кислоты осуществляется только ОАО «Скидельский сахарный комбинат» (Республика Беларусь). Однако на территории Казахстана лимонная кислота не производится и полностью импортируется. В структуре импорта лимонной кислоты более 70% составляют поставки из Китая. За последние 5 лет объем казахстанского рынка лимонной кислоты составил в среднем 2,5-2,6 тысяч тонн в год. Данная импортозависимость подчеркивает необходимость развития собственного производства, что может стать экономически целесообразным в условиях растущего мирового спроса на лимонную кислоту. Мировые производственные мощности сосредоточены в крупных компаниях, таких как Archer Daniels Midland Company (США), Cargill, Inc. (США), Jungbunzlauer AG (Швейцария), Tate & Lyle PLC (Великобритания), а также в фарминдустрии, представленной Roche Zhongya (Wuxi) Citric Acid Co., Ltd. (Швейцария - Китай), однако Казахстан имеет потенциал для создания конкурентоспособного производства, учитывая имеющийся спрос [4], а также в Фарминдустрии: Roche Zhongya (Wuxi) Citric Acid Co., Ltd. (Switzerland - China) [5].

В 1930-х годах ведущими производителями лимонной кислоты были американские компании Miles и Pfizer с объемом производства 4900 тонн в год [6]. К 1978 году совокупное производство этих компаний достигло примерно 70

000 тонн, а в 1990 году – 170 000 тонн. В 1990-х годах крупнейшие производители лимонной кислоты находились в США, в то время как Европа производила около 255 000 тонн в год, а другие регионы значительно отставали по объему производства [7]. Производство лимонной кислоты значительно увеличилось по всему миру в течение 20-го века, что отражает растущую важность этого продукта в промышленности и расширение географии его производства.

В настоящее время объём мирового рынка лимонной кислоты увеличился с 3,87 млрд долларов США в 2022 году до 4,2 млрд долларов США в 2023 году. Анализ нынешней тенденций позволяет прогнозировать что рынок лимонной кислоты будет расти. Потребность к 2027 году его объём может достичь 5,52 млрд долларов США (рис. 1) [8].

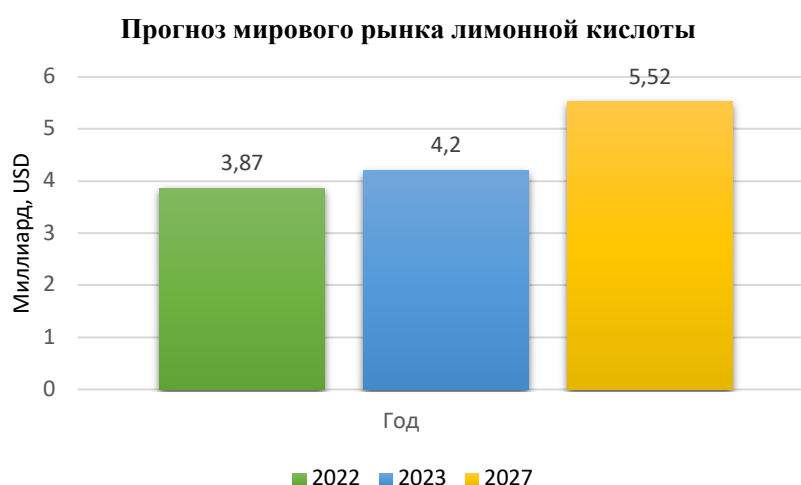


Рисунок 1 - Прогноз развития мирового рынка лимонной кислоты

Ожидается, что мировое производство лимонной кислоты вырастет до 3,3 млн тонн к 2028 году, что соответствует среднегодовому темпу прироста на уровне 2,78% [3, с.22]. Эти показатели подчёркивают актуальность задач разработки альтернативных, более экологичных способов получения лимонной кислоты.

Анализ рыночной тенденций показывает, что мировой спрос на лимонную кислоту будет продолжать расти. С учетом постоянного роста потребления лимонной кислоты на мировом рынке, развитие технологии производства лимонной кислоты на основе углеводсодержащего растительного сырья, является актуальным с точки зрения импортозамещения, повышения технологической независимости и обеспечения устойчивого развития перерабатывающей промышленности Казахстана.

1.2 Применение лимонной кислоты в пищевой промышленности

Лимонная кислота является одной из наиболее распространенных пищевых добавок и признана безопасной для здоровья человека. Объединенный

комитет экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам квалифицирует её как GRAS (Generally Recognized As Safe), что свидетельствует о её безопасности и допустимом суточном потреблении (ДСП) без необходимости ограничения [9]. Производные лимонной кислоты, такие как цитрат кальция, цитрат железа, цитрат марганца, цитрат калия, цитрат натрия, диаммоний цитрат, изопропил цитрат и стеариловый цитрат, также получили статус GRAS как пищевые добавки [10].

Лимонная кислота отличается низкой себестоимостью производства, легкой доступностью, нетоксичностью, биосовместимостью, универсальностью и безопасностью продуктов ее разложения [11].

В пищевых продуктах лимонная кислота выполняет различные функции, включая регулирование кислотности, консервирование, антиоксидантные свойства, эмульгирование, улучшение вкуса и аромата, буферную емкость и антибактериальную активность. Способность лимонной кислоты хелатировать ионы металлов и ее буферные свойства, в сочетании с цитратами, делают ее идеальной добавкой в производстве пищевых продуктов и нутрицевтиков [12].

Лимонная кислота играет важную роль в качестве антиоксиданта при производстве растительного масла и ограничении окисления липидов при переработке мяса. Она ингибирует окисление липидов, образуя связи между прооксидантными ионами металлов и карбоксильными или гидроксильными группами кислоты. Антиоксидантная активность лимонной кислоты в пищевых продуктах зависит от применяемой дозы и возрастает с увеличением концентрации кислоты [13].

В мясопереработке лимонная кислота уменьшает розовый цвет и повышает яркость термически обработанного мяса. В вареном мясе лимонная кислота ограничивает естественный розовый цвет и цвет, индуцированный нитритом натрия и никотинамидом. Уменьшение розового цвета в мясе может также происходить из-за хелатирования железа гема лимонной кислотой, препятствуя связыванию гема с лигандами, вызывающими розовый цвет [14].

Лимонная кислота и ее соли широко используются в пищевой промышленности для предотвращения ферментативного потемнения. Ферментативное потемнение фруктов и овощей – это явление, которое сокращает срок хранения и влияет на выбор потребителей [15].

Лимонная кислота используется в качестве добавки в воду для ополаскивания перед глубокой заморозкой и во фруктовых сиропах [16]. Добавление лимонной кислоты к хранящимся фруктам и овощам положительно влияет на сохранение цвета и органолептических качеств, а также продлевает срок их хранения. Ее также можно комбинировать с другими противопотемняющими агентами, такими как аскорбиновая кислота [17].

Таким образом, лимонная кислота является важным функциональным компонентом, способствующим не только улучшению качества пищевых продуктов, но и обеспечивающим продолжительность их хранения, что делает её незаменимой в различных производственных процессах пищевой промышленности.

1.3 Физические и химические свойства лимонной кислоты

Лимонная кислота известна также как 2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновая кислота. Лимонная кислота представляет собой полипротонную α -гидроксикислоту, но ее также можно классифицировать как β -гидроксикислоту (рис. 2) [18]. Она присутствует в растениях, животных клетках и физиологических жидкостях. В небольших количествах лимонная кислота содержится в цитрусовых, особенно в лимонах и лаймах. В количествах, превышающих 1 % от сухой массы продукта, она присутствует в лимонах (4-8%), ежевике (1,5-3,0 %), грейпфрутах (1,2-2,1 %), а также апельсинах, малине, клубнике. в диапазоне 0,6-1,3 %.

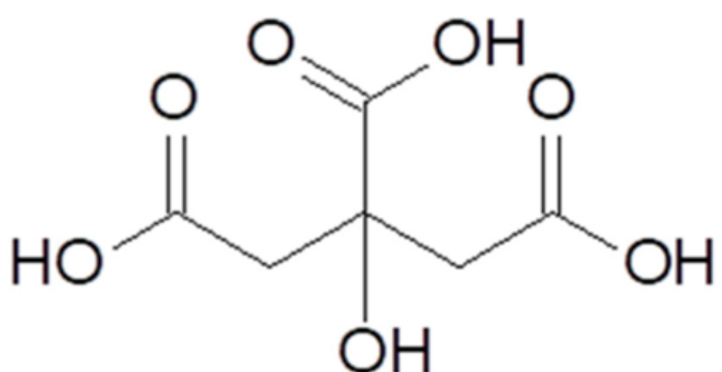


Рисунок 2 – Химическая структура лимонной кислоты

Лимонная кислота представляет собой органическое соединение, трикарбоновую оксикислоту с тремя карбоксильными функциональными группами. Это трипротонное соединение, которое подвергается трем постоянным диссоциациям, что позволяет ему образовывать три типа солей и проявлять буферные свойства [19, 20]. Лимонная кислота образует кристаллические одно-, двух- и трехосновные соли с различными катионами. С технологической точки зрения наиболее важными являются цитрат кальция, цитрат калия и цитрат натрия [21].

Лимонная кислота – это слабая кислота в двух кристаллических формах: безводная лимонная кислота ($C_6H_8O_7$) и моногидрат лимонной кислоты ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$). Безводная лимонная кислота кристаллизуется из горячего концентрированного раствора при температуре выше 36,6 °С, образуя белый кристаллический порошок. С другой стороны, моногидрат лимонной кислоты кристаллизуется из холодного раствора при температуре ниже 36,6 °С, образуя бесцветные прозрачные кристаллы. Безводная лимонная кислота поглощает небольшое количество воды при температуре 25°С и относительной влажности воздуха от 25 до 50 %. При влажности от 50 % до 75 % лимонная кислота значительно поглощает воду, а при относительной влажности, приближающейся к 75 %, переходит в моногидрат. Безводная форма лимонной кислоты получается при относительной влажности менее 40 %. Моногидрат ЛК слабо впитывает влагу при относительной влажности воздуха 65-75 % [22].

Лимонная кислота хорошо растворима в воде и органических растворителях, таких как этанол, 2-пропанол, эфир, этилацетат, 1,4-диоксан, тетрагидрофуран, ацетонитрил и смеси этанола с водой. Она обладает более высокой растворимостью в спирте, чем в воде. Добавление спирта в водный раствор значительно повышает растворимость лимонной кислоты [23]. При нагревании до 150 °С лимонная кислота сохраняет стабильность, теряя только кристаллическую воду. При температуре выше 175 °С она плавится и разлагается. Дегидратация лимонной кислоты приводит к образованию трансаконтовой кислоты. Предполагается, что дальнейшие термические превращения трансаконитовой кислоты вследствие дегидратации приводят к образованию аконитового ангидрида или смеси обоих изомеров [24].

Лимонная кислота обладает выраженными хелатирующими свойствами благодаря способности образовывать устойчивые комплексы с ионами металлов посредством координационных связей между карбоксильными и гидроксильными группами своей молекулы. Она эффективно связывает ионы меди, никеля, железа, магния, цинка и олова. Данное свойство позволяет предотвращать нежелательные изменения химического потенциала системы, осаждение твёрдых частиц и модификацию химических характеристик среды [3, с. 23].

В условиях обычного синтеза лимонную кислоту этерифицируют спиртами в присутствии кислотных катализаторов (серной кислоты, п-толуолсульфоновой кислоты или ионообменных смол). При повышенных температурах (выше 150 °С) реакция этерификации может протекать без катализатора. С полиспиртами (сорбитом, маннитом и др.) лимонная кислота образует сложные полиэферы. При неполном протекании реакции этерификации в продукте сохраняются свободные карбоксильные группы, способные к последующему солеобразованию.

1.4 История производства лимонной кислоты

История промышленного производства лимонной кислоты берёт начало в 1784 году, когда шведский химик Карл Вильгельм Шееле впервые выделил её в кристаллическом виде из лимонного сока. Он получил цитрат кальция, добавляя известь к лимонному соку, что стало первым шагом к пониманию химического состава этой важной кислоты [25].

В 1838 году Либих подтвердил наличие в структуре лимонной кислоты одной гидроксильной и трёх карбоксильных групп, что ещё больше углубило знания о её химическом составе. С 1860 года производство лимонной кислоты из лимонов осуществляется в Великобритании, Франции и Германии. Были проведены интенсивные исследования по поиску альтернативного метода получения лимонной кислоты [3, с. 24]. В 1893 году немецкий ботаник Вехемер заметил, что лимонная кислота образуется как побочный продукт при производстве оксалатов кальция *Penicillium glaucum*. Это открытие открыло новые горизонты для применения микроорганизмов в производстве лимонной кислоты. Промышленное производство лимонной кислоты с участием

микроорганизмов было начато в 1917 г. Карри, который разработал метод ее получения из нитчатых грибов *Sterigmatocystis nigra* (ныне *A. niger*) с использованием питательных сред, содержащих сахарозу [26]. Это стало значительным шагом вперед в производственной биотехнологии, который позволил увеличить объёмы производства лимонной кислоты и её доступность на рынке.

Важные этапы открытия и исследования лимонной кислоты показаны на рисунке 3.

Период VII век	Открытие лимонной кислоты исламским алхимиком Абу Муса Джабиром ибн Хайяном
1784 год	Карл Вильгельм Шееле, шведский химик, выделил лимонную кислоту из лимонного сока
1834 год	Юстус Либих, немецкий химик, определил, что лимонная кислота является гидрокси-трикарбоновой кислотой
1880 год	Первая химическая синтез лимонной кислоты была проведена Гирмо и Адамом
1891 год	Лунцманн и Пехманн синтезировали лимонную кислоту из этановой карбоновой кислоты
1897 год	Лоуренс использовал конденсацию стиль-оксаоацетата с этилбромацетатом в нескольких последовательных реакциях для получения лимонной кислоты
1893 год	Карл Вемер обнаружил, что лимонная кислота может быть получена из сахара с помощью плесени <i>Penicillium</i>
1919 год	Первый успешный процесс ферментации с использованием <i>Penicillium</i> на предприятии Les Produits Organiques de Tirlemont в Тинен, Бельгия
1917 год	Джеймс Карри и Чарльз Том обнаружили, что лимонная кислота может производиться в больших количествах с помощью <i>Aspergillus niger</i>
1923 год	Ферментационный процесс Карри — Тома был коммерциализирован компанией Pfizer Inc.
1937 год	Нобелевская премия для Ханса Кребса и Фрица Липмана за представление механизмов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК)
Период 1937 — 1956 гг.	Исследования влияния микро- и макроэлементов в питательной среде и параметров роста на оптимизированный процесс ферментации лимонной кислоты
Период 1997 — 1996 гг.	Достижения в молекулярной биологии и генетике <i>Aspergillus niger</i> , выраженные в интенсивном изучении генов, клонирования и анализа последовательностей
Период 1997 — 2017 гг.	Генерация негомологичных мутантов

Рисунок 3 - Основные этапы в открытия и исследования лимонной кислоты

Биохимические механизмы биосинтеза лимонной кислоты были раскрыты в 1950-е годы в связи с установлением путей гликолиза и цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса). [27]. Эти открытия стали основой для дальнейшего развития технологий производства лимонной кислоты, что позволило адаптировать процессы к современным требованиям промышленности.

Таким образом, история изучения и производства лимонной кислоты насчитывает более двухсот лет – от первоначального выделения из природных источников до современных высокотехнологичных методов, базирующихся на достижениях микробной биотехнологии.

1.5 Микроорганизмы – продуценты лимонной кислоты

В промышленном производстве лимонной кислоты основными продуцентами являются нитчатые грибы *A. niger* [28]. Выбор данных микроорганизмов обусловлен их рядом важных технологических преимуществ, среди которых высокая скорость адаптации к условиям культивирования и способность эффективно расти на разнообразных субстратах различного происхождения. *A. niger* способен регулировать свои метаболические пути и контролировать секрецию лимонной кислоты как из митохондрий, так и из цитозоля, что способствует накоплению лимонной кислоты и предотвращает её разложение в цикле Кребса. Кроме того, культуры, использующие *A. niger*, отличаются высокой эффективностью производства и гомоферментативным биосинтезом лимонной кислоты [29].

Штаммы *A. niger* были признаны безопасными, поскольку в контролируемых условиях культивирования они не продуцируют охратоксин и не вызывают сильных аллергических реакций у людей. В дополнение к биосинтезу лимонной кислоты и других органических кислот, *A. niger* также используется для синтеза различных ферментов, таких как пектиназы, протеазы, аминогликозидазы, каталазы, липазы и оксидазы [30].

С момента открытия способности микроорганизмов продуцировать лимонную кислоту штаммы *A. niger* остаются предпочтительными для её производства [31-33]. В дополнение к нитчатым грибам, таким как *A. niger*, для получения лимонной кислоты использовались различные другие микроорганизмы. К ним относятся *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus fumaricus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fonsecaeus*, *Aspergillus luchensis*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus usumii*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium restrictum*, *Trichoderma viride*, *Mucor piriformis*, *Talaromyces sp.*, *Eupenicillium sp.*, *Botrytis sp.*, *Absidia sp.* и *Ustilina vulgaris*. Кроме того, перспективными производителями лимонной кислоты являются дрожжи, такие как *Yarrowia lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Candida fibriae*, *Candida subtropicalis*, *Candida oleophila*, и бактерии, такие как *Arthrobacter paraffineus*, *Bacillus licheniformis* и *Corynebacterium spp.* Все эти микроорганизмы являются потенциальными источниками для производства лимонной кислоты [34, 35].

Помимо грибов и бактерий, дрожжи *Candida tropicalis* способны продуцировать лимонную кислоту из *n*-алкинов и углеводов. Однако использование дрожжей может быть связано с недостатком, так как они

способны производить нежелательный побочный продукт изооксидную кислоту [36].

Ферменты, секретируемые *Trichoderma*, характеризуются сложным составом и могут включать эндохитиназы, хитобиозидазы, β -N-ацетилгексозаминидазы, N-ацетил- β -галактозаминидазы, β -1,3-глюкозазы, β -1,6-глюканазы, протеазы, α -амилазы, целлюлазы, липазы, маннаназы, ксиланазы, уреазы, РНКазы, пектиназы и лакказ [37-39].

Таким образом, проведенный анализ подтверждает, что наиболее предпочтительными продуцентами лимонной кислоты остаются микроскопические грибы рода *Aspergillus*. *A. niger* проявляет высокую устойчивость к стрессовым условиям, включая низкий pH (2-3), демонстрируя отличные способности к использованию дешевых субстратов и имея статус безопасности (GRAS), что делает его эффективным и безопасным выбором для производства лимонной кислоты в промышленных масштабах.

1.6 Производство лимонной кислоты с использованием грибов *A. niger*

A. niger широко используется в промышленном производстве лимонной кислоты благодаря высокой продуктивности, устойчивости к условиям ферментации и способности перерабатывать доступные субстраты. Однако природные штаммы *A. niger* в большинстве случаев не обеспечивают максимально возможного выхода лимонной кислоты и нередко накапливают значительное количество побочных метаболитов. В связи с этим возникает необходимость в целенаправленной селекции и генетической модификации продуцентов для повышения эффективности биосинтеза.

Методы повышения продуктивности микроорганизмов традиционно включают индуцированный мутагенез, отбор штаммов по признаку высокой продуктивности, оптимизацию условий культивирования, а также приёмы генетической инженерии. Как показывают литературные данные, вплоть до 1980-х годов промышленные штаммы *A. niger* выводили преимущественно путём скрининга и мутагенеза, и этот подход по-прежнему остаётся одним из наиболее надёжных способов повышения биосинтетической активности [40].

Среди физических мутагенов наиболее часто применяются рентгеновское, гамма- и ультрафиолетовое излучение, а также их сочетание с химическими мутагенами. Гамма-излучение благодаря высокой проникающей способности быстро вызывает разнообразные повреждения генетического материала – от одно- и двунитевых разрывов ДНК до замен и модификаций азотистых оснований. Ультрафиолетовое облучение вызывает димеризацию пиримидинов и может быть менее эффективным из-за высокой частоты мутаций, достигаемой за счёт низкой выживаемости клеток. Например, в 1928 году были обнаружены варианты с повышенной способностью к биосинтезу лимонной кислоты, но эти мутанты оказались нестабильными и быстро теряли приобретенные свойства. В 1935 году появились первые сообщения о получении искусственных положительных мутантов *A. niger* с повышенной способностью продуцировать

ЛК, которые также впоследствии оказались неустойчивыми и потеряли свои свойства [41].

В 1970 году Tabuchi с соавторами [42] получили первый УФ-мутант N6-20 *C. lipolytica*, у которого был подавлен синтез изолимонной кислоты. В дальнейших публикациях японских исследователей этот мутант не упоминался.

В работах Adeoye A.O. и соавт., показано, что дикие штаммы подвергались воздействию УФ-излучения коротковолнового спектра (254 нм) на расстоянии 30 см в течение 5, 10, 15 и 20 минут. Среди диких штаммов штамм FUO 2 обеспечил наибольший выход лимонной кислоты – 1,93 г/л, тогда как мутантный штамм FUO 110, полученный после 10-минутного воздействия УФ-излучения, продемонстрировал выход 9,4 г/л, что соответствует увеличению в 4,87 раза [43].

В 1990г. селективная работа проводилась чешскими биотехнологами Pelechova и соавтр., которые путем воздействия УФ-облучения на родительский штамм *A. niger* получили мутантные штаммы с выходом лимонной кислоты до 74,6% [44].

Рентгеновское облучение является более мощным фактором мутагенеза по сравнению с ультрафиолетовыми лучами. Это связано с более высокой энергией рентгеновских лучей и их способностью проникать через различные материалы, такие как стекло и металлы. Ультрафиолетовые лучи, с другой стороны, имеют более низкую энергию и могут вызывать мутации только в тех организмах или клетках, с которыми непосредственно контактируют. Например, они могут повреждать ДНК в клетках кожи, но не могут проникнуть через стекло или другие непрозрачные материалы [45].

Рентгеновское излучение и техника быстрых нейтронов приводят к разрывам хромосом, вызывая делеции и инверсии. Мутагенный эффект этого метода довольно высок, однако его применение требует специального оборудования [46].

Таким образом, рентгеновское облучение может вызывать мутации и генетические изменения в клетках, даже если они находятся за преградой, такой как стекло, что делает его более мощным фактором мутагенеза в сравнении с ультрафиолетовыми лучами.

Действие физических факторов как показывают исследования, в основном связано с повреждением молекулы ДНК. Особое место среди химических факторов занимают алкилирующие агенты, в частности такие сильные мутагены как нитрозогуанидин, N-нитрозометилмочевина, этилметансульфонат и др. N-нитрозо-N-метилмочевина ингибирует синтез ДНК и деградировавшую клетку ДНК [47], вызывает девитализацию, а также известно как первичное канцерогенное соединение. При обработке химическими мутагенами большую роль играют физиологическое состояние культуры, состав питательной среды и условия культивирования, особенно pH и температура среды.

Впервые ЛК была синтезирована химическим путем в 1880 году. В конце XIX века Grimaux E. и Adam P. удалось осуществить химический синтез лимонной кислоты из жмыха, а затем из дихлорида ацетона. Хотя исходный материал доступен и этот метод является неконкурентным по сравнению

микробиологическим, в основном из-за неравенства между ценами на сырье и конечным продуктом [48].

Akiyama и др. (1973) и другие исследователи провели работы по получению мутантов под воздействием химического мутагенеза и в результате обработки природного штамма *A. niger* N228 ATCC20114 N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином и последующей селекции отобрали два мутанта *A. niger* K-20 и *A. niger* S-22. Использование 28 мутантов *A. niger* S-22 позволило фирме Takeda разработать практический способ производства лимонной кислоты из п-алканов. Известно, что штамм и соответствующие документации были переданы японской фирме американской компании Pfizer и итальянской фирме Liquichimica. Эти фирмы освоили микробиологические производства лимонной кислоты из п-парафина [49].

Огромные работы по получению мутантов были проведены авторами Prasad M. И соавторов (2013). В качестве продуцента был отобран родительский штамм *A. niger* MTCC 662 полученный в результате химического мутагенеза диэтилсульфонатом и УФ-излучением. У данного штамма был получен максимальный выход ЛК - 12,0 г/100мл, тогда как у родительского штамма - 8,2 г/100мл [50].

В результате исследований, проведенных Ikram-Ul и соавторов (2004) был получен мутантный штамм *A. niger*, подвергнутый мутагенезу с использованием УФ-облучения и химического агента N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидина (MNNG). Приведенный мутагенез привел к увеличению продуктивности штамма по синтезу лимонной кислоты. Мутантный штамм *Aspergillus niger* GCMC-7 выход лимонной кислоты составил $113,6 \pm 5$ г/л., что указывает и высокой эффективности мутагенеза. Полученные результаты подтверждает целесообразность использования мутантных штаммов для повышения эффективности микробиологического производства лимонной кислоты [51].

Отбор положительных мутантов является одним из важных этапов в работе с индуцированным мутагенезом. Для повышения эффективности времени отбора применяются различные экспресс-методы. Данные методы основаны на использовании индикаторов, позволяющих быстро выявлять клетки с требуемыми свойствами. Такими индикаторами могут быть фенотипические, генетические или биохимические характеристики. Широко используются индикаторные селективные чашки, которые позволяют визуально дифференцировать мутанты по цвету колоний и проводить первичный скрининг множества фенотипов в пределах одной популяции. Для выявления активных продуцентов лимонной кислоты (ЛК) успешно используются селективные среды с соответствующими индикаторами [52]. Уровень биосинтетической активности оценивается по размеру и интенсивности окраски зон вокруг колоний. В некоторых случаях добавляются субстраты, изменяющие прозрачность среды, и наблюдается появление характерных прозрачных зон вокруг наиболее активных продуцентов. Так выращивают колонии на агаровых чашках с добавлением мела. По величине прозрачного пятна, образовавшегося в результате растворения мела синтезированной ЛК, судят о биосинтетической активности колонии [53].

Как правило, все методы отбора положительных мутантов основываются на учете ауксотрофности, оценке активности отдельных ферментов и сводятся к выбору среды для отбора необходимых вариантов.

Таким образом, получения штаммов мутантов и отбор активных продуцентов ЛК – одна из основных задач в условиях постоянно возрастающей потребности в этой кислоте. Исходя из литературных данных, наиболее ценные результаты получены при использовании для мутагенной обработки комбинаций из различных мутагенов рентгеновскими лучами и химическим мутагенезом либо в результате многократной обработки и путем многоступенчатого отбора.

1.7 Метаболизм лимонной кислоты у *A. niger*

С 1930-х годов, когда были установлены условия культивирования и оценено влияние различных компонентов субстрата для нужд промышленного производства, биохимический механизм накопления лимонной кислоты *A. niger* вызывает научный интерес. Несмотря на многочисленные модели, предложенные с 1930-х годов для объяснения способности *A. niger* накапливать лимонную кислоту, многие аспекты биохимических превращений остаются невыясненными. Исследования, направленные на понимание метаболических путей и свойств ферментов у *A. niger*, сделали его самым изученным нитевидным грибом [54].

Способность некоторых штаммов *A. niger* биосинтезировать лимонную кислоту определяется генотипом при обеспечении соответствующих условий культивирования, а их контроль позволяет достигать высоких показателей выхода процесса [55].

Во время трофофазы, на стадии роста мицелия *A. niger*, происходит поглощение гексоз или других углеводов через гликолиз и пентозофосфатный путь. Участие пентозофосфатного пути в углеводном обмене незначительно и значительно снижается во время образования лимонной кислоты – идиофазы [56].

При попадании в клетку глюкоза подвергается фосфорилированию, превращаясь в глюкозо-6-фосфат. Этот шаг катализируется гексокиназой и глюкокиназой [57]. Активность гексокиназы сильно ингибируется трегалозо-6-фосфатом. Для повышения эффективности биосинтеза лимонной кислоты был заблокирован ген TPSA, отвечающий за экспрессию трегалозо-6-фосфат синтазы [3, с. 27].

Следующим этапом гликолиза является изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат. Эта реакция катализируется фосфоглюкозоизомеразой. После реакции изомеризации происходит реакция фосфорилирования, катализируемая фосфотриоксикиназой, в результате этой реакции фруктозо-6-фосфат превращается во фруктозо-1,6-бисфосфат. Активность фосфотриоксикиназы ингибируется высокой концентрацией АТФ, что приводит к снижению ее сродства к фруктозо-6-фосфату. Это означает, что активность фосфотриоксикиназы увеличивается при снижении энергетического заряда клетки [58]. Ингибиторами фосфотриоксикиназы также являются высокие

концентрации марганца, цитрата и фосфоенолпирувата. Стимулирующее действие на активность фосфофруктокиназы оказывают NH_4^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} и аденозинмонофосфат (АМФ) [59].

Первый этап третьего этапа гликолиза – это превращение 3-фосфоглицеральдегида в 1,3-бисфосфоглицерат. Этот процесс катализируется 3-фосфоглицеральдегиддегидрогеназой и включает окисление альдегида с участием NAD^+ с образованием карбоновой кислоты и образованием 1,3-бисфосфоглицерата. На следующем этапе гликолиза фосфоглицерат киназа катализирует перенос фосфатной группы с 1,3-бисфосфоглицерата, образуя АТФ и 3-фосфоглицерат. Заключительный этап гликолиза включает превращение 3-фосфоглицерата в пируват, сопровождающееся образованием АТФ. На этом этапе ключевым ферментом является пируват киназа, которая катализирует необратимый перенос фосфатной группы на АТФ [60, 61].

В гликолитическом пути глюкоза превращается в две молекулы пирувата. Пируват превращает предшественники, такие как цитрат, оксалоацетат и ацетил-КоА. Оксалоацетат образуется путем карбоксилирования пирувата, катализируемого пируваткарбоксилазой. Во время этой реакции *A. niger* потребляет CO_2 , образующийся во время образования ацетил-КоА [55, с.252]. Затем пируват транспортируется в митохондрию, где он подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА в необратимой реакции, катализируемой пируватдегидрогеназой. Реакция образования ацетил-КоА из пирувата служит мостом между гликолитическим путем и циклом лимонной кислоты. Цикл лимонной кислоты происходит в матриксе митохондрий и начинается с конденсации оксалоацетата, ацетил-КоА и H_2O с образованием цитрата и КоА. Ферментом, катализирующим эту реакцию, является цитратсинтаза. Впоследствии цитраты претерпевают изомеризацию в изоцитрат посредством реакций, катализируемых аконитазой [62].

Ранее считалось, что накопление лимонной кислоты обусловлено ингибированием ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот. Однако современные исследования показали, что активность данных ферментов сохраняется, а накопление лимонной кислоты является следствием перераспределения метаболических потоков. В настоящее время установлено, что процесс обусловлен сочетанием высокого гликолитического потока, ограничения последующих стадий ЦТК и активного транспорта цитрата из митохондрий, что приводит к его накоплению в культуральной среде [3, с.29].

Накопление лимонной кислоты связано с активностью транспортеров трикарбоксилата, которые конкурируют с аконитазой за цитраты. Сродство транспортера трикарбоксилата к цитрату значительно выше, чем у аконитазы. Следовательно, цитраты высвобождаются из митохондрий, не ингибируя цикл Кребса. Транспорт цитратов трикарбоксилатными переносчиками осуществляется путем обмена с цитозольным малатом. Следовательно, малат можно считать потенциальным фактором, вызывающим накопление лимонной

кислоты, поскольку увеличение его концентрации предшествует накоплению цитратов [54, с. 191].

Таким образом, биохимический механизм накопления лимонной кислоты *A. niger* остается сложным, однако современные исследования приближают нас к более глубокому пониманию этого процесса, что открывает перспективы для оптимизации промышленного производства этого ценного продукта.

1.8 Методы и условия культивирования

На сегодня около 90 % мирового производства лимонной кислоты получают методом глубинной ферментации (SMF). Этот метод осуществляется в резервуарных биореакторах из коррозионностойкой стали, оснащенных системами аэрации и перемешивания [63].

Преимущества и недостатки различных методов культивирования, используемых при биосинтезе лимонной кислоты, представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Преимущества и недостатки различных методов культивирования, используемых при биосинтезе лимонной кислоты *A. niger*.

Тип ферментации	Параметры процесса	Преимущества процесса	Недостатки процесса
Поверхностно-жидкостная ферментация (LSF)	Продолжительность процесса: 8-12 дней.	Простота эксплуатации, энергоэффективность	Длительный производственный цикл, чувствителен к загрязнению другими микроорганизмами, требует больших производственных площадей, выделяет большое количество тепла, производство в малых и средних промышленных масштабах [10, с. 732].
Твердофазная ферментация (SSF)	Продолжительность процесса 4 дня	Технически и технологически простота, низкая стоимость подложки, энергоэффективность, низкий риск загрязнения	Трудности в контроле параметров процесса (Рн, температура, влажность), высокая загрязненность продукта, высокая стоимость приобретения продукта [54, с.193].
Глубинная ферментация (SMF)	Продолжительность процесса 4 дня	Возможность контролировать параметры процесса, низкие производственные затраты, простота поддержания стерильности условий.	Чувствительность к ингибирующему воздействию микроэлементов [63, с.142].

В 1910-е годы производство лимонной кислоты осуществлялось с использованием родов *Penicillium* и *Aspergillus* методом твердофазной

ферментации (SSF). В 1948 году Shu и Johnson разработали метод глубинной ферментации с использованием *A. niger* [64].

Глубинная ферментация (SMF) требует более сложного оборудования и строгого контроля технологических параметров, однако обеспечивает более высокую производительность и максимальный выход продукта. При этом данный способ культивирования уменьшает расходы на обслуживание, снижает потребность в рабочей силе, характеризуется стабильностью процесса и меньшей чувствительностью к изменениям состава питательной среды, что позволяет использовать различные субстраты и эффективно контролировать условия процесса. [65]

Глубинная ферментация (SMF) в основном проводится в периодическом режиме [66], хотя в промышленной практике также используются непрерывные системы. Кроме того, для оптимизации в лабораторных условиях часто применяется метод культивирования в колбах с встряхиванием.

Выбор источника углерода существенно влияет на выход лимонной кислоты. В промышленной практике в качестве субстрата чаще всего используют мелассу из сахарного тростника и свеклы. Ряд исследований посвящен определению оптимальных концентрации углеводов в культуральной среде. Установлено, что максимальный выход лимонной кислоты достигается при содержании сахара около 10 % (по массе), тогда как оптимальная концентрация глюкозы составляет 7,5 %. При снижении концентрации сахара ниже 2,5 % синтез лимонной кислоты не наблюдается. Также показано, что увеличение концентрации сахара с 1% до 14 % приводит к удлинению лаг-фазы роста с 12 до 18 часов и снижению скорости роста примерно на 20 %. Полученные данные указывают на необходимость оптимизации условий культивирования для достижения максимального выхода лимонной кислоты [67-68].

Таким образом, глубинная ферментация (SMF) с использованием *A. niger* по-прежнему остается основным методом промышленного производства лимонной кислоты. Это обусловлено возможностью точного контроля технологических параметров, низким затратам и стерильности процесса, несмотря на чувствительность к составу микроэлементов.

1.9 Факторы, влияющие на производство лимонной кислоты

Производство лимонной кислоты можно улучшить за счет оптимизации параметров ферментации, таких как начальная концентрация субстрата, начальный pH, концентрация питательных веществ, скорость мешалки, период инкубации, температура ферментации.

Особое внимание уделяется источникам углеводов, как ключевым элементам для получения высоких выходов лимонной кислоты.

Источники углеводов для биосинтеза лимонной кислоты. Поиск и оптимизация субстратов для биосинтеза лимонной кислоты с помощью *A. niger* продолжают оставаться предметом интенсивных исследований [69-71]. Основными источниками углерода для биосинтеза лимонной кислоты служили

простые сахара, такие как сахароза, глюкоза и фруктоза. Эти моносахариды и дисахариды легко метаболизируются грибом и дают высокие выходы продукта [72]. Полисахариды, такие как крахмал, требуют предварительной ферментативной гидролизации, чтобы получить мономеры сахаров, пригодные для ферментации. Медленный гидролиз полисахаридов из-за низкой активности ферментов в кислой среде может стать лимитирующим фактором процесса.

В исследованиях показано [73], что сахароза предпочтительнее глюкозы, так как она быстро гидролизруется экзоферментами грибов при низком pH. Однако использование чистого сахара связано с высокими затратами, что стимулирует промышленное производство на основе дешевых и возобновляемых источников углерода, таких как отходы сельскохозяйственной промышленности. Превосходство сахарозы над глюкозой и фруктозой было продемонстрировано Gupta и др. [74]. Сахароза имеет относительно низкую молекулярную массу и легко переносится в микробные клетки для гидролиза внутриклеточными ферментами. Это основная причина использования субстрата на основе сахарозы в производстве лимонной кислоты. Однако использование чистого сахара в промышленном производстве лимонной кислоты связано с высокими затратами, поскольку стоимость сырья часто превышает цену полученного продукта [75]. В связи с этим в промышленной практике производства лимонной кислоты с участием *A. niger* в качестве субстратов преимущественно используют дешёвые и возобновляемые источники углеводов [76].

Экологические ограничения, а также высокие затраты на контроль и предотвращение загрязнения окружающей среды усиливают интерес к использованию отходов и промышленных стоков в биосинтезе лимонной кислоты. В качестве альтернативных субстратов в литературе описаны различные побочные продукты перерабатывающих производств, включая барду сахарной свеклы [77], барду сахарного тростника [78], целлюлозосодержащее сырьё [79], липиды, сыворотка, фруктовые выжимки [11, с. 78], инулин [80], а также крахмалосодержащее сырьё растительного происхождения [81-83].

Несмотря на высокий интерес к подобным субстратам, их практическое использование ограничено рядом факторов. Присутствующие в отходах ингибирующие компоненты (например, липиды) способны подавлять рост и метаболическую активность *A. niger*. Кроме того, несбалансированность питательного состава, характерная для сыворотки и фруктовых выжимок, приводит к нарушению оптимального соотношения C/N, вследствие чего усиливается синтез биомассы и снижается образование целевого продукта. Совокупность этих факторов уменьшает экономическую эффективность применения промышленных побочных продуктов в процессах биосинтеза лимонной кислоты.

Традиционным сырьём для промышленного производства лимонной кислоты с участием *A. niger* остаётся тростниковая и свекловичная патока, что обусловлено её низкой стоимостью и высокой доступностью. Патока содержит около 50 % углеводов (сахарозу, глюкозу и фруктозу), однако её химический

состав вариативен и зачастую неоднороден, что усложняет контроль биосинтеза. Для стабилизации качества сырья патока проходит предварительные обработки с использованием ферроцианида, соляной кислоты, фосфата трёхкальциевого, оксалата аммония, дигидрофосфата аммония, извести, а также процессы фракционирования [84].

Исследование Е. Е. Książek и соавторов (2023) направлено на повышение эффективности биосинтеза лимонной кислоты штаммом *A. niger* PD-66 за счет использования отработанного глицерина – доступного побочного продукта производства биодизеля, выступающего альтернативой дорогостоящему традиционному сырью. В ходе работы было установлено, что концентрация отработанного глицерина и нитрата аммония критически влияет на конечный выход продукта и скорость процесса. Полученные результаты доказывают, что вторичное сырье производства биодизеля является перспективным и экологичным субстратом для промышленного получения лимонной кислоты. [85].

Несмотря на очевидный потенциал отработанного глицерина как источника углерода, в научной литературе указывается на ряд существенных ограничений, которые препятствуют его широкому использованию в качестве основного субстрата. Интерес к глицерину у исследователей долгое время оставался довольно низким из-за выраженного ингибирующего действия примесей (прежде всего метанола и щелочей), а также катаболитной репрессии, которую глицерин вызывает у *A. niger*. Эти факторы заметно замедляют рост мицелия и существенно снижают эффективность биосинтеза лимонной кислоты.

В поисках доступной и экономичной альтернативы дорогостоящим традиционным сахарам (сахарозе и глюкозе) и трудноперерабатываемому глицерину ученые всё чаще обращают внимание на богатые крахмалом сырьевые материалы и различные побочные продукты сельскохозяйственного производства.

В последние годы наблюдается явная тенденция к использованию крахмальных материалов растительного происхождения – картофельного, кукурузного и пшеничного крахмала. Эти субстраты легко доступны и относительно недороги, особенно при предварительной обработке путем ферментативного гидролиза, что делает их перспективными для промышленного производства лимонной кислоты. В результате гидролитического разложения полисахаридов образуются легкоусвояемые моносахариды, главным образом глюкоза, что делает такие субстраты перспективными для крупномасштабного производства лимонной кислоты. Кукурузный крахмал стал наиболее широко используемым субстратом; после интенсивной ферментативной обработки он обеспечивает высокую концентрацию доступных углеводов, снижая стоимость сырья [86].

Процесс ферментативного гидролиза крахмала включает применение ферментов α -амилазы, амилоглюкозидазы, изоамилазы или пуллулаказы, обеспечивающих ступенчатый переход от макромолекулярных цепей к низкомолекулярным фракциям [87].

В Китае, который является крупнейшим производителем лимонной кислоты (около 70 - 80 % от общего производства в мире), наиболее часто используемым сырьем для производства лимонной кислоты является гидролизат кукурузного крахмала [88]. Особенностью их применения в качестве источников углеводного питания для микробных продуцентов лимонной кислоты является то, что в процессе ферментации наряду с основным продуктом происходит индуцированный биосинтез ферментов, катализирующих гидролиз полисахаридов в кислой среде [89].

Расход углеводного сырья при производстве лимонной кислоты существенно снижается при переходе от свекловичной мелассы к гидролизатам кукурузного и пшеничного крахмала. Кроме того, применение гидролизатов крахмала позволяет не только снизить расход сырья, но и существенно упростить технологический процесс. При этом отпадает необходимость в использовании токсичных реагентов, таких как гексацианоферрат калия и оксалат аммония.

Важным преимуществом является отсутствие щавелевой кислоты в культуральной жидкости при ферментации крахмальных гидролизатов. Это открывает возможность выделения лимонной кислоты бесцитратным способом, что полностью устраняет проблему утилизации таких традиционных отходов классического производства, как фильтрат цитрата кальция и гипсовый шлам. Одновременно значительно сокращается объём сточных вод.

В газовых выбросах исключаются вредные вещества – цианиды, хлор, сернистый ангидрид и аэрозоль серной кислоты. В результате экологическая нагрузка на окружающую среду заметно снижается.

Единственным потенциальным отходом производства остаётся мицелий гриба-продуцента. Его можно эффективно использовать в качестве белковой кормовой добавки для сельскохозяйственных животных либо перерабатывать путём гидролиза в хитин-глюкановый комплекс [90].

Процесс производства лимонной кислоты из гидролизатов крахмалов включает три основных этапа. На первом этапе проводится предварительная подготовка сырья, включающая его сжижение и ферментативное осахаривание, в результате чего макромолекулярные полисахариды превращаются в низкомолекулярные углеводы, пригодные для последующего микробиологического потребления. На втором этапе осуществляется биоконверсия полученных сахаров (глюкозы, фруктозы, частично сахарозы) в лимонную кислоту с использованием микроорганизмов *A. niger* в процессе глубинного брожения. На заключительном этапе продукция лимонной кислоты извлекается из культурального бульона посредством процессов разделения – осаждения, экстракции, адсорбции или комбинированных методов очистки и кристаллизации [63, с.144].

Авторами [91] были проведены исследования по оптимизации процессов производства лимонной кислоты из гидролизата крахмала сладкого картофеля (SPSH) с использованием *A. niger*. Эта работа показала, что SPSH может служить альтернативным источником углерода для производства лимонной кислоты.

Статистическая модель предсказала самую высокую концентрацию кислоты 83,01 г/л.

Suzuki A и соавторы (1996) в своей работе продемонстрировали использование нативных кукурузного и картофельного крахмалов в качестве субстрата для производства лимонной кислоты. Авторы пришли к выводу, что данный метод может быть весьма перспективным для разработки практических систем прямого производства лимонной кислоты из крахмалов. В результате исследования было показано, что устойчивый к 2-дезоксиглюкозе мутантный штамм *A. niger* C192 способен продуцировать 107,4 г/л лимонной кислоты при использовании кукурузного крахмала и 92,9 г/л лимонной кислоты при использовании картофельного крахмала. Это открывает новые возможности для повышения эффективности биотехнологических процессов, ориентированных на прямое использование полисахаридных субстратов [92].

В исследованиях Mourya и др. (2000) рассматривалась возможность использования гидролизата кукурузного крахмала, для экономически эффективного производства лимонной кислоты. В ходе экспериментов был изучен мутантный штамм *A. niger* UE-1, который продемонстрировал значительно более высокий уровень продукции лимонной кислоты по сравнению с родительским штаммом *A. niger* ITCC-605. В частности, максимальный выход лимонной кислоты, достигнутый мутантным штаммом, превысил продукцию родительского штамма примерно в 130 раз, что подтверждает высокую перспективность использования мутантного штамма в биотехнологических процессах с целью повышения производительности [93].

Несмотря на значительное количество исследований по использованию крахмалосодержащего сырья, остаются нерешёнными вопросы повышения эффективности биоконверсии за счёт подбора оптимизированных гидролизатов с заданным декстрозным эквивалентом, а также создания высокоактивных штаммов, адаптированных к таким субстратам. В этой связи актуальной является разработка комплексных решений, включающих как совершенствование субстрата, так и оптимизацию микроорганизмов и условий культивирования.

Влияние источников азота на биосинтез лимонной кислоты. Азот, как известно, играет ключевую роль в процессе роста *A. niger* и биосинтеза лимонной кислоты как в условиях глубоинной, так и твердофазной ферментации. В частности, концентрация и источник азота оказывают фундаментальное влияние на эффективность данных процессов. Наиболее предпочтительными источниками азота, согласно литературным данным, являются аммонийные соли, включая нитрат аммония, сульфат аммония и хлорид аммония. Также значительное внимание уделяется органическим источникам, таким как мочевины, пептон и дрожжевой экстракт, которые часто оказывают стимулирующее влияние на биосинтез лимонной кислоты [65, с. 864].

Исследования Almousa с соавторами (2018) показали, что пептон – один из самых эффективных органических источников азота для штамма *Aspergillus niger*. При его использовании накапливали от 49,78 - 56,07 мг лимонной кислоты на 10 мл среды. Органические источники азота не только способствуют

активному росту мицелия, но и заметно усиливают биосинтез лимонной кислоты. С неорганическими (небелковыми) источниками азота всё сложнее – результат сильно зависит от конкретного штамма. Например, добавление хлорида аммония значительно подавляло образование лимонной кислоты и ее выход падал до 3,65–5,53 мг/10 мл [94].

Среди аммониевых солей лучше всего показала аммонийная селитра. Она подкисляет среду (до значений pH ниже 2,0), создавая тем самым благоприятные условия для интенсивного накопления лимонной кислоты [95, 96].

В то же время стоит отметить, что ограничение азотного питания во время культивирования *A. niger* оказывает двойное действие: оно заметно тормозит прирост биомассы, но одновременно стимулирует интенсивный биосинтез лимонной кислоты. Именно на этом метаболическом сдвиге и построено большинство промышленных технологий. При этом для достижения максимальной продуктивности уровень аммония в среде рекомендуется поддерживать в пределах 2-3 мМ·г⁻¹ биомассы [97].

Ограничение азота необходимо, так как при концентрации более 0,25% накапливается щавелевая кислота. Высокая концентрация азота также увеличивает потребление сахара и рост грибов, а также уменьшает количество произведенной лимонной кислоты [98].

Сульфат аммония является предпочтительным выбором соли, поскольку он не продуцирует нежелательную щавелевую кислоту, одновременно снижая pH среды по мере того, как потребляется соль. Максимальный выход лимонной кислоты в лабораторном перемешиваемом ферментере достигался с концентрацией нитрата аммония, поддерживаемой на уровне 0,2% [67, с.20].

Kristiansen и Sinclair, используя непрерывную культуру, также пришли к выводу, что ограничение азота имеет важное значение для производства лимонной кислоты. Так, было обнаружено, что в условиях ограничения азота *Aspergillus foetidus* быстро продуцирует лимонную кислоту. Процесс был изучен в диапазоне скорости разбавления от 0,04 до 0,21 ч⁻¹. Установлено, что максимальная производительность составила 0,43 кг/м³/ч при скорости разбавления 0,075 ч⁻¹. Небольшие корректировки условий культивирования могут существенно повысить продуктивность. Как сухой вес, так и концентрация лимонной кислоты увеличивались с уменьшением скорости разбавления [99].

Таким образом, выбор и оптимизация источников азота играют ключевую роль в процессе биосинтеза лимонной кислоты *A. niger*. Тип и концентрация азотного источника оказывают значительное влияние на производство лимонной кислоты. Наиболее предпочтительными источниками азота являются нитрат аммония и сульфат аммония. Оптимальная концентрация азота составляет около 0,2%. Ограничение азота увеличивает выработку лимонной кислоты. Необходимо правильно добавлять азот, чтобы максимизировать производство лимонной кислоты.

Влияние источников фосфора на биосинтез лимонной кислоты. Помимо азота и источника углерода, фосфор также играет значительную роль в процессе производства лимонной кислоты. Присутствие фосфора в питательной среде

оказывает существенное влияние на выход лимонной кислоты. В частности, сообщалось, что наиболее подходящим источником фосфора является дигидрофосфат калия. Так, согласно исследованиям Shankaranand и Lonsane (1994) концентрация фосфора в диапазоне от 0,5 до 5,0 г/л в среде способствовала максимальному производству лимонной кислоты [100].

Фосфаты оказывают существенное влияние на рост и метаболизм *A. niger*. Однако его влияние на биосинтез лимонной кислоты до конца не изучено. Установлено, что низкие концентрации фосфатов в среде способствуют накоплению лимонной кислоты, тогда как избыток приводит к образованию других органических кислот, хуже поглощать углекислый газ и переключается на интенсивный рост мицелия. Показано, что фосфаты в первую очередь влияют на активность ферментов, а не на уровень экспрессии генов. Именно поэтому их концентрация в среде имеет решающую роль на различных стадиях ферментации [101].

Роль микроэлементов и морфологические особенности мицелия в биосинтезе лимонной кислоты

Микроэлементы играют особенно важную роль в биосинтезе лимонной кислоты у гриба *A. niger*. Они влияют на рост культуры, ее физиологическое состояние и продуктивность. Наиболее значимыми являются марганец, цинк, медь и железо.

Для получения высоких выходов лимонной кислоты, особенно в условиях глубинной ферментации, требуется контроль содержания микроэлементов в питательной среде. Даже незначительные отклонения от оптимальных концентраций приводят к изменению метаболизма культуры и ухудшению роста мицелия и заметно снизить выход лимонной кислоты [55, с.102].

Магний выступает кофактором во многих ферментативных реакциях, которые важны для роста *Aspergillus niger* и биосинтеза лимонной кислоты. Согласно исследованиям, оптимальная концентрация сульфата магния в питательной среде должна находиться в пределах 0,020-0,025%. Именно в этом диапазоне достигается максимальный выход лимонной кислоты [87, с.115].

Марганец также оказывает влияние на синтез лимонной кислоты. Он участвует в формировании клеточной стенки, споруляции и образовании вторичных метаболитов. Однако здесь важно соблюдать баланс: избыток марганца (около 10 мг/дм³) заметно снижает эффективность процесса, а сильный дефицит (менее 3 мкг/дм³) тоже ухудшает продуктивность [55, с.103].

Железо, наоборот, нужно держать в культуральной среде на низком уровне. Согласно исследованиям, оптимальная концентрация составляет около 1 мг/л. Если его содержание превышает этот порог, гриб начинает активно образовывать щавелевую кислоту, что заметно снижает выход лимонной кислоты [87, с.116].

Кроме того, ионы меди играют роль в подавлении негативного воздействия избытка железа, одновременно ингибируя ионы марганца. Оптимальная концентрация медного купороса в среде составляет 78 мг·дм⁻³, что также влияет на морфологические особенности мицелия и конечный выход лимонной кислоты

[102]. Присутствие меди в различных концентрациях влияет на морфологию мицелия. Следовательно, присутствие микроэлементов в оптимальных концентрациях определяет формирование мицелия с такой структурой, которая обеспечивает высокую эффективность биосинтеза лимонной кислоты [55, с. 248].

Морфология мицелия тесно связана с его продуктивностью. Многочисленные исследования показывают, что форма мицелия – компактные гранулы или свободно растущие нити – в значительной степени зависит от условий культивирования, и в первую очередь от концентрации микроэлементов. При этом важно различать макро- и микроморфологию гриба. Как установлено в ряде работ, наиболее благоприятной для высоких выходов лимонной кислоты является форма компактных гранул диаметром менее 0,5 мм [103 - 105].

Таким образом, целенаправленное регулирование содержания микроэлементов и контроль морфологических особенностей мицелия *Aspergillus niger* открывают дополнительные возможности для существенного повышения эффективности производства лимонной кислоты.

Влияние уровня инокулята на биосинтез лимонной кислоты. Уровень инокулята (количество вносимых спор) является одним из важнейших факторов, определяющих ход и результативность процесса ферментации лимонной кислоты. В прошлом было предпринято немало попыток стандартизировать инокулят для глубинной ферментации, поскольку именно от его качества и количества во многом зависят скорость начала ферментации, морфология мицелия и конечный выход целевого продукта.

Согласно исследованиям Van Suijdam и его коллег (1980), гранулы образуются только при использовании инокулята с размерами менее 3×10^{11} спор/м³. Однако, несмотря на это, влияние инокулята на морфологию мицелия в ферментационной среде ранее оценивалось в основном в контексте наличия или отсутствия гранул и их характеристик, что было связано с отсутствием адекватного метода контроля морфологии мицелия во время брожения [106].

Результаты работы Khattab и др. (2017) показывают, что максимальное количество лимонной кислоты было достигнуто при использовании 1% инокулята. При этом, согласно их данным, увеличение уровня инокулята приводит к снижению производства лимонной кислоты, что может быть объяснено чрезмерным ростом мицелия, который увеличивает вязкость среды, в результате чего снижается продукция лимонной кислоты [107].

Аналогичные результаты были получены Ali и его коллегами (2002), которые также отметили, что максимальная продукция лимонной кислоты (96,86 г/л) была достигнута при концентрации инокулята 1 % [108]. В то же время Maharani и др. (2014), сообщили о наибольшем количестве лимонной кислоты, полученном при концентрации инокулята 5,0 % (83,24 г/л) [109].

Согласно результатам исследований, наибольший выход лимонной кислоты достигается при использовании спор возрастом менее семи дней. Более старые споры, как правило, начинают потреблять уже образовавшуюся лимонную кислоту ещё до завершения ферментации, что негативно сказывается

на конечном выходе продукта. Увеличение количества инокулированных спор на начальном этапе способствует росту продуктивности. Однако в дальнейшем это приводит к быстрому уплотнению (скупченности) мицелия, повышенному расходу сахара на образование биомассы и, как следствие, к снижению накопления лимонной кислоты. [11, с.70].

Влияние спиртов на производство лимонной кислоты. Изучение воздействия различных спиртов – метанола, этанола, изопропанола и метилацетата – на биосинтез лимонной кислоты с помощью *A. niger* демонстрирует, что их влияние носит выраженный дозозависимый и видоспецифичный характер. В низких концентрациях некоторые из них могут выступать стимуляторами процесса, тогда как более высокие дозы часто проявляют ингибирующий эффект. Оптимальные концентрации метанола и этанола зависят от штамма и состава среды, причем оптимальный диапазон составляет обычно 1-3%. Влияние метанола и этанола на процесс производства лимонной кислоты было тщательно изучено многими исследователями, среди которых Farouk (1978), Manonmani и Sreekantiah (1987), Georgieva и др. (1992), а также Dasgupta и др. (1994) [110-113].

Этанол, добавляемый в питательные среды, подавляет рост мицелия и спорообразование, снижает потребление субстрата, увеличивает проницаемость клеточной мембраны и влияет на повышение активности цитратсинтазы, в то время как активность аконитазы, наоборот, снижается [114]. В отличие от этанола, метанол не усваивается *A. niger* и не превращается в ацетил-КоА, который является предшественником цикла Кребса. Механизм взаимодействия метанола с биосинтезом лимонной кислоты в синтетических и природных средах еще не до конца изучен. Известно, что метиловый спирт в высокоочищенных средах нарушает метаболические процессы и рост биомассы, что приводит к снижению выработки лимонной кислоты [115, 116]. Этанол, в свою очередь, способен превращаться в ацетил-КоА, действуя как предшественник лимонной кислоты, и выступает в качестве источника углерода. Снижение роста и производства лимонной кислоты при более высоких уровнях этанола может быть связано с его токсическими эффектами.

В исследовании, проведенном Ali и Naq (2005) [117], среди четырех различных применяемых спиртов 3,0 % этанол проявил наибольшую стимуляцию выработки лимонной кислоты. При этом максимальная продукция кислоты наблюдалась при добавлении 3,0% спирта; при превышении этого уровня наблюдалось снижение продуктивности. Результаты показали, что рост грибов был очень медленным при высоких уровнях этанола. При добавлении этанола через 6 часов после инокуляции конверсия сахаров в лимонную кислоту составила 32 %. Однако добавление этанола через 18 и 24 часа роста не приводило к повышению продуктивности лимонной кислоты. В то время как 2,0 % метанол незначительно увеличивал выход лимонной кислоты, было установлено, что этанол является более эффективным стимулятором для производства лимонной кислоты, несмотря на существующие сообщения о том, что метанол может выступать в роли стимулятора [118].

Таким образом, выбор оптимального спирта и его концентрации имеет важное значение для достижения максимальной производительности лимонной кислоты при использовании *A. niger*. Этанол часто предпочтителен благодаря своему потенциалу как источника углерода и стимулирующего эффекта на синтез лимонной кислоты, тогда как метанол и другие спирты могут оказывать нежелательные эффекты на биомассу и метаболические процессы гриба.

Влияние pH среды на морфологию мицелия и биосинтез лимонной кислоты.

Значение pH является критическим фактором, влияющим на прорастание спор и продукцию лимонной кислоты. Для успешного прорастания спор pH должен быть выше 5, в то время как для процесса ферментации лимонной кислоты требуется низкий уровень pH субстрата ($\text{pH} \leq 2$). Большинство грибковых мицелиев, включая *A. niger*, развиваются в диапазоне pH от 3 до 6, при этом их метаболическая активность во многом зависит от pH питательной среды [119].

При производстве лимонной кислоты с использованием *A. niger* в условиях глубинной и поверхностной ферментации применяется диапазон pH от 2 до 6. Низкий уровень pH не только снижает риск загрязнения культуры другими микроорганизмами, но также препятствует образованию побочных продуктов, таких как щавелевая и глюконовая кислоты [120]. Повышение pH до 4,5 может привести к значительному снижению эффективности производства лимонной кислоты, достигая уровня до 80% [121].

Кроме того, pH питательной среды оказывает влияние на морфологию мицелия *A. niger*. При значениях pH в диапазоне 2,0-2,2 мицелий *Aspergillus niger* формирует мелкие агрегаты с короткими гифами, что создаёт наиболее благоприятные условия для биосинтеза лимонной кислоты.

Снижение pH до 1,6 приводит к нарушению морфологического развития мицелия и заметному падению продуктивности процесса. В то же время при pH около 3,0 мицелий образует более крупные агрегаты, что способствует переключению метаболизма в сторону накопления щавелевой кислоты [3, с. 34].

Таким образом, строгий контроль и поддержание оптимального уровня pH среды являются одним из определяющих факторов успешного производства лимонной кислоты.

Скорость перемешивания в производстве лимонной кислоты. Среди гидродинамических факторов особое место занимает скорость перемешивания. Этот параметр играет ключевую роль в обеспечении эффективного массо- и теплообмена в ферментере и оказывает многогранное влияние на метаболизм продуцента.

Скорость перемешивания определяет дисперсию мицелия гриба, уровень растворённого кислорода в среде и активность важнейших ферментов цикла Кребса – цитратсинтазы, аконитазы и изоцитратдегидрогеназы. Следует подчеркнуть, что активность цитратсинтазы уменьшается с увеличением скорости перемешивания, в то время как активность аконитазы и изоцитратдегидрогеназы, напротив, возрастает [87, с.117].

Кроме того, интенсивное перемешивание способствует развитию грибкового мицелия в виде коротких разветвленных гифов, что характеризуется высоким уровнем производства лимонной кислоты. Данное явление также ведет к фрагментации мицелия и его повторному росту. Это важно, поскольку метаболически неактивные и сильно вакуолизированные фрагменты мицелия более подвержены фрагментации, что, в свою очередь, приводит к образованию новых мицелиальных волокон *A. niger* [122].

Исследования показывают, что влияние скорости перемешивания на рост и продуктивность трех штаммов *A. niger* было описано Ujsova и др. (1980). Более высокие скорости перемешивания приводили к образованию более толстых и разветвленных нитей, хотя наблюдалось падение производительности [123]. Аналогичный эффект был зафиксирован при ферментации пенициллина [124].

Более высокие скорости перемешивания могут вызывать повреждение гифы, что, в свою очередь, приводит к снижению продуктивности, о чем сообщается во множестве исследований.

Mitard и Riba (1988) также изучали влияние скорости перемешивания на рост и морфологию *A. niger*, и было установлено, что существует зависимость между удельной скоростью роста организма и разрывом мицелиальных агрегатов. По мере разрушения агрегатов удельная скорость роста снижалась, однако она вновь возрастала, когда освободившиеся нити продолжали расти. Это может объяснить более низкие удельные скорости роста, наблюдаемые при 500 об/мин в течение периода между 30 и 72 часами [125].

Таким образом, скорость перемешивания играет важную роль в производстве лимонной кислоты. Оптимальные параметры скорости перемешивания зависят от штамма *A. niger*, условий ферментации и типа биореактора. Тщательный контроль этих параметров является ключом к достижению максимальной выработки лимонной кислоты.

Влияние температуры на биосинтез лимонной кислоты. Температура является одним из критических факторов, определяющих эффективность процесса ферментации. Она существенно влияет на активность ферментов, системы переноса питательных веществ у микроорганизмов и, следовательно, на эффективность биосинтеза лимонной кислоты. Оптимальный температурный диапазон обычно лежит в пределах 28°C - 31°C. В частности, наибольшая эффективность процесса достигается именно при температуре 30°C [126].

Температуры выше 30°C оказывают негативное влияние на процесс биосинтеза. Они могут вызывать частичную денатурацию цитратсинтазы – ключевого фермента, ответственного за образование лимонной кислоты. В результате снижается накопление целевого продукта, замедляется рост биомассы и происходит переключение метаболизма в сторону образования щавелевой кислоты. Важно отметить, что культивирование при более низких температурах также снижает активность ферментов и замедляют скорость биосинтеза в целом [127].

Исследования Bhattacharjee и Baruah (2015) показали, что максимальный выход лимонной кислоты у *A. niger* достигается при температуре 30 °C. При

более низких температурах выход заметно снижается, что, по-видимому, связано с недостаточной активностью ферментов. В то же время повышение температуры выше 30 °С также приводит к падению продуктивности вследствие накопления побочных продуктов, в первую очередь щавелевой кислоты [128].

Таким образом, температура является одним из ключевых факторов, определяющих эффективность производства лимонной кислоты. Оптимальный температурный режим существенно зависит как от используемого штамма *A. niger*, так и от состава питательной среды.

1.10 Оптимизация условий ферментации

Оптимизация условий ферментации играет определяющую роль в разработке эффективных биотехнологических процессов. Основная цель оптимизации заключается в максимальном увеличении выхода целевого продукта, повышении его качества, сокращении продолжительности процесса и снижении общих затрат производства.

На протяжении последних нескольких десятилетий статистические методы планирования эксперимента прочно вошли в практику оптимизации ферментационных процессов. Их применяют как на этапе скрининга значимых факторов, так и на стадии поиска оптимальных условий для достижения максимального отклика [129]. Оптимизация с помощью статистически спланированных экспериментов представляет собой последовательный, поэтапный процесс [130].

При скрининге факторов, влияющих на образование метаболитов, особенно важно рассмотреть как можно больше переменных и объективно оценить степень их влияния. Для решения этой задачи широко используются методы Бокса-Бенкена и центральные композиционные планы (ЦКП). Эти подходы позволяют не только выявлять значимые факторы, но и оценивать эффекты их взаимодействия, что существенно повышает эффективность оптимизации и приближает процесс к реальным промышленным условиям. Эти методы преобразуют корреляции коэффициентов биопроцесса в математические модели, которые предсказывают потенциальное местоположение оптимума. В дальнейшем, после построения и оптимизации модели, проверяется предсказанный оптимум [131].

В исследовании, проведенном Lotfy и др. (2007), оптимизация процесса получения лимонной кислоты проводилась с использованием методов статистического планирования эксперимента. Для предварительного отбора значимых компонентов ферментационной среды применялся двухуровневый план Плэкета-Бермана. Для определения наилучших условий процесса была использована методология поверхности отклика (RSM) на основе трехуровневого плана Бокса-Бенкена. Была построена полиномиальная модель для описания взаимосвязи между тремя переменными (субстрат и концентрация инокулята) и выходом лимонной кислоты. При оптимальных условиях выход лимонной кислоты составил 87,81 %, что в 14 раз превышает показатель базовой среды. Для уточнения параметров ферментации (начальный pH, интенсивность

аэрации и температура) использовался пятиуровневый центральный композитный план. Оптимальные значения составили: pH – 4,0; скорость аэрации – 6500 мл/мин; температура – 31,5 °C [77, стр.3470].

В работе Dhillon и соавторов с помощью методологии поверхности отклика (RSM) была изучена оптимизация ключевых параметров – влажность среды и концентраций спиртов (этанола и метанола) при культивировании *A. niger*. Установлено, что влажность и метанол оказывают положительное влияние на выход лимонной кислоты. Максимальный результат был получен при повышенной влажности и добавлении спиртов – это позволило сохранить высокую эффективность ферментации на протяжении всего периода культивирования [132].

Каждый из таких методов имеет свои сильные и слабые стороны, поэтому выбор конкретного подхода всегда зависит от задач исследования и особенностей процесса.

1.11 Получение высокоочищенной лимонной кислоты

Получение высокоочищенной лимонной кислоты представляет собой сложный и многоступенчатый процесс, который осуществляется в ходе постферментационной стадии. В полученных растворах, помимо целевой кислоты, содержатся также глюконовая и щавелевая кислоты, остатки несброженных сахаров и минеральные соли. Для выделения лимонной кислоты из раствора ее связывают с гидроокисью кальция, что приводит к образованию труднорастворимого цитрата кальция, после чего лимонная кислота переводится в свободное состояние.

Выделение и очистка лимонной кислоты являются предметом серьезного внимания как в научных исследованиях, так и в промышленном производстве. Обычные методы постферментативного выделения и очистки органических кислот включают несколько последовательных процессов. Традиционно лимонная кислота очищается с помощью метода осаждения. В этом процессе гидроксид кальция (известь) добавляется в ферментированную среду, в результате чего образуется слаборастворимый цитрат кальция. Данная реакция сопровождается образованием значительного количества жидких стоков, содержащих минеральные кислоты и соли, а также накапливается большое количество твердых отходов, таких как гипс и отработанный уголь [133].

В настоящее время нашло широкое применение как эффективное средство сухой дезинфекции и стерилизации технологического оборудования и производственных помещений переработки сырья озонирование [134]. При воздействии озоновой водной струи на бактерии *B. atrophaeus* (ATCC 9372) выявлено его полное ингибирование. Выявлены морфологические изменения в клетках *E. coli*, обработанных озоном при 75 Вт в течение 2 мин. Обработанные клетки показали сильную цитоплазматическую деформацию и утечку материала бактериальной хромосомы. Результаты ясно демонстрируют потерю жизнеспособности бактериальных клеток после плазменной обработки [135].

Озон является одним из наиболее активных форм кислорода. Из-за синергетического эффекта кислотности и озона, кислая озоновая вода является очень эффективным средством стерилизации [136]. По качеству и некоторым техническим характеристикам современные озоновые стерилизаторы превосходят ультрафиолетовые, сухожаровые шкафы, паровые автоклавы, жидкостную и газовую стерилизацию.

Преимущества озона перед традиционными средствами дезинфекции, стерилизации - экологическая чистота, высокая окислительная способность, простота получения и использования, не повреждает объекты обработки [137, 138]. Характеризуется низкой температурой газа во время стерилизационного цикла (до 40 °C), имеет низкое энергопотребление (120 Вт при объеме стерилизационной камеры 10 литров), сравнительно небольшую длительность стерилизационного цикла. Предложены режимы применения озона оборудования - при концентрации озона 7,0 мг/м экспозиция 4 часа; при концентрации 25 мг/м - 2 часа. При обработке различной тары (пластмассовые и картонные коробки, ящики упаковочного материала и т.п.) оптимальной является концентрация озона около 0,5 г/м³ при кратковременных экспозициях. Эти режимы обработки предназначены для обеспечения эффективной дезинфекции или обеззараживания оборудования и тары с использованием озона при определенных концентрациях и временных интервалах экспозиции. При использовании озона особое внимание следует уделять строгому соблюдению всех рекомендаций по технике безопасности и промышленной санитарии.

В Японии, Австралии и Франции нормативные документы не устанавливают жёстких количественных ограничений на применение озона в качестве дезинфицирующего агента в пищевой промышленности. Хорошо известно, что антибактериальное действие озона в водной среде значительно выше, чем в воздухе.

Озон (O₃) – мощный окислитель и эффективное дезинфицирующее средство, способное уничтожать бактерии, вирусы и другие микроорганизмы. В водных системах он окисляет и разрушает клеточные стенки патогенов, проникая даже в труднодоступные места. Доза 200 ppm и расход 10 г/мин обеспечивают концентрацию озона, достаточную для надежной дезинфекции. Остаточная концентрация озона в 1 ppm после обработки обеспечивает дополнительный защитный эффект. Микроорганизмы, вымываемые потоком воды, подвергаются непосредственному воздействию озона и уничтожаются [139].

Таким образом, проведенный обзор демонстрирует необходимость дальнейшей оптимизации существующих технологий производства лимонной кислоты, а также разработки новых, экологически безопасных и экономически эффективных методов.

Выводы по разделу 1

Обзор литературы показал, что лимонная кислота является многофункциональным органическим соединением с широким промышленным

применением. Основным продуцентом в промышленном масштабе остаётся *Aspergillus niger*, продуктивность которого сильно зависит от состава питательной среды, температуры, pH, продолжительности ферментации и гидродинамических условий.

В последние годы активно исследуется возможность применения крахмалосодержащего сырья в качестве альтернативных субстратов, что снижает себестоимость и соответствует принципам циркулярной экономики.

Современные исследования направлены на повышение продуктивности штаммов, оптимизацию условий культивирования и разработку масштабируемых технологий. Это подтверждает актуальность темы и необходимость дальнейших исследований в данной области.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследования

Теоретические и экспериментальные исследования выполнены автором в соответствии с индивидуальным планом докторанта (рис. 4) и поставленными задачами.



Рисунок 4 – Блок-схема проведения исследований

Работы проводились в двух лабораториях НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина» (г.

Астана, Республика Казахстан): в лаборатории физико-химических исследований сельскохозяйственного сырья и химико - аналитических исследований в области глубокой переработки, а также в Инжиниринговом центре органических агротехнологий.

2.1.1 Сырьё и питательные среды

В качестве основных источников углерода использовались углеводсодержащие субстраты: нативный кукурузный крахмал (ГОСТ 32159–2013 «Крахмал кукурузный. Общие технические условия», производство ТОО «Жаркентский крахмало-паточный завод», г. Жаркент) и пшеничный крахмал (ГОСТ 31935–2012 «Крахмал пшеничный. Технические условия», производство ТОО «BioOperations», г. Тайынша).

2.1.2 Микроорганизмы – продуценты лимонной кислоты

В качестве продуцента лимонной кислоты использовался мутантный штамм *A. niger* R5/4, выделенный из почвенных образцов, собранных на территории сахарных и крахмалопаточных предприятий Республики Казахстан. Штамм депонирован в ДГП на ПХВ «Республиканская коллекция микроорганизмов» под номером F-RKM 0861.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение физико-химических свойств крахмалов

2.2.1.1 Влажность крахмалов определяли по ГОСТ Р 55802-2013 "Крахмал. Методы определения влаги

Метод основан на удалении влаги из навески крахмала при нагревании до постоянной массы и последующем определении потери массы в результате испарения воды.

Навеску крахмала массой 3-5 г помещали в предварительно высушенные и взвешенные бюксы, затем высушивали в сушильном шкафу при температуре 130 ± 2 °С в течение 1 ч. После охлаждения бюксы с навесками помещали в эксикатор, охлаждали до комнатной температуры и вновь взвешивали.

Массовую долю влаги (W, %) рассчитывали по формуле (1):

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (1)$$

где:

m_0 - масса пустого бюкса, г;

m_1 - масса бюкса с навеской до сушки, г;

m_2 - масса бюкса с навеской после сушки, г.

Результаты выражали с точностью до 0,01 %.

2.2.1.2 Определение содержания общей золы проводили по ГОСТ Р 55800-2013 "Крахмал. Метод определения общей золы"

Метод основан на прокаливании навески образца при высокой температуре до постоянной массы с целью полного удаления органических

веществ и последующего определения остатка неорганических минеральных соединений.

Навеску крахмала массой 2-5 г помещали в предварительно прокалённый и взвешенный фарфоровый тигель. Образец сначала подсушивали при температуре 100-105 °С до удаления влаги, затем тигель с навеской помещали в муфельную печь и прокаливали при температуре 575 ± 25 °С до получения белой или серовато-белой золы (в течение 4-5 часов). После охлаждения тигель помещали в эксикатор и взвешивали.

Массовую долю золы (А, %) рассчитывали по формуле (2):

$$A = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (2)$$

где:

m_0 - масса пустого тигля, г;

m_1 - масса тигля с навеской до прокаливания, г;

m_2 - масса тигля с остатком золы после прокаливания, г.

Результаты выражали в процентах с точностью до 0,001 %.

2.2.1.3 Определение массовой доли липидов проводили на автоматизированной экстракционной установке Gerhardt Soxtherm (Германия), работающей по принципу ускоренного метода Сокслета

Навеску исследуемого образца (крахмала) массой 25-50 г с точностью до 0,0001 г помещали в одноразовый целлюлозный экстракционный патрон, который устанавливали в экстракционную гильзу прибора. В качестве экстрагирующего агента использовали гексан в объеме 130 мл.

Экстракция проводилась в три последовательных этапа:

1. Экстракция проводилась при 100 % нагреве в течение 60 мин (6 циклов циркуляции растворителя).
2. Сушка (удаление растворителя) - при 100 % нагреве в течение 60 мин.
3. Очистка и охлаждение приемной колбы - при 70 % нагреве в течение 25 мин. для полного удаления остатков растворителя.

После завершения экстракции и сушки приемную колбу с экстрагированным жиром охлаждали до комнатной температуры в эксикаторе и взвешивали с точностью до 0,001 г.

Массовую долю липидов вычисляли по формуле (3):

$$X = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100 \quad (3)$$

где:

m_1 - масса сухой чистой колбы, г;

m_2 - масса колбы после экстракции и удаления растворителя, г;

m - масса навески образца, г.

Полученные результаты выражали в процентах от массы навески.

Метод основан на экстракции липидов неполярным органическим растворителем с последующим удалением растворителя и определением массы

экстракта по разности взвешиваний в соответствии с требованиями ГОСТ 13496.15-97 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения содержания жира» [140].

2.2.1.4 Общее содержание белка в образцах определяли по методу [141] на анализаторе Turbotherm Gerhardt (Германия), работающем по методу Кьельдаля с блочным озолением и последующей паровой дистилляцией. Метод основан на определении общего содержания азота с последующим пересчетом на белок с использованием коэффициента пересчета.

Процесс анализа включал три основные стадии:

1. Минерализация (дигестирование): навеску образца массой 1-2 г помещали в пробирки дигестора, добавляли катализатор (смесь медного купороса и серной кислоты) и подвергали термическому разложению в системе инфракрасного нагрева Turbotherm Gerhardt до полного осветления раствора.

2. Очистка и дистилляция: после завершения озоления полученный раствор нейтрализовали щелочью и перегоняли в блоке дистилляции, где пары аммиака улавливались в борной кислоте.

3. Титрование: количество выделенного аммиака определяли титрованием борной кислоты раствором 0,1 Н. серной кислоты (титрование выполнялось вручную).

Расчет массовой доли белка (X) проводили по методу АОАС 2011.11 “Protein (crude) in animal feed, plant tissue, grain, and oilseeds”, по формуле (4):

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1.4007 \times F}{m} \quad (4)$$

где:

V_1 - объем титранта, израсходованный на пробу, мл;

V_0 - объем титранта на холостой опыт, мл;

c - концентрация раствора серной кислоты, н;

F - коэффициент пересчета азота в белок (для растительного сырья - 6,25);

m - масса навески образца, г.

Результаты выражали в процентах от массы навески с точностью до 0,01 %.

Методика соответствует требованиям АОАС 2011.11, ISO 5983-2:2009 и ГОСТ 13496.4-93 «Комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения азота и расчета содержания сырого протеина».

2.2.1.5 Содержание фосфатов в нативных крахмалах определяли по ГОСТ 7698-93 «Крахмал. Правила приемки и методы анализа»

Метод основан на определении количества фосфора в виде неорганических фосфатов после кислотного разложения образца и последующего фотометрического измерения интенсивности окраски.

Для анализа навеску крахмала массой 1-2 г подвергали минеральному разложению в присутствии серной и азотной кислот до полного обесцвечивания

раствора. После охлаждения раствор доводили дистиллированной водой до определенного объема и фильтровали.

Аликвотную часть полученного раствора обрабатывали реактивом ванадата- и молибдата аммония, после чего измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 400–420 нм относительно холостого опыта.

Массовую долю фосфатов (X) вычисляли по калибровочному графику, построенному по стандартным растворам фосфора, и выражали в процентах в пересчёте на P_2O_5 . Результаты определяли с точностью до 0,001 %.

2.2.1.6 Содержание амилозы и амилопектина в нативных крахмалах согласно методу Juliano [142, 143] основанному на образовании окрашенного комплекса амилозы с иодом и последующем фотометрическом измерении интенсивности окраски.

Навеску крахмала массой 20 мг растворяли в 10 мл раствора 1 н. NaOH, нагревали до полного растворения полисахаридов и затем доводили объем дистиллированной водой до 100 мл. Из полученного раствора отбирали аликвоту (1 мл), нейтрализовали 1 н. HCl и добавляли 0,2 мл раствора иода (0,2% I_2 в 2% KI). После выдерживания раствора в течение 20 минут при комнатной температуре измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 620 нм.

Количество амилозы определяли по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных образцов крахмала с известным содержанием амилозы (амилоза картофельная).

Содержание амилопектина рассчитывали, как разность между 100 % и содержанием амилозы. Результаты выражали в процентах от общей массы крахмала.

2.2.2 Гидролиз крахмала

Гидролиз крахмала проводился в две стадии согласно методу, описанному [144, 145]. Подготовка крахмальной суспензии. В лабораторный реактор объёмом 2 л вносили крахмал, после чего добавляли дистиллированную воду до достижения концентрации сухих веществ (СВ) 30 %. Суспензию тщательно перемешивали до получения однородной массы.

Затем при постоянном перемешивании добавляли раствор NaOH до установления pH 6,0-6,5. Для стабилизации α -амилазы к суспензии крахмала добавляли раствор $CaCl_2$ концентрацией 40-70 мг/л. Крахмальную суспензию оставляли отстаиваться на 20-25 минут для равномерного распределения ионов кальция и стабилизации pH.

Первая стадия разжижения. Подготовленную крахмальную суспензию нагревали до 90 °C для полной желатинизации крахмала. Затем вводили первую порцию термостабильной α -амилазы Termamyl L120 (предварительно разбавленной дистиллированной водой в соотношении 1:3) и дозируется в два приема, из которых 1/3 вносили на первой стадии, а 2/3 – на второй. В

крахмальную суспензию вдувается пар для подогрева продукта до 130 °С. для полной желатинизации крахмала. Затем при постоянном перемешивании и падении температуры желатинизированного крахмала 85-90 °С вводят первую дозу фермента и проводят гидролиз в течение 20-25 минут при постоянном перемешивании. Вязкость суспензии постепенно снижалась, что указывало на частичное разрушение крахмальных макромолекул и переход крахмала в растворимое состояние.

Вторая стадия разжижения. После завершения первой стадии гидролизат охлаждали и добавляли оставшуюся часть α -амилазы Termamyl L120 (2/3 от общего количества). Оптимальная степень гидролиза DE $\approx$ 18-20% достигалась при общей выдержке около 2,5 часов. Если продолжать реакцию дольше или добавлять избыток фермента, скорость гидролиза возрастает, но начинается вторичное расщепление продуктов – так называемое «старение» суспензии, и значение DE начинает падать. Степень разжижения контролировали йодной пробой: к 1 мл пробы добавляли несколько капель раствора йода. Отсутствие синего окрашивания говорило о том, что крахмальные цепи полностью разрушены и образовались мальтодекстрины [146].

Нейтрализация и очистка продукта. После завершения разжижения pH суспензии довели до $4,0 \pm 0,1$, постепенно приливая 15 % раствор соляной кислоты при постоянном перемешивании. Нейтрализацию проводили 5-10 минут, контролируя pH потенциометрически.

Полученную суспензию фильтровали через бумажный фильтр «синяя лента». Затем продукт доочищали 1 % раствором активированного угля (в расчёте на массу). После 15-минутного перемешивания для адсорбции смесь фильтровали повторно.

В результате получили прозрачный раствор мальтодекстринов с декстрозным эквивалентом ДЭ $\approx$ 18-20% и концентрацией редуцирующих сахаров 140 г/л. (Таблица 2).

Таблица 2 - Контроль параметров

Показатель	Условия
Концентрация сухих веществ	30 %
pH перед разжижением	6,0-6,5
CaCl ₂	40-70 мг/л
Температура желатинизации	до 90 °С (25мин)
Температура гидролиза	85-90 °С
Время первой стадии	35 мин
Время второй стадии	120 мин
Концентрация HCl для нейтрализации	15 %
Конечный pH	$4,0 \pm 0,1$
ДЭ мальтодекстринов	18-20%
Концентрация сахаров	140 г/л

2.2.2.1 Декстрозный эквивалент гидролизатов определялся методом Лейна-Эйнона ГОСТ Р 50549-93 (ИСО 5377-81) «Продукты переработки крахмала. Определение содержания восстановительных сахаров методом Лейна–Эйнона».

Метод основан на восстановлении медных ионов (Cu^{2+}) из раствора Фелинга до оксида меди (Cu_2O) восстанавливающими сахарами, содержащимися в гидролизате. Количество выделившегося оксида меди пропорционально содержанию редуцирующих сахаров и определяется титрованием раствором стандартного раствора Фелинга с последующим вычислением декстрозного эквивалента.

Навеску гидролизата растворяли в дистиллированной воде, фильтровали и титровали стандартным раствором Фелинга при нагревании до кипения. По объему раствора, израсходованного на восстановление меди, определяли содержание редуцирующих веществ, выраженное в процентах к сухому веществу.

Степень гидролиза оценивают по значению DE (dextrose equivalent) – процентному содержанию восстановительных сахаров в расчёте на сухое вещество (5):

$$DE(\%) = \frac{\text{масса восстановительных сахаров}}{\text{масса сухих веществ}} \times 100 \quad (5)$$

Результаты выражали с точностью до 0,1 %.

В производстве лимонной кислоты применяют частично гидролизованные крахмальные гидролизаты с $DE \approx 18\text{--}20\%$, обеспечивающие оптимальное соотношение вязкости и сбраживаемости.

2.2.3 Выделение штаммов-продуцентов лимонной кислоты

2.2.3.1 Микробиологический анализ почвенных образцов для выявления продуцентов лимонной кислоты проводили стандартными методами разведений [147].

2.2.3.2 Идентификацию микроскопических грибов проводили на основе морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств. При описании культуральных признаков грибов отмечали: скорость роста колоний, внешний вид колоний, текстура колоний, окраска колоний, окраска субстратного и воздушного мицелия, диффузия пигмента в агар, окраска окружающей среды. Отмечали складчатость колоний, наличие эксудата, его цвет, запах культуры и др. Для характеристики морфологических признаков культуры грибов просматривали на чашках при увеличении $\times 8$, $\times 20$, $\times 40$ микроскопа, при этом отмечали характер прикрепления спороношений к воздушному или субстратному мицелию, ветвление спорангиеносцев и конидиеносцев, характер агрегации спор и конидий. Видовую принадлежность устанавливали по определителям [148].

2.2.3.3 Первичный скрининг продуцентов лимонной кислоты проводили согласно методу, описанному в [35, с.176]. Выделение ЛК в среде гидролиза

проверялось по образованию желтой зоны при добавлении кислотно-основного индикатора ализариновый красный. Штаммы с наибольшей секрецией ЛК отбирались для дальнейших количественных испытаний.

2.2.3.4 Вторичный скрининг продуцентов лимонной кислоты. Для количественного анализа штаммы выращивали в стерильном бульоне Чапека-Докса [52, с.1300]. Культивирование: колбы Эрленмейера 250 мл, 50 мл среды, инокуляция свежими спорами, инкубация 168ч при 30 °С и 150 об/мин. Перед посевом все среды стерилизовали при 121 °С в течение 20 мин.

После инкубации культуральную жидкость фильтровали через бумажный фильтр для отделения мицелия.

2.2.4 Методы молекулярно-генетического анализа

Выделение ДНК.

Геномную ДНК из культур *Aspergillus CA20* выделяли с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) по протоколу производителя с небольшими модификациями. Клетки суспендировали в физиологическом растворе (1:10), отбирали 100 мкл суспензии, лизировали в 180 мкл Buffer ATL с 20 мкл Proteinase K при 55 °С 3 ч с периодическим перемешиванием. Далее проводили этапы осаждения, промывки (Buffer AL, этанол, AW1, AW2) и элюирования ДНК в 200 мкл Buffer AE (двухкратно). Конечный объем элюата аликвотировали и хранили при – 80 °С.

Оценка качества и количества ДНК.

Концентрацию и чистоту ДНК определяли спектрофотометрически на BioPhotometer plus (Eppendorf) по поглощению при 260, 280 и 320 нм в буфере TE. Критерии чистоты: $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$; $A_{320} \approx 0$. Качество ДНК контролировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием в 1×TAE-буфере.

ПЦР-амплификация.

Амплификацию проводили в объеме 20 мкл смеси, содержащей 25 нг ДНК-матрицы, 1 ед. Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific), 0,2 мМ каждого dNTP, 1× ПЦР-буфер, 2,5 мМ $MgCl_2$, по 10 пмоль каждого праймера. Реакцию выполняли на амплификаторе Mastercycler Gradient (Eppendorf) по соответствующей программе.

Очистка ПЦР-продуктов.

Очистку проводили двумя методами:

- ферментативным - с использованием смеси щелочной фосфатазы (SAP) и Exonuclease I (37°С 30 мин, инактивация 85°С 15 мин);
- осаждением ацетатно-спиртовой смесью (3 М CH_3COONa + 95% этанол), центрифугированием, промывкой 70% этанолом и растворением в dH_2O .

Секвенирование.

Секвенирование по методу Сэнгера выполняли с набором BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) в объеме 10 мкл (1,0 мкл Ready Reaction Mix, 1,5 мкл 5× Sequencing Buffer, 3,2 пмоль праймера, 10–40 нг ПЦР-продукта). Циклическое секвенирование: 96 °С 1 мин; 25 циклов (96°С 10 с, 50°С 5 с, 60°С 4 мин). Продукты очищали этанольной преципитацией

с EDTA и ацетатом натрия, ресуспендировали в Hi-Di Formamide и анализировали на автоматическом секвенаторе SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Первичную обработку данных проводили в Sequencing Analysis Software.

Анализ последовательностей.

Нуклеотидные последовательности анализировали в программах Finch TV v1.3.1, CEQuence Investigator, MEGA 11 (метод Neighbor-Joining) и сравнивали с базами данных GenBank, BLAST, ENSEMBL. Для филогенетического анализа использовали фрагмент гена 28S рРНК. Полученная последовательность длиной 1080 п.н. (GC-состав 49,07%) подтвердила отнесение штамма *Aspergillus CA20* к виду *A. niger* (высокая степень родства с референсными штаммами по филогенетическому дереву (рис.10), построенному методом Neighbor-Joining в MEGA 11).

2.2.5 Селекция и мутагенез штаммов *A. niger*

Современное производство лимонной кислоты базируется на использовании высокопродуктивных мутантных штаммов. Для их получения применили:

- физический мутаген – рентгеновские лучи;
- химический мутаген – *N*-нитрозо-*N*-метилмочевина (НМУ).

Комбинированное использование физических и химических мутагенов позволяет повысить частоту положительных мутаций.

2.2.5.1 Химический мутагенез. Для экспериментов использовались семидневные культуры *A. niger*, выращенные на агаре Чапека-Докса. Для индуцирования штамма использовали *N*-нитрозо-*N*-метилмочевина (НМУ) в концентрации 0,005% и 0,015% [47, стр. 262]. После инкубации в мутагенном растворе при 30°C в течение 45 минут материал дважды промывали дистиллированной водой. Затем споры ресуспендировали в воде и высевали на чашки Петри с агаризированной средой Чапека-Докса с добавлением ализаринового красного.

2.2.5.2 Физический мутагенез. В качестве мутагенного агента для повышения синтеза лимонной кислоты было использовано облучение рентгеновскими лучами согласно методу. Облучение проводили на медицинском рентгеновском аппарате Siemens, расположенном в Научно-исследовательском институте радиационной медицины и экологии (г. Семей). Выращенные культуры штамма на чашках Петри с питательной средой облучали при различной продолжительности экспозиции:

- 1-й режим: облучения по 1,8 сек., доза 3,6 мкЗв;
- 2-й режим: облучения по 1,8 сек., доза 5,4 мкЗв.

После облучения споры ресуспендировали в воде и высевали на чашки Петри с агаром Чапека-Докса. Выживаемость рассчитывали, как отношение

количества выросших колоний после обработки к числу колоний в контроле (необлученный штамм).

2.2.6 Условия ферментации

Ферментацию проводили в биореакторе Labfors 5 Infors-НТ (Швейцария), рабочим объемом 3,6 л.

Основные параметры процесса:

- температура – 31 °С;
- рН – $5,0 \pm 0,1$ (регулировали добавлением 5 М NaOH или 10 % CaCO_3),
- скорость перемешивания – 160 об/мин;
- длительность ферментации составляла 168 ч.

Образцы отбирали в 72ч., 120ч. и 168 ч для анализа концентрации субстрата, продукта и биомассы.

2.2.7 Озонирование

Озонирование проводили с использованием лабораторного генератора озона коронного разряда ОГВК-02К (Россия), предназначенного для получения озона из атмосферного воздуха или кислорода. Принцип работы генератора основан на образовании озона в зоне электрического коронного разряда при пропускании кислорода через высоковольтное электрическое поле [149].

Полученный озон вводили в воду через вентури-инжектор, обеспечивающий эффективное растворение газа и образование озонированной воды. Принцип работы инжектора основан на создании зоны пониженного давления в потоке жидкости, что обеспечивает подсасывание озоно-воздушной смеси и её интенсивное диспергирование в воде. Полученная озонированная вода подавалась в ферментер через систему мелкодисперсных распылительных форсунок (spray-nozzle system), обеспечивающих равномерную обработку внутренних поверхностей аппарата (рис.5).

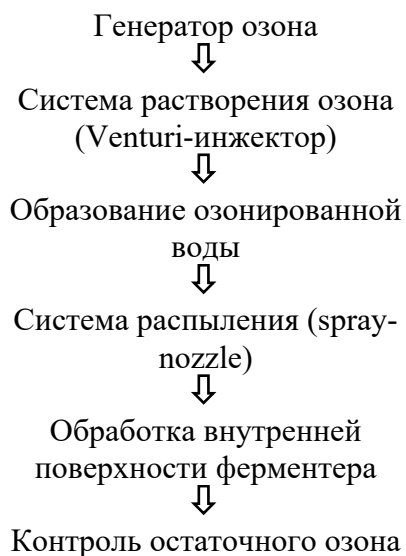


Рисунок 5- Блок-схема процесса озонирования ферментационного оборудования

Контроль остаточной концентрации растворённого озона осуществляли йодометрическим методом, основанным на окислении ионов йодида озонном с образованием свободного йода. После стерилизации ферментер засеивали мицелием *A. niger* R5/4.

2.2.8 Оптимизация ферментационной среды

Процесс ферментации делится на несколько стадий:

- Подготовка и стерилизация питательной среды;
- Инокуляция и рост мицелия;
- Накопление лимонной кислоты в жидкой среде;
- Отделение биомассы и очистка раствора.

Для определения оптимальных условий ферментации использовали факторный экспериментальный план. Каждая серия опытов проводилась в трёх повторностях для обеспечения достоверности и воспроизводимости результатов. В среду добавляли различные концентрации $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $NaNO_3$, этанола для выявления оптимального состава питательной среды для производства ЛК штаммом *A. niger* R5/4.

При оценке влияния температуры на выход лимонной кислоты были выбраны 29, 30 и 31°C. Количественное содержание лимонной кислоты анализировалось при различном времени инкубации 144, 168 и 192 ч, также исследовано влияние начального pH на кислотообразование при 4,5; 5 и 5,5.

2.2.8.1 Эффективность ферментации определялась с помощью таких показателей как сухая масса мицелия, концентрация субстрата и концентрация лимонной кислоты. Коэффициент массового выхода продукции лимонной кислоты (Y_{CA}), выраженный в граммах ЛК на грамм потребленного субстрата, рассчитывали из формулы (6):

$$Y_{CA} = P / S \quad (6)$$

Удельную продуктивность культуры, выраженную в граммах ЛК на грамм биомассы в час, рассчитывали по формуле (7):

$$q_{CA} = P / X \cdot t \quad (7)$$

где, P - общее количество ЛК в культуральной жидкости в конце культивирования (в граммах), S - общее количество потребленного субстрата (в граммах), t - продолжительность ферментации (в часах), и X - биомасса в ферментере (в граммах).

2.2.9 Определение биохимических показателей

2.2.9.1 Концентрация лимонной кислоты: определяли методом кислотно-основного титрования. Фильтрат титровали раствором 0.1 N NaOH с фенолфталеином в качестве индикатора. Появление розовой окраски

свидетельствовало о достижении конечной точки титрования. Содержание лимонной кислоты вычисляли по формуле (8):

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

$$\% \text{общей кислоты} = \frac{\text{Титр} \cdot \text{нормальность NaOH} \cdot \text{эквивалентная масса ЛК}}{\text{Объем пробы} \cdot 1000} \cdot 100 \quad (8)$$

Выход ЛК (%) рассчитывали относительно количества использованного сахара по формуле:

$$\% \text{Выход ЛК} = \frac{\text{Количество ЛК}}{\text{Количество использованного сахара}} \cdot 100 \quad (9)$$

2.2.9.2 Значения биомассы, остаточных сахаров и pH были определены в соответствии с [150]. Сухую массу мицелия определяли фильтрацией культуральной жидкости через предварительно взвешенный фильтр Whatman № 44. Осадок мицелия промывали дистиллированной водой и сушили при 110 °C в течение ночи до постоянной массы. Результаты были выражены в г/л.

2.2.9.3 Кислотность среды (pH): контролировалась потенциометрически.

2.2.10 Методы исследования антиоксидантной активности лимонной кислоты.

2.2.10.1 Свободнорадикальную активность оценивали по DPPH-тесту по методике [151]

Антиоксидантную активность лимонной кислоты определяли по способности исследуемого образца взаимодействовать со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH), который имеет интенсивную фиолетовую окраску с максимальной абсорбцией при 517 нм. При наличии антиоксидантов происходит восстановление DPPH•, сопровождающееся обесцвечиванием раствора, что позволяет количественно оценить радикал-поглощающую способность образца.

Для анализа готовили реакционную смесь, содержащую 0,1 мл. исследуемого раствора лимонной кислоты и 3,9 мл. раствора DPPH• концентрацией 200 мкмоль/л, приготовленного на этаноле. Смесь инкубировали в термостатируемой водяной бане при температуре 37°C в течение 30 минут. После завершения инкубации измеряли оптическую плотность раствора при 517 нм относительно этанольного контроля.

Радикал-поглощающую активность рассчитывали по формуле (10):

$$\% \text{ DPPH} = \frac{A_{\text{контроль}} - A_{\text{образца}}}{A_{\text{контроль}}} \times 100 \quad (10)$$

где:

$A_{\text{контроль}}$ — оптическая плотность раствора DPPH• без добавления исследуемого образца,

$A_{\text{образца}}$ – оптическая плотность реакционной смеси после инкубации.

2.2.10.2 Определение восстановительной способности методом FRAP [152].

Метод FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) основан на способности антиоксидантов восстанавливать комплекс Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-трипиридил-триазин) до Fe^{2+} -TPTZ, окрашенный в интенсивно синий цвет с максимумом поглощения при 593 нм.

Рабочий FRAP-реагент готовили *ex tempore* из ацетатного буфера (pH 3,6), раствора TPTZ (10 мм в HCl 40 мм) и раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 мм) в соотношении 10:1:1.

К 3,0 мл. FRAP-реагента добавляли 100 мкл исследуемого образца. Инкубировали при 37 °С в течение 10 мин и измеряли оптическую плотность при 593 нм.

Активность выражали в мкмоль Trolox-эквивалента на грамм вещества (мкмоль ТЕ/г) по калибровочному графику.

2.2.10.3 Хелатирующую активность в отношении ионов Fe^{2+} определяли феррозиновым методом [153].

Хелатирующую активность определяли по ингибированию образования комплекса Fe^{2+} - феррозин. В отсутствие хелатора феррозин образует стабильный розово-фиолетовый комплекс с максимумом поглощения при 562 нм. Наличие хелатирующего агента снижает интенсивность окраски.

В пробирки вносили: 1,0 мл. раствора образца, 0,1 мл. раствора FeSO_4 (2 мм), 0,2 мл. раствора феррозина (5 мм), доводили объём до 5 мл. дистиллированной водой. Инкубировали 10 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность при 562 нм.

Процент хелатирования вычисляли по формуле (11):

$$\% \text{ Хелатирование} = \frac{A_{\text{контроль}} - A_{\text{образца}}}{A_{\text{контроль}}} \times 100 \quad (11)$$

где:

$A_{\text{контроль}}$ – интенсивность комплекса Fe^{2+} -феррозин без добавления образца,
 $A_{\text{образца}}$ – оптическая плотность реакционной смеси после инкубации.

2.2.10.4 Определение IC_{50} выполнены в соответствии методом [154].

Для методов DPPH и хелатирования Fe^{2+} определяли показатель IC_{50} — концентрацию вещества, обеспечивающую 50% ингибирование радикала или 50% хелатирование металла.

IC_{50} рассчитывали путём:

1. построения зависимостей «концентрация – % активности»,
2. аппроксимации данных линейной или нелинейной регрессией,
3. определения концентрации, при которой достигается 50% максимального эффекта.

Для каждого образца построены концентрационные зависимости (0,1–5,0 мг/мл), рассчитаны IC_{50} .

2.2.11 Физико-химические показатели опытных и коммерческих образцов лимонной кислоты определены в соответствии с требованиями и регламентированными методами ГОСТ 908-2004 Кислота лимонная моногидрат пищевая. Технические условия

2.2.12 Морфологию и микроструктуру кристаллов лимонной кислоты исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Перед исследованием образцы были напылены углеродом толщиной 5 нм (Agar Scientific, Великобритания). Морфологию поверхности изучали методом сканирующей электронной микроскопии на приборе Auriga Crossbeam 540 (Carl Zeiss, Германия) с использованием InLens-детектора при различных увеличениях.

2.2.13 Статистическая обработка. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 27 и электронных таблиц Microsoft Excel. Результаты представлены в виде стандартного отклонения (SD) средних значений из трех параллельных измерений. Данные с уровнем значимости $p < 0,05$ при доверительном интервале 95 % считались статистически значимыми. Математическая обработка измерений проводилась с использованием программы Minitab методом нелинейной регрессии. Визуализация полученных данных и расчет оптимальных условий выполнялись в MiniTab. Статистическая проверка модели по методу Бокса-Бенкена проводилась с использованием критерия Дункана и дисперсионного анализа (ANOVA).

Выводу по разделу 2

В разделе научно обоснована комплексная методика получения лимонной кислоты, включающая подготовку крахмалосодержащего сырья, ферментативный гидролиз, получение нового высокоэффективного штамма *Aspergillus niger* R5/4, проведение ферментации, озонирование оборудования и последующую очистку продукта; реализованы методы селекции и мутагенеза, подтверждённые молекулярно-генетическими исследованиями, подобран комплекс стандартизированных методов анализа и определены ключевые показатели процесса и качества продукции, а применение математического планирования и статистической обработки обеспечило достоверность, воспроизводимость результатов и возможность оптимизации технологического процесса, что в совокупности формирует достаточную и научно обоснованную методическую базу для решения задач диссертационного исследования и его практической реализации.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Поиск активных продуцентов, способа и условий культивирования микроорганизмов для производства лимонной кислоты

Для выделения микроорганизмов, продуцирующих лимонную кислоту на территориях сахарных и крахмалопаточных предприятий РК, было отобрано 24 образца: № 1-14 – выделены из почвы, загрязненной крахмалом, № 15-18 из початков кукурузы, № 19-22 – стеблей кукурузы, № 23,24 – крахмала (таблица 3).

Таблица 3 – Численность микроорганизмов на среде Чапека Докса

№ образца	Микроскопические грибы, тыс. КОЕ/г	В т.ч по родам, %				Бактерии тыс. КОЕ/г
		<i>Aspergillus</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Penicillium</i>	Прочие	
1	5,7	0	10	10	80	0,230
2	3,6	0	0	9.1	90,9	0,170
3	9,1	7	6	1	86	0,002
4	0,8	0	50	0	50	0,048
5	1,9	3	0	3	94	0,087
6	2,8	0	0	0	100	0,260
7	4,5	15	0	40	45	0,750
8	2,3	10	0	0	90	0,005
9	10,3	0	0	0	100	0,300
10	5,2	0	0	0	100	0,200
11	8,1	25	0	0	75	0,160
12	7,3	0	0	0	100	0,025
13	2,9	0	50	0	50	0,009
14	5,5	25	0	0	75	0,055
16	4,2	10	0	0	90	0,003
17	0,8	0	50	0	50	0,190
18	4,6	0	0	0	100	0,083
19	1,8	0	0	0	100	0,337
20	5,8	0	0	0	100	0,051
21	7,0	0	0	0	100	0,005
22	5,3	0	0	0	100	0,121
23	2,4	0	0	0	100	0,047
24	1,1	0	0	0	100	0,004

В результате исследования было выделено 35 штаммов микробных культур: 3 изолята были идентифицированы по культурным и морфологическим признакам как бактерии рода *Bacillus*, 5 изолятов – роду *Trichoderma*, 27 изолятов были отнесены к микроскопическим грибам, из них 24 принадлежали роду *Aspergillus*, а 3 – роду *Penicillium*.

Идентификация мицелиальных грибов основана главным образом на сопоставлении макроскопических и микроскопических признаков исследуемой культуры (рис.6, 7).

Культурально-морфологическая характеристика выделенных культур рода *Aspergillus*. Через 7 суток культивирования при температуре 30°C на поверхности агаризованной среды Чапека-Докса колонии занимали всю поверхность среды чашки Петри, имели обильное спороношение и хорошо выраженную зональность. Обратная сторона колоний светлая, субстратный мицелий плотный в центре и рыхлый на периферии, с возрастом образует кольчатый зональный рисунок. Конидии сферические, темно-коричневые, бугристые.

На 7 сутки культивирования колонии на среде Чапека-Докса имели округлую форму бежевого цвета с сильно развитым воздушным мицелием диаметром 5,0-6,5 см. Конидии сферической формы. Обратная сторона колоний гладкая, белая.

Культурально-морфологическая характеристика выделенных культур рода *Penicillium*. Культуры колоний диаметром до 3-4 см с неровным фестончатым контуром, плоские, бархатистые, темно-зеленые; плоские белые с ровными контурами. Обратная сторона у колоний плоская. Имеют обильное спороношение с образованием коротких симметричных кисточек. Конидии мелкие, гладкие. Терминальная часть кисточек и конидий темно-зеленого цвета.

Культурально-морфологическая характеристика выделенных культур рода *Trichoderma*. На 7 сутки роста микроорганизмов образуются колонии до 5,0-5,5 см в диаметре с гладкой подошвой, слегка приподнятые над поверхностью среды, не врастающие в агар, с волнистым краем, пушистым воздушным мицелием, который покрыт спорами. Конидии одноклеточные, почти шаровидные, собраны в головки на концах разветвленных конидиеносцев. Обратная сторона колоний пигментирована. Пигмент в среду не выделяется, слабый запах.

Таким образом, выделенные микроскопические грибы отнесены к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

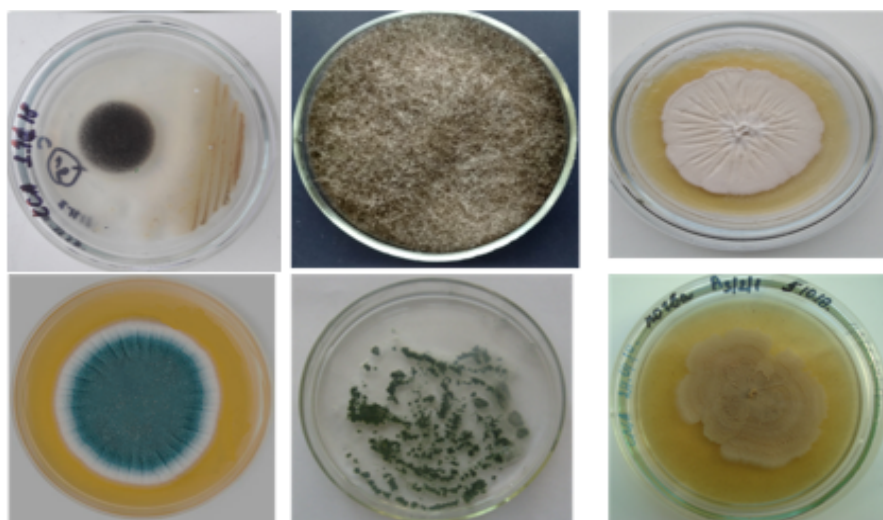


Рисунок 6 - Культуральные признаки микромицетов и бактерий, выделенных из почв



Рисунок 7 – Микрофотография *Aspergillus*, увеличение x40 раз

Для дальнейших исследований были отобраны 32 штаммов микробных культур (Таблица 4).

Отобранные 32 штамма были оценены на кислотопродуцирующую активность на индикаторных чашках с добавлением красителя Alizarin Red S (таблица 4). Для этого использовали агаризованную среду Чапека-Докса, в которую перед стерилизацией добавляли 40,0 мл (1,0%, w/v) индикаторного раствора. Культуры инкубировали в течение трех суток при 30°C. Продукция кислоты оценивалась по изменению окраски среды: при росте культуры и накоплении кислот в зоне вокруг колоний бордовый цвет среды изменялся на светло-желтый.

Таблица 4 – Продуцирование лимонной кислоты культурами мицелиальных грибов

Наименование штамма	Род штамма	0-10 mm	10.1-15 mm	>15.1 mm
1	2	3	4	5
CA1	<i>Aspergillus</i>	-	-	+
CA2	<i>Aspergillus</i>	-	-	+
CA3	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA4	<i>Aspergillus</i>	-	-	+
CA5	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA6	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA7	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA8	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA9	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA10	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA11	<i>Aspergillus</i>	-	-	-
CA12	<i>Aspergillus</i>	+	-	-

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
CA13	<i>Aspergillus</i>	+	-	-
CA14	<i>Aspergillus</i>	-	-	-
CA15	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA16	<i>Aspergillus</i>	-	-	-
CA17	<i>Aspergillus</i>	-	-	-
CA18	<i>Aspergillus</i>	-	-	-
CA19	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA20	<i>Aspergillus</i>	-	-	+
CA21	<i>Aspergillus</i>	-	-	+
CA22	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA23	<i>Aspergillus</i>	-	+	-
CA24	<i>Aspergillus</i>	-	-	+
B1	<i>Penicillium</i>	-	-	-
B2	<i>Penicillium</i>	-	-	-
B3	<i>Penicillium</i>	-	-	-
T 1	<i>Trichoderma</i>	-	+	-
T 2	<i>Trichoderma</i>	+	-	-
T 3	<i>Trichoderma</i>	+	-	-
T 4	<i>Trichoderma</i>	-	+	+
T 5	<i>Trichoderma</i>	-	+	-

Во всех исследуемых природных штаммах наблюдалось формирование характерных желтых зон вокруг колоний. В результате было отобрано 6 штаммов *Aspergillus* и 1 штамм *Trichoderma T4* полученных из различных почвенных образцов и продемонстрировавших наибольшую продукцию лимонной кислоты. Диаметры зон изменения окраски варьировались в диапазоне от 49 до 60 мм спустя 48 часов инкубации. Несмотря на наличие кислотопродуцирующей активности у штамма *Trichoderma T4*, по данным литературы представители данного рода характеризуются образованием сопутствующих метаболитов, что может затруднять выделение лимонной кислоты. В связи с этим для дальнейших исследований были отобраны преимущественно штаммы рода *Aspergillus*.

На основании физиолого-биохимических признаков (таблица 5) определена видовая принадлежность отобранных штаммов микромицетов.

Таблица 5 – Физиолого-биохимические свойства штаммов *Aspergillus*

Тесты	Штаммы-продуценты					
	<i>Asp.CA1</i>	<i>Asp.s CA2</i>	<i>Asp. CA4</i>	<i>Asp.CA20</i>	<i>Asp. CA21</i>	<i>Asp.CA24</i>
1	2	3	4	5	6	7
Глюкоза	+	+	+	+	+	+
Фруктоза	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	+	+	+	+	+

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7
Мальтоза	+	+	+	+	+	+
Маннит	+	+	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+	+	+
Сорбит	+	+	+	+	+	+
Мочевина	+	+	+	+	+	+
Сульфат аммония	+	+	+	+	+	+
Нитрат аммония	+	+	+	+	+	+
Яблочная кислота	+	+	+	+	+	+
Янтарная кислота	+	+	+	+	+	+
Нитрат натрия	+	+	+	+	+	+
Фенилаланин	+	+	+	+	+	+
Температура культивирования	29-32 °С	29-32 °С	28-32 °С	28-32 °С	28-32 °С	28-32 °С
Отношение к кислороду	аэроб	аэроб	аэроб	аэроб	аэроб	аэроб
Кислотность, рН	5,7 -7,5	5,5-7,5	5,5 -7,5	5,5 -7,5	5,5-7,5	6,0 -7,5

Согласно данным разных исследователей, температура инкубации должна находиться в интервале от 28°С до 32°С, [155] обнаружили, что оптимальным для производства лимонной кислоты является 30°С.

Следует отметить, что тесты на кислотопродукцию не позволяют однозначно определить, какая именно кислота накапливается в среде. Для идентификации кислот, а также для верификации полученных результатов с помощью экспресс-методов, отобранные штаммы были дополнительно культивированы в жидкой минеральной среде.

На следующем этапе исследования оценивалась способность шести отобранных штаммов синтезировать лимонную кислоту на синтетической среде Чапека Докса (рис. 8, 9).

Скрининговая среда (рН 5,5-6,0) подвергалась стерилизации в автоклаве при 121°С в течение 15 минут. Базовая среда инокулировалась 1 мл суспензии спор с концентрацией 2×10^8 спор/мл, приготовленной из 7-дневных культур выделенных штаммов *Aspergillus*. Культуры выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл минеральной среды, на встряхивателе при 150 об/мин в инкубаторе при 30°С в течение семи дней. Определение концентрации лимонной кислоты проводилось титрованием 0,1% раствором NaOH с использованием 1 % фенолфталеина в качестве индикатора.

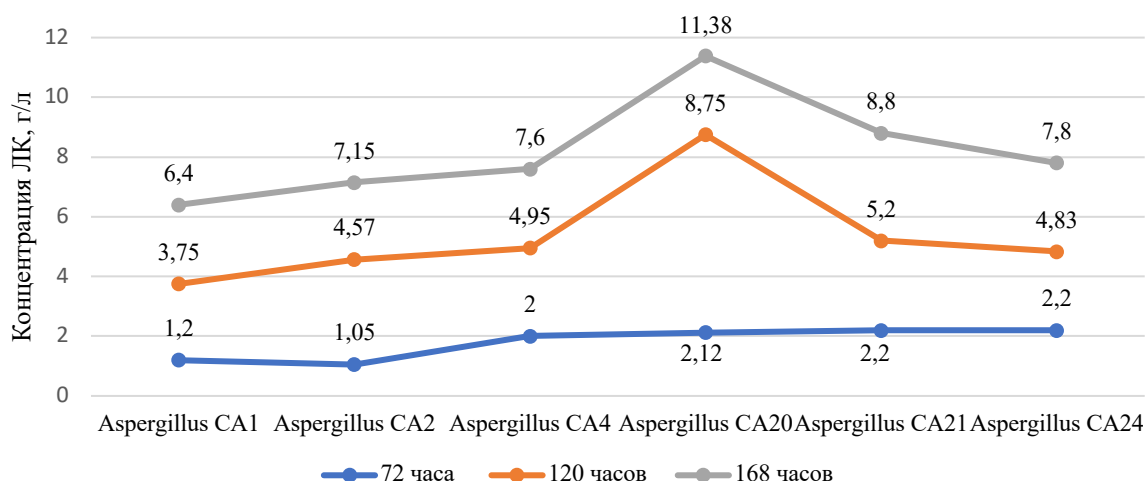


Рисунок 8 - Концентрации лимонной кислоты (ЛК, г/л) в зависимости от времени ферментации (72, 120, 168 часов) для разных штаммов *Aspergillus*

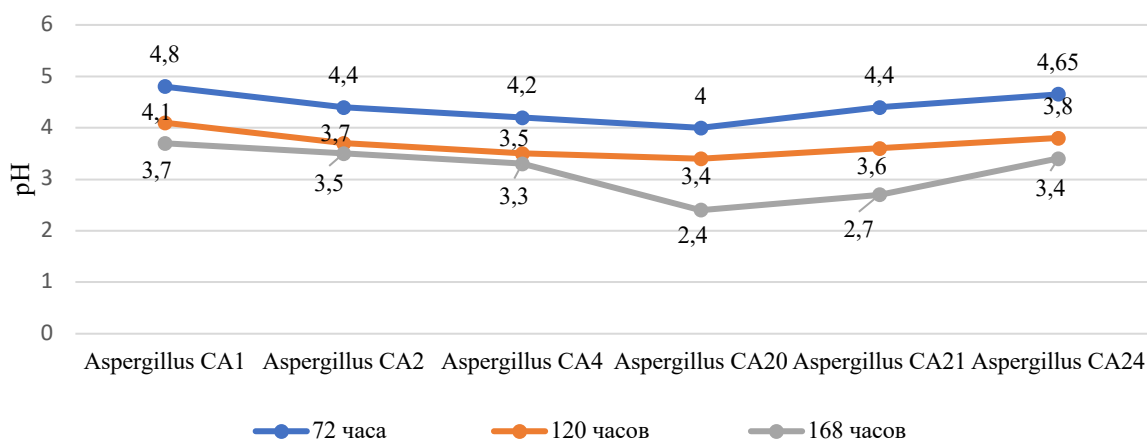


Рисунок 9 – pH лимонной кислоты в зависимости от времени ферментации (72, 120, 168 часов) для разных штаммов *Aspergillus*

Результаты показывают, что уровень накопления лимонной кислоты после 168 часов культивирования составил 6,4-11,38 г/л (рис.8). В процессе ферментации во всех экспериментах наблюдалось постепенное снижение pH (рис. 9), что свидетельствовало о накоплении лимонной кислоты в среде. Полученные данные согласуются с результатами [156], согласно которым первоначальный pH 6,5 постепенно снижался до 1,5 при ферментации в контрольной производственной среде. В соответствии с рекомендациями, для предотвращения накопления глюконовой кислоты уровень pH должен поддерживаться ниже 2,0, тогда как уровень pH около 4,0 способствует образованию глюконовой кислоты. Кроме того, промежуточные значения кислотности в диапазоне 1,8-2,5 считаются оптимальными.

На основе результатов вторичного скрининга для дальнейшего изучения был выбран штамм – *Aspergillus CA20*, который показал максимальное накопление лимонной кислоты на 7-й день инкубации, достигая 11,38 г/л.

Для обеспечения гарантированной стабильности показателей процесса в производственном цикле необходим контроль подлинности штаммов-продуцентов. Штамм идентифицирован по молекулярно-генетическим свойствам.

Новый штамм *Aspergillus CA20* является аэробом, прототрофом, имеет оптимальную температуру роста $30 \pm 1^\circ\text{C}$, диапазон роста pH 3,0-6,5.

Предоставленная последовательность длиной 1080 пар нуклеотидов (п.н.) кодирует фрагмент гена 28S рибосомальной РНК (rРНК) штамма *Aspergillus*

GCCTTGTAAGGGAATGCATGGGACAACTCACTTTCCTGCTCTCTCGGT
TGGATCTCCCTCTGCCCCGATGTCGCCTCACCGCAGTCTACGATCGACCCC
TCACAGAGGTCCCTCCGAGGCACGGCGACACGGGATCTGCAGCCAAATG
GATCTAATTACACCATGATGATAACTAAAGAGGCAGCGCGCTCTACTG
CACACTACCGATTTAGTCCGACAGCCGGCTCGGTCTCGCATCGGCGGTGA
GGATGTGCAACAATTGAGGGTGGATTGACGCAGACTGCTTATTGCTGATT
GTGTTGACCATCCGCATGCAGCCGTTCCCTTGCCTCGGCTCCTCAACACCGC
GGCCAACCGACGGCCACTCGCCCTCCTCCCCGGTGAATTTCTCCTGACTCT
GCTTTGTA CTCTGCTCTGTGGACATAATCTCTTCTCTCTCTCGTCTTTGCTT
GCACATTCACCCTTCTAGAACTCTCATCATGTCTTTCTCCCTGCCGATACG
TCCAACAACCCGCCATGCCAGCCGGCTGGTACAGGTACGCCCCCTCCCCCT
TGATAGCTTGCCTATCATTGCTGACAACCCCAAGGCCAGGATCCGCTCCGG
TCGGTTCTACAGCACCGAATCAGACCTTAAAACCGCCCTGAAATCCGTCA
TTCCCGAGAAGCGCGAGCTATTCAAGCAAGTCAAGGCCCGCAGCGACGA
TGTGGTCGGCGAAGTCAAGGTGGGCAACATCATTGGCGGCATGCGCGGC
CTGAAGTCCATGCTCTGGGAGGGATCCGTTCTCGACCCCGAGGAGGGTAT
CCGTTTCCACGGCAAGACCATCAAGGATTGCCAGCGTGAAGTGCCTCAAGG
GGACCACGGGAAGTGAATGCTCCCGGAGGCCATGTTCTGGCTGCTCCTG
ACCGGCCAGGTTCCCACTAGCCAGGTGCGCGCATTTTCTCGCGAGCT
TGCCGAGAAATCACATCTCCCCGACCACATCCTGGGCCTGATCAAGTCAT
TCCCCAAGGACATGCACCCAATGACGCAGCTGTCGGTGGCGGTTGCAGCA
CTGAACACGGAGTCGACCTTCGCCAAG

Анализ содержания GC показал, что доля пар гуанин-цитозин (ГЦ) составляет 49,07%, что свидетельствует об умеренной степени структурной стабильности данной последовательности. Повышенное содержание ГЦ может коррелировать с потенциально высокой транскрипционной активностью, а также с адаптивными механизмами организма к условиям окружающей среды, в том числе к стрессовым факторам, связанным с промышленным производством.

На рисунке 10 представлено филогенетическое дерево, построенное на анализе нуклеотидной последовательности 28S rRNA гена от штамма *Aspergillus CA20*.

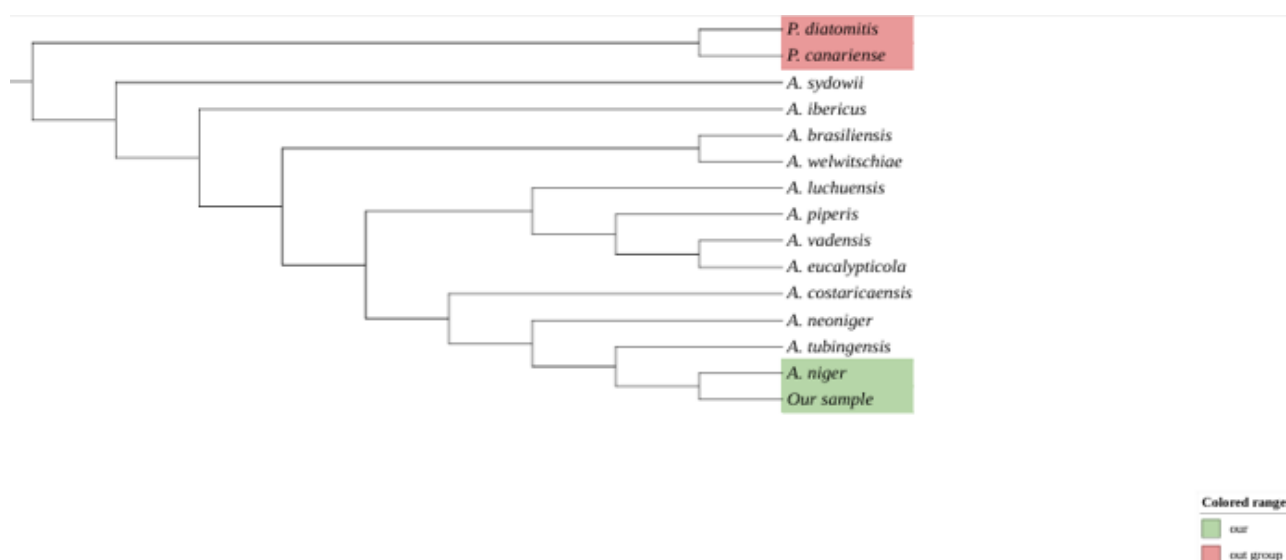


Рисунок 10 – Филогенетическое древо *Aspergillus 20*

Филогенетический анализ, проведенный с помощью программного обеспечения MEGA 11 методом *Neighbor-Joining*, показал, что исследуемый штамм образует кластер с референтным штаммом *A. niger*. Это указывает на высокую степень родства и позволяет отнести *Aspergillus CA20* к виду *A. niger* или к его ближайшему филогенетическому родственнику.

Таким образом, на основании молекулярно-генетических данных установлено, что штамм *Aspergillus CA20* относится к группе активных продуцентов лимонной кислоты, а его генетическая идентификация подтверждает пригодность для дальнейших исследований с целью усиления биосинтетических свойств.

Природные штаммы обладают ограниченной способностью к синтезу лимонной кислоты. В связи с этим отобранный штамм был подвергнут мутагенезу с целью достижения гиперпродукции лимонной кислоты.

3.2 Исследования по усилению продуцирующей способности штаммов *A. niger*

В настоящих исследованиях проведены работы по усилению продуцирующей способности штамма *A. niger CA20*, который был отобран по результатам предыдущих экспериментов по скринингу штамма продуцента с использованием крахмала в качестве источника углерода, максимальная продукция кислоты была достигнута на 7-е сутки и составляла 11,38 г/л.

Для индуцирования мутантов у *A. niger CA20*, многоступенчатый мутагенез НММ использовали в концентрации 0,005 % и 0,015 %. После инкубации в мутагенном растворе при температуре 30 °C в течение 45 минут материал дважды промывали дистиллированной водой. Отмытые от мутагена споры ресуспендировали в воде, и производили высев из серийных десятикратных разведений.

В результате после 1 ступени мутагенеза НММ 0,005% было выделено - 302 мутантных штамма, а после 0,015% - 81 штамм. Как показали исследования, при увеличении концентрации НММ выживаемость штаммов снижается. Для отбора мутантов с улучшенной способностью продуцировать кислоту использовали метод качественного анализа, основанного на изменении pH.

Далее из 383 мутантных штаммов было отобрано 18 штаммов с высокой кислотообразующей активностью (диаметр зоны желтого цвета вокруг колонии составил более 15 мм), у 211 культур показатели составили от 8 мм до 15 мм, 172 – менее 8 мм.

Мутантные штаммы с самыми высокими показателями кислотообразования методом качественного анализа отбирались для количественного определения кислотообразующей активности путем измерения объема титруемой кислотности с использованием 1 % фенолфталеина в качестве индикатора [157]. Показатели синтеза кислоты измерялись через 168 часов.

В результате анализа обнаружено, что штаммы мутантов проявили увеличенную активность в выработке кислоты, достигая уровня от 12,05 до 20,30 г/л после 168 часов культивирования (рис. 11).

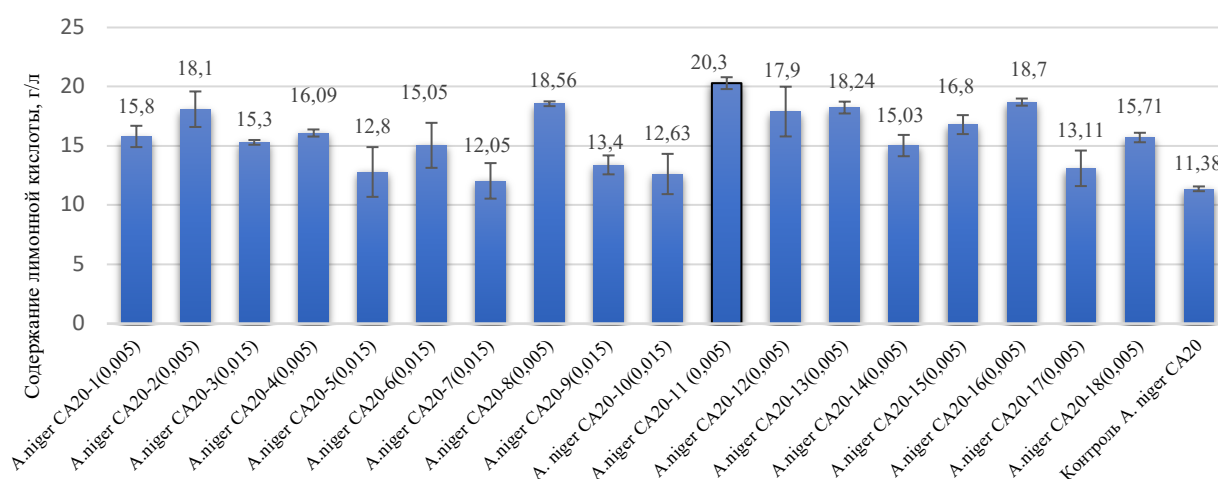


Рисунок 11 - Количественные показатели выхода лимонной кислоты при культивировании мутантных штаммов после первой ступени химического мутагенеза

Высокую кислотообразующую активность продемонстрировал штамм *A. niger CA20-11(0,005)*, который выделил 20,3 г/л лимонной кислоты через 7 суток, что почти в два раза превышает результаты контрольного дикого штамма.

Для дальнейших исследований рекомендуемая доза внесения НММ составила 0,005%, так как выживаемость спор была максимальной, а полученные мутантные штаммы обладали высокой кислотообразующей способностью.

На 2 ступени мутагенеза были использованы штаммы *A. niger CA20-8(0,005)* и *A. niger CA20-11 (0,005)* с наиболее высокими показателями

кислотообразования. После обработки 0,005 % НММ было выделено *A. niger* CA20-8 (0,005) – 57 штаммов, *A. niger* CA20-11 (0,005) – 118 штаммов. Аналогично для отбора мутантов использовали метод качественного анализа, основанного на изменении pH, и количественного анализа, в результате чего было отобрано 11 штаммов с активностью выше 20,30 г/л (рис.12).

В результате 2 ступени мутагенеза было отмечено снижение жизнеспособности штаммов, но кислотообразующая способность отдельных штаммов повысилась.

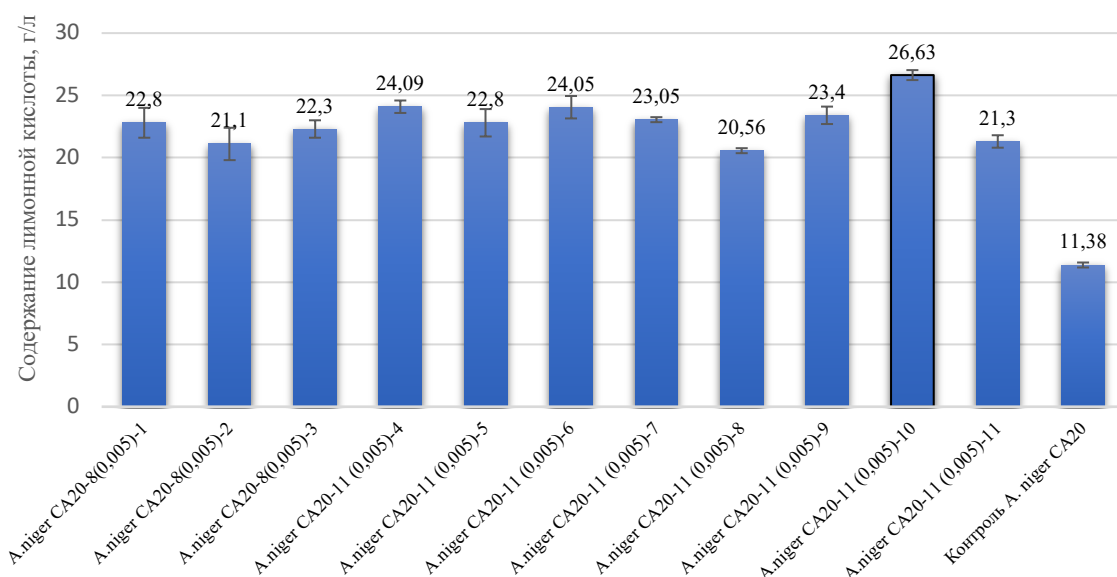
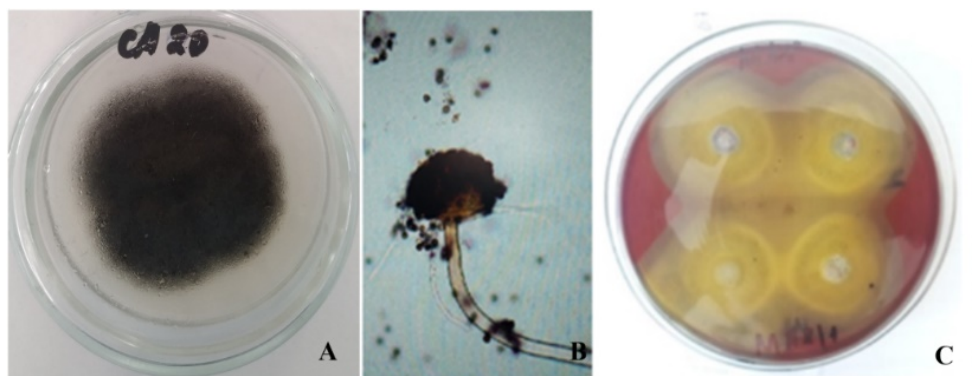


Рисунок 12 - Количественные показатели выхода лимонной кислоты мутантных штаммов после второй ступени химического мутагенеза

На основании проведенных исследований получен мутантный штамм *A. niger* CA20-11 (0,005)-10, превышающий кислотообразующую способность исходного штамма в 2,4 раза. Использование радиации позволяет достичь высокой вероятности мутации. При облучении рентгеновскими лучами спор вместо мицелия, у микромицетов возникают более высокие уровни устойчивости к стрессу, что минимизирует нежелательные побочные эффекты [158].

После радиооблучения штамма *A. niger* CA20-11 (0,005)-10 дозой 3,6 микрозивертов было выделено 37 штаммов, из них некоторые колонии показали изменения цвета спор, скорости роста колонии, образования пигментов (рис. 13).



а - Единичная колония на агаре Чапека-Докса. в - Морфологическое исследование штамма CA20-11; увеличение $\times 40$ раз. с - Контроль качества продукции лимонной кислоты на третий день культивирования.

Рисунок 13 - Культуральные, морфологические и физиологические характеристики штамма *A. niger* CA20-11 после облучения (3,6 мкЗв)

Все мутанты протестированы на кислотообразующую активность, у 7 штаммов выявлены более высокие показатели образования лимонной кислоты в сравнении с родительским (рис.14).

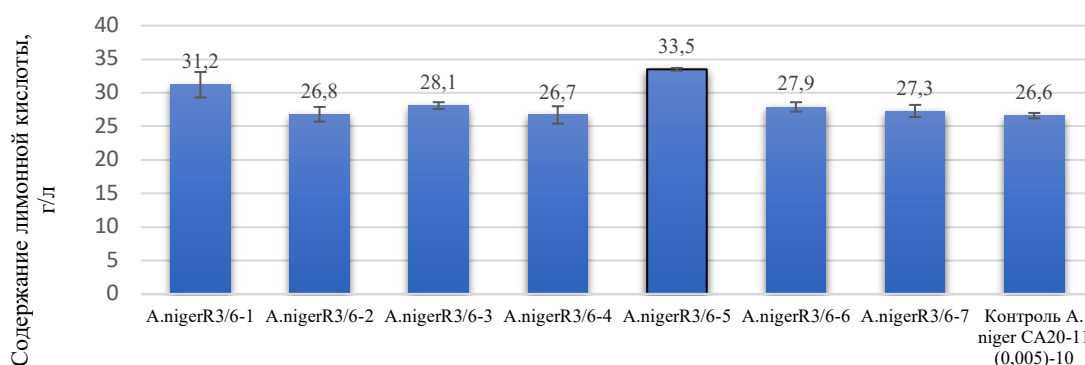


Рисунок 14 – Штаммы-мутанты с высокими значениями синтеза лимонной кислоты после радиооблучения штамма *A. niger* CA20-11 (0,005)-10 дозой в 3,6 микрозивертов

Во второй серии опытов штамм *A. niger* CA20-11 (0,005)-10 получил дозу облучения в количестве 5,4 микрозивертов, что значительно понизило выживаемость. Всего 21 штамм мутант выделены и изучены на продукцию лимонной кислоты методом количественного анализа. Все протестированные штаммы показали широкий разброс значений синтеза лимонной кислоты (рис. 15). Самые высокие показатели выхода лимонной кислоты обнаружены у штамма *A. niger* R5/4 – 8 (далее *A. niger* R5/4) – 37,5 г/л.

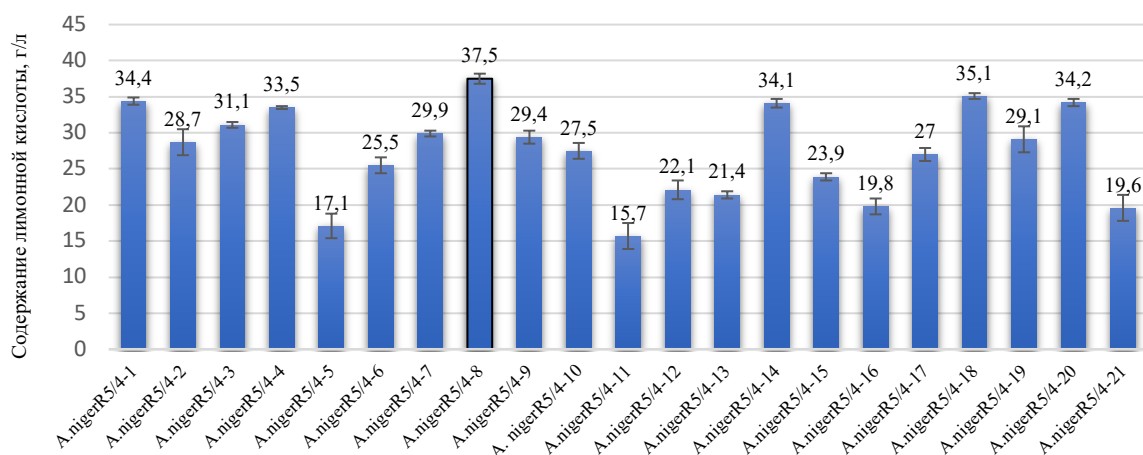


Рисунок 15 – Показатели выхода лимонной кислоты у мутантов после радиооблучения штамма *A. niger* CA20-11 (0,005)-10 дозой в 5,4 микрозивертов

Таким образом, родительский штамм *A. niger* CA20-11 был облучен дозой в 5,4 микрозивертов, что привело к получению нового штамма *A. niger* R5/4. Этот новый штамм обладает наибольшей кислотообразующей активностью, что, вероятно, делает его интересным для промышленного использования в процессах, связанных с производством кислот или других химических соединений [159]. Достигнутый уровень биосинтеза лимонной кислоты составил 37,5 г/л, что, согласно литературным данным [160, 161], соответствует диапазону значений, характерных для нативных или умеренно улучшенных штаммов, и подтверждает потенциал данного изолята для дальнейшей оптимизации условий культивирования и промышленного использования.

Для обеспечения сохранности полученного штамма и поддержания его физиолого-биохимических характеристик в стабильном состоянии была проведена криоконсервация культуры. В качестве криопротектора применяли 20 % глицерин, позволяющий предотвратить повреждение клеток при замораживании. Густую биомассу культуры переносили в полипропиленовые пробирки с завинчивающимися крышками, содержащие защитный раствор глицерина, после чего образцы помещались на длительное хранение при низких температурах.

3.3 Исследование физико-химических свойств растительного сырья, используемого для производства лимонной кислоты

После получения и сохранения активного мутантного штамма *A. niger* R5/4, обладающего повышенной кислотообразующей активностью (37,5 г/л лимонной кислоты), был проведён анализ свойств растительного сырья, используемого для приготовления углеводсодержащих гидролизатов. Физико-химические характеристики нативных крахмалов играют ключевую роль в эффективности процессов гидролиза и последующей биоконверсии углеводов в органические кислоты.

При получении гидролизатов для производства лимонной кислоты большое влияние на их технологические и ферментационные свойства оказывают физико-химические показатели используемого сырья, то есть нативных крахмалов различного ботанического происхождения (таблица 6).

Таблица 6 – Физико-химические свойства нативных крахмалов

Показатель	Нативный пшеничный крахмал	Нативный кукурузный крахмал
Содержание фосфатов, %	0,041±0,0005 ^a	0,044±0,001 ^a
Содержание липидов, %	0,481±0,015 ^b	0,568±0,012 ^b
Содержание протеина, %	1,711±0,055 ^c	1,440±0,013 ^c
Содержание минеральных веществ, %	0,201±0,012 ^a	0,22±0,033 ^a
Содержание амилозы, %	23,59±0,277 ^a	24,37±0,34 ^a
Примечание: Значения выражены как среднее ± стандартное отклонение. В пределах одной строки данные, не имеющие общих строчных букв, означают значимые различия (p < 0,05).		

В обоих образцах содержание фосфатов относительно низкое, однако в кукурузном крахмале этот показатель несколько выше (0,044%), чем в пшеничном (0,041%). Фосфаты могут влиять на вязкость крахмального клейстера и стабильность гидролизатов. Кукурузный крахмал характеризуется значительно более высоким содержанием липидов и с высоким содержанием амилозы, чем пшеничный. Соотношение амилозы и амилопектина в крахмале влияет на его способность к гидролизу и образование глюкозы, которая является субстратом для производства лимонной кислоты. В пшеничном крахмале содержание протеина выше (1,711%), чем в кукурузном (1,440%). Белки также могут влиять на процесс гидролиза, образуя пены и эмульсии, затрудняет фильтрацию что может привести к потерям продукта. Содержание минеральных веществ в обоих образцах сравнимо, с незначительным преобладанием в кукурузном крахмале (0,22% против 0,201% в пшеничном). Минеральные вещества могут влиять на активность ферментов, используемых в процессе гидролиза.

Таким образом, проведённое исследование позволило установить, что различия в физико-химических свойствах нативных крахмалов определяют особенности их гидролиза и биодоступность образующихся углеводов для *A. niger*. Полученные результаты могут служить основой для выбора оптимального субстрата и параметров ферментации при промышленном производстве лимонной кислоты, а также для дальнейшей оптимизации состава питательных сред и условий культивирования высокоактивных продуцентов, таких как *A. niger* R5/4

3.4 Выбор оптимальных режимов и состав питательной среды для производства лимонной кислоты

Виды рода *Aspergillus* широко применяются в промышленности для микробиологического получения лимонной кислоты, характеризуются аэробным ростом и гетеротрофным типом питания [162].

По данным Aboyeji et al. (2020) ключевыми факторами, влияющими на продуктивность процесса, являются время ферментации, pH среды, источник углерода и концентрация азота, оказывающие значительное влияние на метаболические пути синтеза органических кислот [163]. В связи с этим были проведены эксперименты по подбору оптимальных условий культивирования *A. niger* R5/4 и состава питательной среды.

Исследовались изменения выхода лимонной кислоты в зависимости от используемых гидролизатов крахмалов различного декстрозного эквивалента (ДЕ) (таблица 7).

Таблица 7 - Влияние декстрозного эквивалента гидролизата крахмала на выход органических кислот

Вид сырья	ДЭ, %	Выход органических кислот, %, в т.ч.	
		лимонной кислоты	глюконовой кислоты
Кукурузный крахмальный гидролизат	19±1	97,7±0,3	2,0±0,2
	29±1	97,1±0,5	2,2±0,5
	42±1	95,5±0,2	4,3±1,0
	74±1	92,8±1,1	6,9±0,6
Пшеничный крахмальный гидролизат	20±1	96,3±0,3	3,5±0,6
	31±1	94,1±0,5	5,3±0,7
	44±1	93,5±0,2	6,1±0,5
	77±1	91,5±0,5	8,3±1,1
Глюкоза	99±1	50,6±0,2	43,1±0,2

Для выявления закономерностей биосинтеза лимонной кислоты проводилось культивирование *A. niger* R5/4 в средах, содержащих гидролизаты кукурузного и пшеничного крахмала с различным декстрозным эквивалентом. Отмечено, что по мере увеличения степени гидролиза (ДЭ), то есть при возрастании доли редуцирующих сахаров в субстрате, выход лимонной кислоты снижается, тогда как образование глюконовой кислоты возрастает. Подобная зависимость объясняется тем, что при высоких концентрациях глюкозы в ферментационной среде происходит подавление активности фермента α -кетоглутаратдегидрогеназы, что приводит к перераспределению потоков углерода в сторону образования глюконовой кислоты – эффект, ранее описанный в исследованиях.

Анализ данных таблицы 7 показывает, что наиболее эффективным источником сырья для штамма *A. niger* R5/4 является кукурузный крахмальный гидролизат (мальтодекстрин) с ДЭ 19±1, тогда как пшеничный крахмальный гидролизат и глюкоза обеспечивают значительно меньший уровень биосинтеза. Такая предпочтительность обусловлена предварительной адаптацией штамма к крахмальным субстратам, что повысило его способность к их метаболическому

использованию. При культивировании на чистой глюкозе (ДЭ≈99%) отмечено смещение процесса ферментации в сторону образования глюконовой кислоты (табл. 7). Это связано с тем, что при высоких концентрациях глюкозы в среде активируется глюкозооксидазный путь, при котором часть субстрата окисляется до глюконовой кислоты. В результате снижается поток углерода через цикл трикарбоновых кислот и, как следствие, уменьшается накопление лимонной кислоты.

Как показано в предыдущих исследованиях (см. раздел 3.3), в пшеничном крахмале содержание протеина выше (1,711 %), чем в кукурузном (1,440 %). Избыточное количество белковых веществ может неблагоприятно влиять на процесс гидролиза, вызывая образование пены и эмульсий, что затрудняет фильтрацию и может приводить к потерям целевого продукта. В то же время кукурузный крахмал отличается более стабильным содержанием липидов и минеральных веществ, оптимальным соотношением амилозы и амилопектина, что обеспечивает высокую степень разжижения и равномерность гидролиза. Это способствует получению гидролизатов с устойчивым уровнем редуцирующих сахаров и более благоприятными условиями для роста *A. niger* и синтеза лимонной кислоты.

Следовательно, для дальнейших исследований и промышленного применения в качестве основного углеводного субстрата выбран мальтодекстрин кукурузного крахмала с ДЭ 19 ± 1 , обеспечивающий более стабильный процесс гидролиза, оптимальную концентрацию редуцирующих сахаров и высокий выход лимонной кислоты при ферментации штаммом *A. niger* R5/4. Дальнейшее повышение ДЕ привело к замедлению роста и накоплению остаточного сахара, что связано с его осмотическим ингибирующим эффектом.

Согласно литературным данным, для прорастания спор *A. niger* необходимы слабокислые условия с $\text{pH} \geq 5,0$. В этих условиях активируются гидролитические ферменты и начинается активный вегетативный рост мицелия. Однако во время интенсивного биосинтеза лимонной кислоты оптимальной является сильноокислая среда с $\text{pH} \leq 2,0$. При таких значениях наблюдается наиболее активное накопление ЛК. Поддержание низкого pH не только направляет метаболические пути на производство лимонной кислоты, но и ингибирует рост посторонней микрофлоры, что значительно снижает риск загрязнения. При повышении pH до 4,5-5,0 происходит значительный сдвиг в метаболизме, перенаправляющий его на синтез побочных продуктов – глюконовой и щавелевой кислот. В результате выход лимонной кислоты может снизиться до 80 % от максимального уровня. Поэтому строгий контроль кислотности среды на разных этапах процесса является одним из важнейших факторов, определяющих стабильность и эффективность биологического синтеза лимонной кислоты с использованием *A. niger* [122].

Как показали литературные данные, pH среды оказывает решающее влияние на активность ферментативных систем *A. niger*, определяя направление метаболизма и соотношение образующихся органических кислот. Наряду с кислотностью среды, важную роль в биосинтезе лимонной кислоты играют

температура и длительность культивирования, влияющие на скорость роста мицелия, интенсивность дыхательных процессов и накопление метаболитов.

Статистическое планирование эксперимента.

Для моделирования зависимости выхода лимонной кислоты от технологических параметров проведён множественный нелинейный регрессионный анализ с использованием квадратичной модели отклика с помощью Minitab Statistical Software. В качестве факторов рассматривались температура (T), начальный pH среды и длительность ферментации (τ). Модель включала линейные, квадратичные и попарные взаимодействия факторов.

Варируемые факторами служили:

- температура процесса T °C (28; 30; 32; 34);
- начальный pH среды (5,0; 5,5; 6,0; 6,5);
- время культивирования τ , ч (72; 120; 168).

Таким образом, общее число комбинаций факторов составило $4 \times 4 \times 3 = 48$ опытов. Матрица плана эксперимента и результаты определения выхода лимонной кислоты приведены в таблице 8.

Таблица 8 — План трёхфакторного эксперимента

№оп.	τ , час (x1)	pH (x2)	T °C (x3)	Y, г/л	№оп.	τ , час	pH	T °C.	Y, г/л
1	72	4,5	28	39,09	25	120	4,5	32	48,05
2	72	5,0	28	42,52	26	120	5,0	32	48,97
3	72	5,5	28	41,77	27	120	5,5	32	47,50
4	72	6,0	28	37,59	28	120	6,0	32	46,29
5	72	4,5	30	39,26	29	120	4,5	34	46,82
6	72	5,0	30	43,19	30	120	5,0	34	47,52
7	72	5,5	30	41,84	31	120	5,5	34	46,61
8	72	6,0	30	40,69	32	120	6,0	34	45,95
9	72	4,5	32	42,82	33	168	4,5	28	51,19
10	72	5,0	32	41,58	34	168	5,0	28	52,01
11	72	5,5	32	41,39	35	168	5,5	28	51,43
12	72	6,0	32	37,28	36	168	6,0	28	49,52
13	72	4,5	34	40,86	37	168	4,5	30	51,89
14	72	5,0	34	41,42	38	168	5,0	30	54,14
15	72	5,5	34	40,45	39	168	5,5	30	51,16
16	72	6,0	34	39,83	40	168	6,0	30	50,76
17	120	4,5	28	45,27	41	168	4,5	32	51,19
18	120	5,0	28	45,61	42	168	5,0	32	51,98
19	120	5,5	28	45,01	43	168	5,5	32	51,21
20	120	6,0	28	43,69	44	168	6,0	32	50,10
21	120	4,5	30	48,59	45	168	4,5	34	50,32
22	120	5,0	30	49,38	46	168	5,0	34	52,70
23	120	5,5	30	48,00	47	168	5,5	34	49,69
24	120	6,0	30	46,78	48	168	6,0	34	48,55

На основании трехфакторного эксперимента построена квадратичная регрессионная модель, описывающая зависимость выхода лимонной кислоты (Y) от температуры (T), начального значения pH и длительности ферментации (τ). Оценка коэффициентов выполнена в программе *Minitab Statistical Software* методом наименьших квадратов.

Качество аппроксимации проверяли путём сравнения предсказанных моделью значений с экспериментальными данными (таблица 9). В большинстве случаев расхождение между модельными и фактическими значениями не превышало 1-2 г/л, что свидетельствует о корректности выбранной структуры модели.

Таблица 9 – Сравнительные данные модели и эмпирических наблюдений

Obs	ЛК, Y , г/л Эмпирические наблюдения	Предсказанные значения выхода ЛК, г/л	Разница между предсказаниями уравнения и эмпирическими данными
1	2	3	4
1	39,090	39,718	-0,628
2	42,520	40,678	1,842
3	41,770	40,192	1,578
4	37,590	38,260	-0,670
5	39,260	41,270	-2,010
6	43,190	42,175	1,015
7	41,840	41,634	0,206
8	40,690	39,647	1,043
9	42,820	41,630	1,190
10	41,580	42,479	-0,899
11	41,390	41,883	-0,493
12	37,280	39,842	-2,562
13	40,860	40,797	0,063
14	41,420	41,591	-0,171
15	40,450	40,940	-0,490
16	39,830	38,844	0,986
17	45,270	46,174	-0,904
18	45,610	47,120	-1,510
19	45,010	46,620	-1,610
20	43,690	44,674	-0,984
21	48,590	47,539	1,051
22	49,380	48,429	0,951
23	48,000	47,874	0,126
24	46,780	45,873	0,907
25	48,050	47,711	0,339
26	48,970	48,547	0,423
27	47,500	47,936	-0,436
28	46,290	45,880	0,410
29	46,820	46,690	0,130
30	47,520	47,471	0,049

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4
31	46,610	46,806	-0,196
32	45,950	44,695	1,255
33	51,190	50,714	0,476
34	52,010	51,646	0,364
35	51,430	51,132	0,298
36	49,520	49,171	0,349
37	51,890	51,891	-0,001
38	54,140	52,768	1,372
39	51,160	52,198	-1,038
40	50,760	50,183	0,577
41	51,190	51,876	-0,686
42	51,980	52,697	-0,717
43	51,210	52,073	-0,863
44	50,100	50,003	0,097
45	50,320	50,668	-0,348
46	52,700	51,434	1,266
47	49,690	50,755	-1,065
48	48,550	48,630	-0,080

Согласно результатам ANOVA, модель статистически значима ($p < 0,001$), коэффициент детерминации составляет $R^2 = 95,57\%$, скорректированный коэффициент $R^2_{adj} = 94,52\%$, предсказанный коэффициент $R^2_{pred} = 92,98\%$, что указывает на высокую степень согласия модели с экспериментальными данными.

Таблица 10 – Коэффициенты регрессионной модели зависимости выхода лимонной кислоты от температуры, pH и времени ферментации

Термин	Coef	SE Coef	T-value	P-value	VIF
Constant	-2502,00	624,00	-4,01	0,000	-
Время, τ , час	-5,92	1,64	-3,61	0,001	173884,49
pH	-2,00	19,00	-0,11	0,915	4752,76
Температура, T , °C	191,40	48,90	3,91	0,000	192889,56
$\tau \cdot \tau$	-0,00423	0,00112	-3,78	0,001	4723,82
$pH \cdot pH$	-2,986	0,631	-4,73	0,000	576,50
$T \cdot T$	-3,727	0,965	-3,86	0,000	276331,76
$\tau \cdot pH$	-0,0392	0,0253	-1,55	0,131	1274,49
$\tau \cdot T$	0,2387	0,0649	3,68	0,001	321376,37
$pH \cdot T$	1,215	0,728	1,67	0,103	8038,11
Примечание – модель оценена методом наименьших квадратов в программе Minitab Statistical Software.					

Регрессионный анализ показал (таблица 10), что на выход лимонной кислоты статистически значимо влияют температура, квадратичные члены времени, pH и температуры, а также взаимодействие времени и температуры, что свидетельствует о наличии выраженной нелинейности и внутреннего оптимума ферментации.

Остальные факторы и взаимодействия оказались незначимыми при $p > 0,05$, что подтверждает доминирующую роль температурного режима и длительности процесса в формировании целевого отклика.

Полученное уравнение регрессии имеет вид (11):

$$Y = -2502 - 5,92X_1 - 2,0X_2 + 191,4X_3 - 0,00423X_1^2 - 2,986X_2^2 - 3,727X_3^2 - 0,0392X_1 \cdot X_2 + 0,2387X_1 \cdot X_3 + 1,215X_2 \cdot X_3 \quad (11)$$

где:

Y – выход лимонной кислоты, г/л;

X_1 – τ , время ферментации, ч;

X_2 – начальный pH среды;

X_3 – температура процесса, T °C.

Для оценки статистической значимости и адекватности модели провели комплекс диагностических проверок (рисунок 16).

Анализ диагностических графиков показал, что модель хорошо описывает экспериментальные данные. На диаграмме Парето четко проявилась значимость квадратичных эффектов факторов, а анализ остатков (нормальный вероятностный график, гистограмма и графики Residuals vs Fits) показал их близость к нормальному распределению и отсутствие систематических отклонений.

Все это говорит о корректности модели и возможности её применения для прогнозирования.

Для визуализации результатов построили поверхности отклика (рисунок 17), которые отражают влияние температуры и pH при фиксированной продолжительности ферментации (72, 120 и 168 ч).

Полученные зависимости помогли определить область максимальной продуктивности по лимонной кислоте. В результате трёхфакторного эксперимента установлено, что оптимальными условиями биосинтеза лимонной кислоты штаммом *Aspergillus niger* R5/4 оказались температура 30°C, начальный pH 5,0 и продолжительность культивирования 168 часов. Полученные результаты служат основой для последующей оптимизации состава питательной среды.

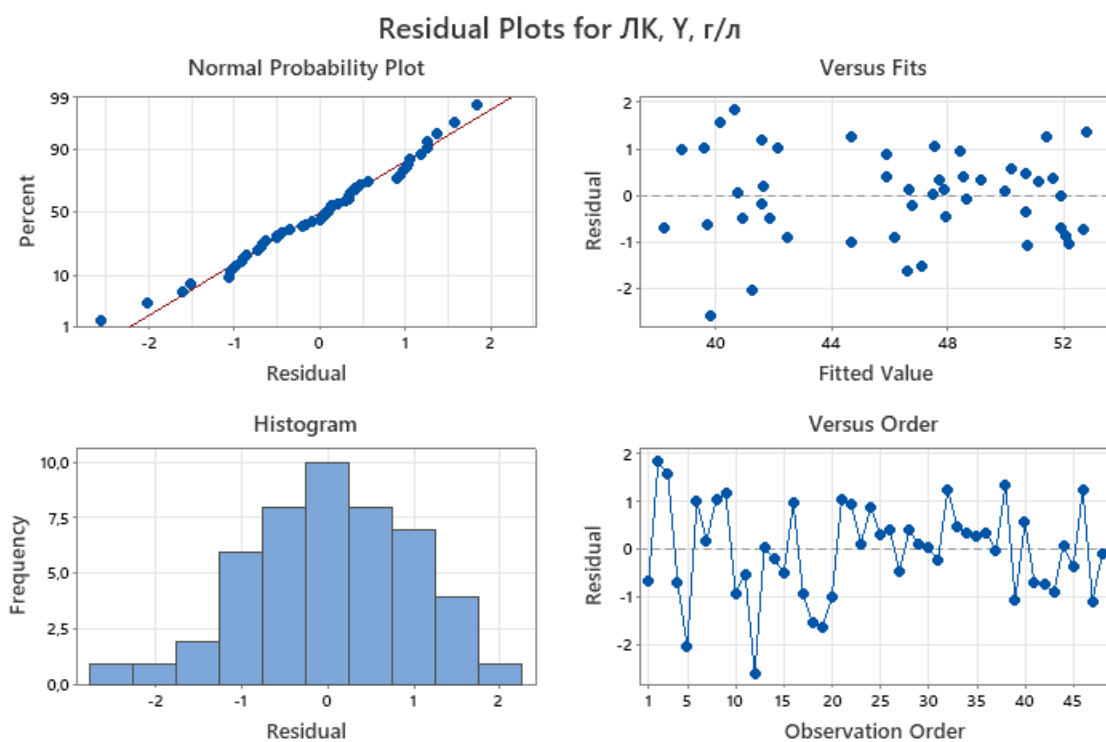
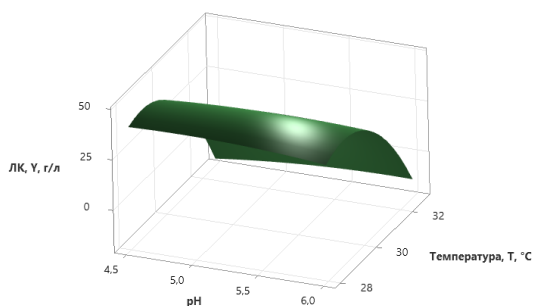
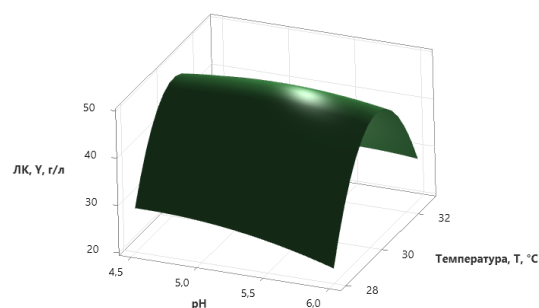


Рисунок 16 – Диагностические графики регрессионной модели по плану Бокса–Бенкена (Y, г/л)

Зависимость ЛК, г/л от pH и температуры при длительности процесса 72 часов



Зависимость ЛК, г/л от pH и температуры при длительности процесса 120 часов



Зависимость ЛК, г/л от pH и температуры при длительности процесса 168 часов

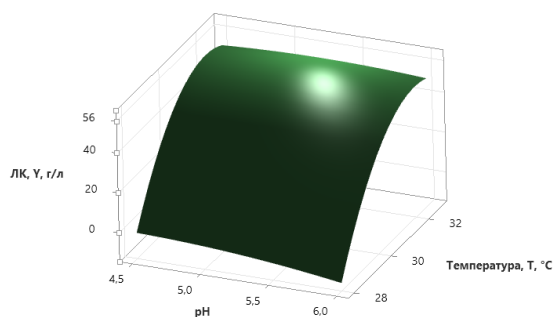


Рисунок 17 – Поверхности отклика, показывающие влияние pH и температуры на выход лимонной кислоты при продолжительности ферментации (72ч., 120., 168ч.)

Оптимизацию условий биосинтеза лимонной кислоты разбили на два этапа. Сперва подбирали физико-химические параметры культивирования, затем – состав минеральной части среды.

На первом этапе с помощью трёхфакторного эксперимента и методологии поверхности отклика удалось установить режим, при котором штамм *A. niger* R5/4 даёт максимум продуктивности: температура 30°C, начальный pH 5,0, длительность ферментации 168 часов. Эти параметры мы зафиксировали. Интенсивность биосинтеза лимонной кислоты зависит не только от внешних условий, но и от того, какие элементы поступают в среду. Поэтому на втором этапе мы изучали, как макро- и микроэлементы влияют на метаболическую активность того же штамма. В опытах варьировали концентрации (г/л) шести соединений: азота (NH_4NO_3), фосфора (KH_2PO_4), магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), цинка ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Эти соединения участвуют в регуляции ключевых ферментов, это – дегидрогеназ, аминотрансфераз, оксидоредуктаз. От их доступности зависит, куда пойдут окислительно-восстановительные процессы и транспорт электронов, а значит - будет ли клетка накапливать лимонную кислоту или переключится на что-то другое.

Оптимальные уровни минеральных добавок определяли методом поверхности отклика на основе плана Бокса-Бенкена. План включал 6 факторов, всего 54 постановки, из них 5 центральных точек. Этого достаточно, чтобы корректно оценить линейные и квадратичные эффекты, и двусторонних взаимодействий этих факторов.

Полученные и предсказанные значения выхода лимонной кислоты сведены в таблицу 11.

Таблица 11 - Матрица плана Бокса-Бенкена с предсказанными значениями выхода лимонной кислоты

Std Order	Run Order	Pt Type	Bloc ks	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	ЛК, Y г/л	Биомасса г/л
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	1	2	1	4,0	2,0	0,25	0,0005	0,0095	0,065	50,31	1,783
10	2	2	1	2,5	5,0	0,10	0,0015	0,0020	0,065	49,85	1,938
44	3	2	1	4,0	3,5	0,40	0,0015	0,0095	0,050	48,26	1,805
16	4	2	1	2,5	5,0	0,40	0,0015	0,0170	0,065	48,92	1,988
13	5	2	1	2,5	2,0	0,10	0,0015	0,0170	0,065	49,65	1,855
18	6	2	1	2,5	3,5	0,40	0,0005	0,0095	0,050	47,88	1,738
42	7	2	1	4,0	3,5	0,10	0,0015	0,0095	0,050	49,72	1,692
12	8	2	1	2,5	5,0	0,40	0,0015	0,0020	0,065	49,38	1,938
19	9	2	1	2,5	3,5	0,10	0,0025	0,0095	0,050	48,15	1,805
36	10	2	1	2,5	5,0	0,25	0,0015	0,0170	0,050	50,88	1,855
24	11	2	1	2,5	3,5	0,40	0,0025	0,0095	0,080	47,26	1,888
40	12	2	1	2,5	5,0	0,25	0,0015	0,0170	0,080	50,12	1,938
5	13	2	1	1,0	2,0	0,25	0,0025	0,0095	0,065	48,89	1,762
45	14	2	1	1,0	3,5	0,10	0,0015	0,0095	0,080	48,26	1,738

Продолжение таблицы 11

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	15	2	1	1,0	2,0	0,25	0,0005	0,0095	0,065	49,65	1,679
25	16	2	1	1,0	3,5	0,25	0,0005	0,0020	0,065	48,92	1,696
51	17	0	1	2,5	3,5	0,25	0,0015	0,0095	0,065	50,03	1,838
14	18	2	1	2,5	5,0	0,10	0,0015	0,0170	0,065	49,92	2,038
17	19	2	1	2,5	3,5	0,10	0,0005	0,0095	0,050	49,38	1,705
43	20	2	1	1,0	3,5	0,40	0,0015	0,0095	0,050	47,12	1,755
33	21	2	1	2,5	2,0	0,25	0,0015	0,0020	0,050	51,26	1,738
46	22	2	1	4,0	3,5	0,10	0,0015	0,0095	0,080	49,12	1,775
32	23	2	1	4,0	3,5	0,25	0,0025	0,0170	0,065	49,38	1,938
47	24	2	1	1,0	3,5	0,40	0,0015	0,0095	0,080	46,88	1,838
20	25	2	1	2,5	3,5	0,40	0,0025	0,0095	0,050	47,92	1,805
21	26	2	1	2,5	3,5	0,10	0,0005	0,0095	0,080	48,62	1,788
26	27	2	1	4,0	3,5	0,25	0,0005	0,0020	0,065	50,88	1,772
28	28	2	1	4,0	3,5	0,25	0,0025	0,0020	0,065	50,62	1,855
8	29	2	1	4,0	5,0	0,25	0,0025	0,0095	0,065	49,88	1,888
50	30	0	1	2,5	3,5	0,25	0,0015	0,0095	0,065	50,03	1,838
3	31	2	1	1,0	5,0	0,25	0,0005	0,0095	0,065	48,12	1,805
23	32	2	1	2,5	3,5	0,10	0,0025	0,0095	0,080	48,38	1,888
54	33	0	1	2,5	3,5	0,25	0,0015	0,0095	0,065	50,03	1,838
22	34	2	1	2,5	3,5	0,40	0,0005	0,0095	0,080	47,66	1,871
30	35	2	1	4,0	3,5	0,25	0,0005	0,0170	0,065	50,12	1,855
41	36	2	1	1,0	3,5	0,10	0,0015	0,0095	0,050	49,02	1,655
34	37	2	1	2,5	5,0	0,25	0,0015	0,0020	0,050	50,38	1,788
27	38	2	1	1,0	3,5	0,25	0,0025	0,0020	0,065	48,66	1,779
39	39	2	1	2,5	2,0	0,25	0,0015	0,0170	0,080	49,88	1,938
48	40	2	1	4,0	3,5	0,40	0,0015	0,0095	0,080	47,88	1,858
53	41	0	1	2,5	3,5	0,25	0,0015	0,0095	0,065	50,03	1,838
37	42	2	1	2,5	2,0	0,25	0,0015	0,0020	0,080	50,62	1,821
49	43	0	1	2,5	3,5	0,25	0,0015	0,0095	0,065	50,03	1,838
6	44	2	1	4,0	2,0	0,25	0,0025	0,0095	0,065	50,05	1,866
9	45	2	1	2,5	2,0	0,10	0,0015	0,0020	0,065	50,92	1,738
4	46	2	1	4,0	5,0	0,25	0,0005	0,0095	0,065	50,38	1,805
38	47	2	1	2,5	5,0	0,25	0,0015	0,0020	0,080	49,92	1,871
52	48	0	1	2,5	3,5	0,25	0,0015	0,0095	0,065	50,03	1,838
31	49	2	1	1,0	3,5	0,25	0,0025	0,0170	0,065	48,92	1,862
35	50	2	1	2,5	2,0	0,25	0,0015	0,0170	0,050	51,12	1,821
15	51	2	1	2,5	2,0	0,40	0,0015	0,0170	0,065	49,38	1,938
11	52	2	1	2,5	2,0	0,40	0,0015	0,0020	0,065	50,12	1,855
29	53	2	1	1,0	3,5	0,25	0,0005	0,0170	0,065	49,18	1,779
7	54	2	1	1,0	5,0	0,25	0,0025	0,0095	0,065	48,38	1,888

Экспериментальные данные были обработаны в программе Minitab с использованием плана Бокса-Бенкена. Итоговая квадратичная модель для выхода лимонной кислоты Y (г/л) в зависимости от шести кодированных факторов X_1 - X_6 (-1, 0, +1) имеет вид:

Y – выход лимонной кислоты, г/л;

X_1 – концентрация NH_4NO_3 (г/л);

X_2 – концентрация KH_2PO_4 (г/л);

X_3 – концентрация $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (г/л);

X_4 – концентрация $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (г/л);

X_5 – концентрация $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (г/л);

X_6 – концентрация $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (г/л).

В закодированных переменных уравнение поверхности отклика имеет вид (12):

$$Y = 46,01 + 1,119X_1 - 1,914X_2 + 17,93X_3 + 752X_4 - 93,4X_5 + 142,9X_6 - 0,1732X_1 \times X_1 + 0,1481X_2 \times X_2 - 46,95X_3 \times X_3 - 515972X_4 \times X_4 + 8190X_5 \times X_5 - 1340X_6 \times X_6 + 0,1078X_1 \times X_2 + 0,322X_1 \times X_3 - 30,8X_1 \times X_4 - 28,00X_1 \times X_5 + 0,11X_1 \times X_6 - 0,222X_2 \times X_3 + 65,0X_2 \times X_4 + 17,78X_2 \times X_5 + 3,67X_2 \times X_6 + 925X_3 \times X_4 + 0,0X_3 \times X_5 + 10,8X_3 \times X_6 - 8000X_4 \times X_5 + 4583X_4 \times X_6 - 1000X_5 \times X_6 \quad (12)$$

Квадратичная модель, построенная в программе Minitab статистически значима: $F = 24,77$; $p < 0,0001$. Коэффициент детерминации R^2 составил 96,26 %. скорректированный R^2 (с учетом 27 членов) - 92,37% что говорит об адекватном описании данных. Прогностическая способность модели R^2_{pred} составила 80,45% – это достаточно, чтобы использовать уравнение для предсказания выхода лимонной кислоты в изученном диапазоне факторов. Сводка по модели приведена в таблице 12.

Таблица 12 – Дисперсионный анализ (ANOVA)

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
1	2	3	4	5	6
Constant	50,030	0,121	414,15	0,000	
NH_4NO_3	0,6083	0,0604	10,07	0,000	1,00
KH_2PO_4	-0,2383	0,0604	-3,95	0,001	1,00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-0,5137	0,0604	-8,51	0,000	1,00
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-0,1921	0,0604	-3,18	0,004	1,00
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-0,1692	0,0604	-2,80	0,009	1,00
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	-0,2704	0,0604	-4,48	0,000	1,00
$NH_4NO_3 * NH_4NO_3$	-0,3897	0,0923	-4,22	0,000	1,30
$KH_2PO_4 * KH_2PO_4$	0,3332	0,0923	3,61	0,001	1,30
$MgSO_4 \cdot 7H_2O * MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-1,0564	0,0923	-11,45	0,000	1,30
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O * ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-0,5160	0,0923	-5,59	0,000	1,30
$FeSO_4 \cdot 7H_2O * FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4607	0,0923	4,99	0,000	1,30
$CuSO_4 \cdot 5H_2O * CuSO_4 \cdot 5H_2O$	-0,3014	0,0923	-3,27	0,003	1,30
$NH_4NO_3 * KH_2PO_4$	0,243	0,105	2,32	0,029	1,00
$NH_4NO_3 * MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,073	0,105	0,69	0,494	1,00
$NH_4NO_3 * ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-0,0463	0,0740	-0,63	0,537	1,00
$NH_4NO_3 * FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-0,315	0,105	-3,01	0,006	1,00
$NH_4NO_3 * CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,003	0,105	0,02	0,981	1,00
$KH_2PO_4 * MgSO_4 \cdot 7H_2O$	-0,050	0,105	-0,48	0,637	1,00
$KH_2PO_4 * ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,098	0,105	0,93	0,360	1,00
$KH_2PO_4 * FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2000	0,0740	2,70	0,012	1,00
$KH_2PO_4 * CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,082	0,105	0,79	0,437	1,00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O * ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,139	0,105	1,33	0,196	1,00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O * FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,000	0,105	0,00	1,000	1,00

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} * \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0244	0,0740	0,33	0,744	1,00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} * \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-0,060	0,105	-0,57	0,571	1,00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} * \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,069	0,105	0,66	0,517	1,00
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} * \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-0,112	0,105	-1,08	0,292	1,00

Все 6 линейных факторов – NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – оказались значимы ($p < 0.01$). Самый сильный эффект давал сульфат магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) $t = -8,51$; $p < 0,0001$ (таблица 12). Значимыми оказались квадратичные члены $F=68.87$; $p < 0.001$, то есть зависимость выхода от концентраций элементов носила нелинейный характер с выраженным внутренним оптимумом.

Из парных взаимодействий достоверными были:

- $\text{NH}_4\text{NO}_3 \times \text{KH}_2\text{PO}_4$ ($p = 0.029$),
- $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($p = 0.012$),
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \times \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($p=0.009$).

Сам факт, что часть взаимодействий оказалась значимой, а часть – нет, говорит о наличии в среде и синергетических, и антагонистических эффектов.

Остатки вели себя нормально (рисунок 18): их распределение не отклонялось от теоретического, так что модель не нарушает предпосылок регрессионного анализа.

Для наглядности мы построили в Minitab трёхмерные поверхности отклика – на каждом графике варьировали два фактора, остальные фиксировали на центральной точке (рисунок 19).

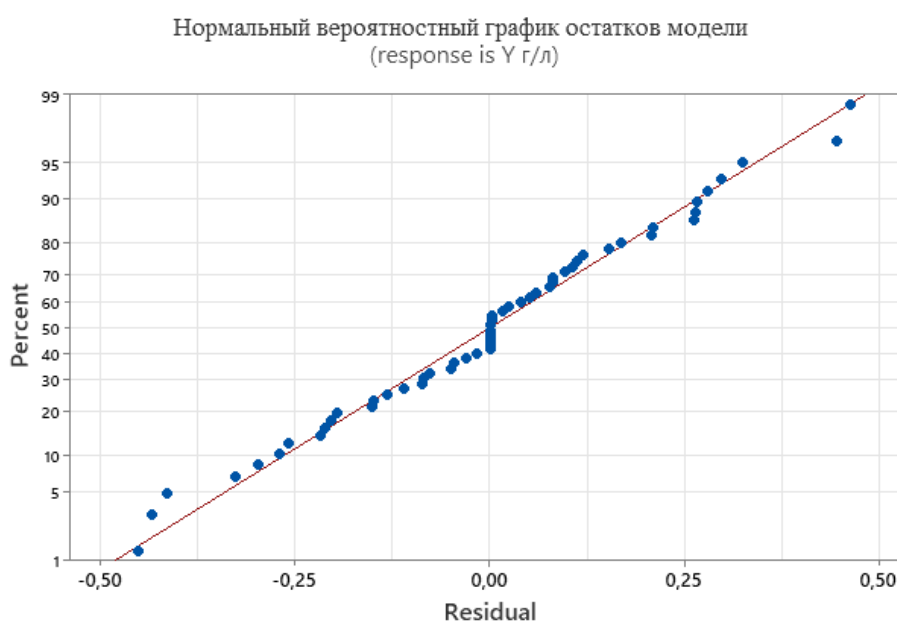
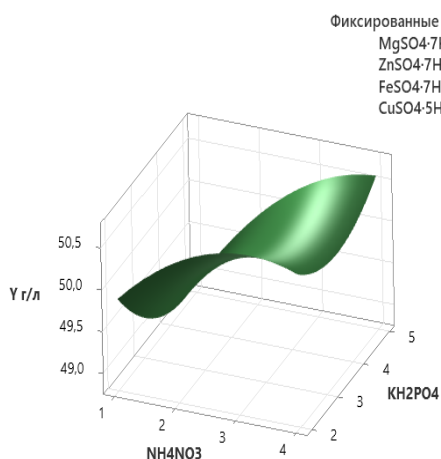


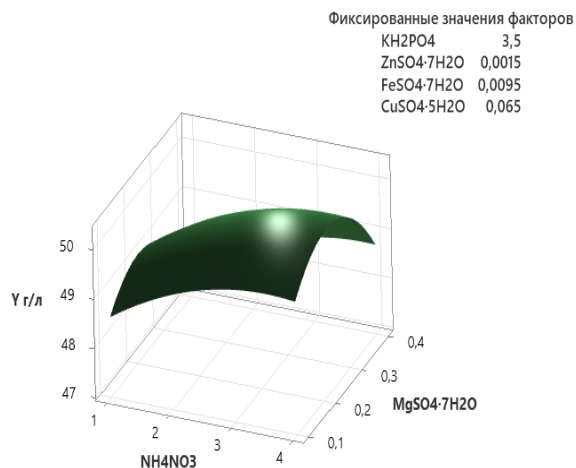
Рисунок 18 – Нормальный вероятностный график остатков (Normal Probability Plot), отклик – Y, г/л

Точки на рисунке 18 плотно легли вдоль теоретической прямой. Это говорит о том, что остатки распределены нормально и систематических смещений в модели нет. Некоторый разброс в крайних точках – явление случайное, на адекватность модели он не повлиял.

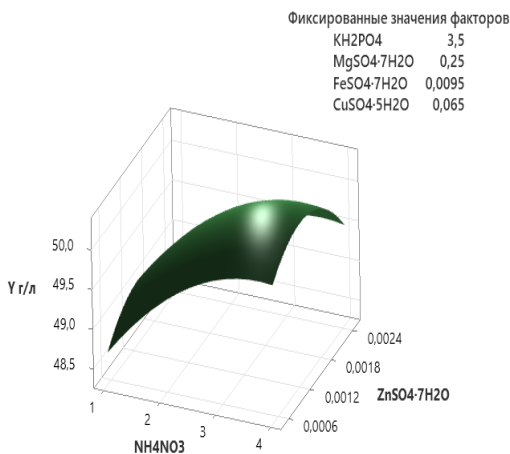
Основные поверхности отклика, показывающие, как факторы среды сказываются на выходе лимонной кислоты, представлены на рисунке 19.



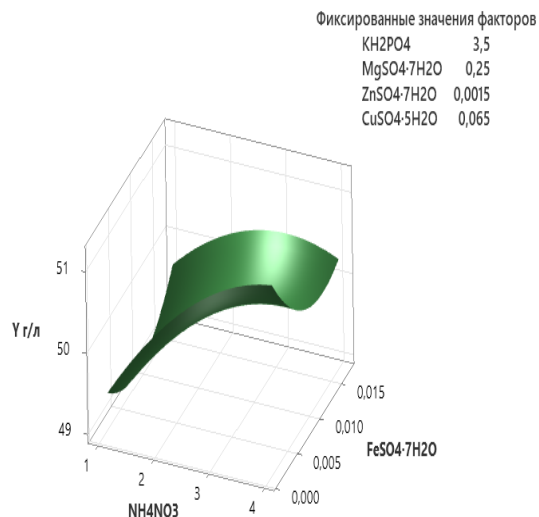
Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении NH_4NO_3 и KH_2PO_4



Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении NH_4NO_3 и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

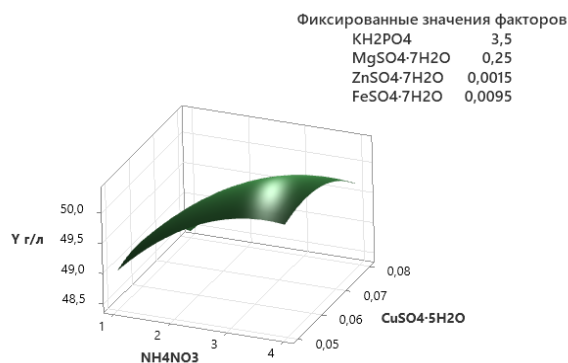


Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении NH_4NO_3 и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

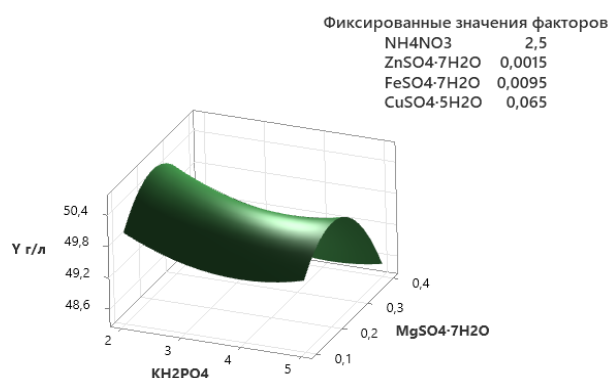


Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении NH_4NO_3 и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

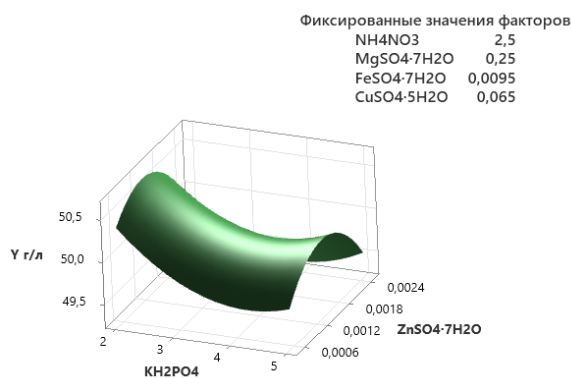
Рисунок 19 – Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении двух факторов (остальные зафиксированы на центральном уровне), лист 1



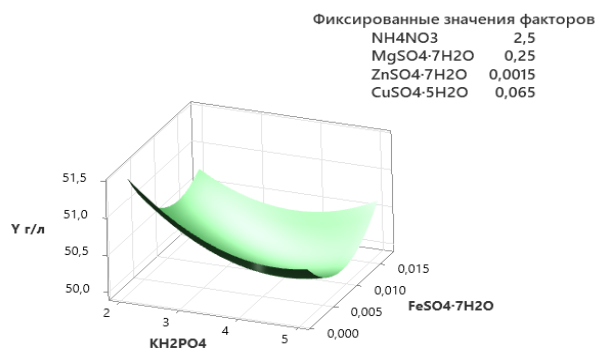
Поверхности отклика выхода
лимонной кислоты при изменении и
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



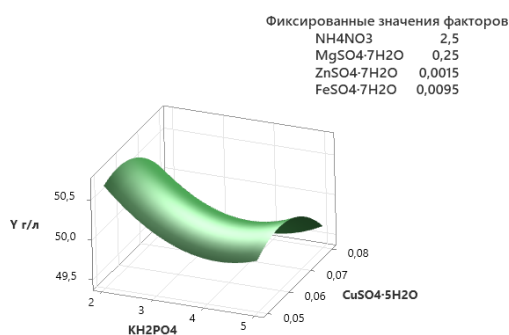
Поверхности отклика выхода
лимонной кислоты при изменении
 KH_2PO_4 и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



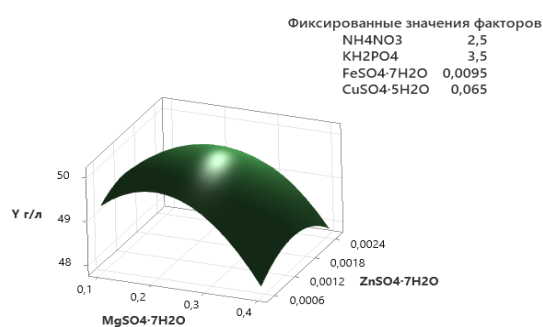
Поверхности отклика выхода
лимонной кислоты при изменении
 KH_2PO_4 и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



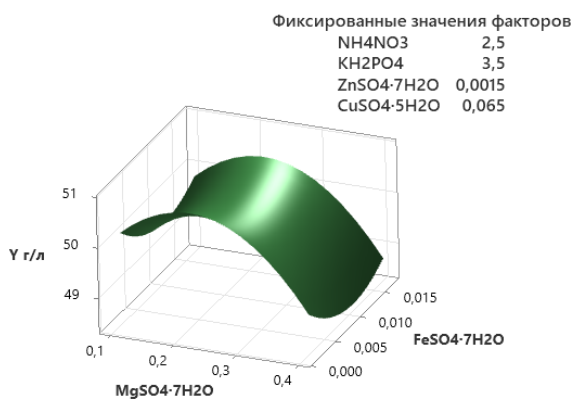
Поверхности отклика выхода
лимонной кислоты при изменении
 KH_2PO_4 и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



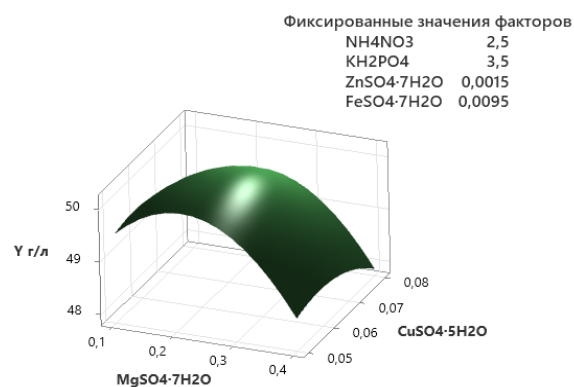
Поверхности отклика выхода
лимонной кислоты при изменении
 KH_2PO_4 и $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



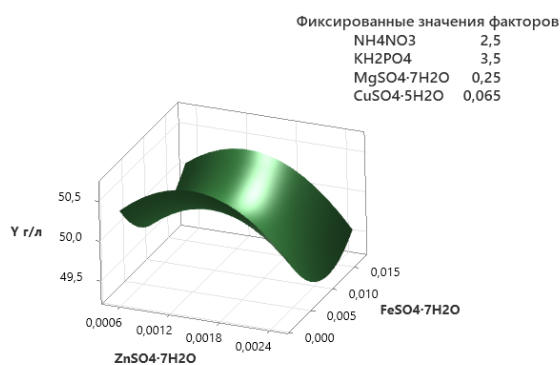
Поверхности отклика выхода
лимонной кислоты при изменении
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



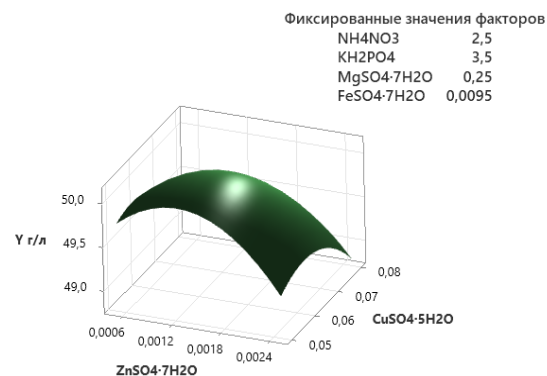
Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении MgSO₄·7H₂O и FeSO₄·7H₂O



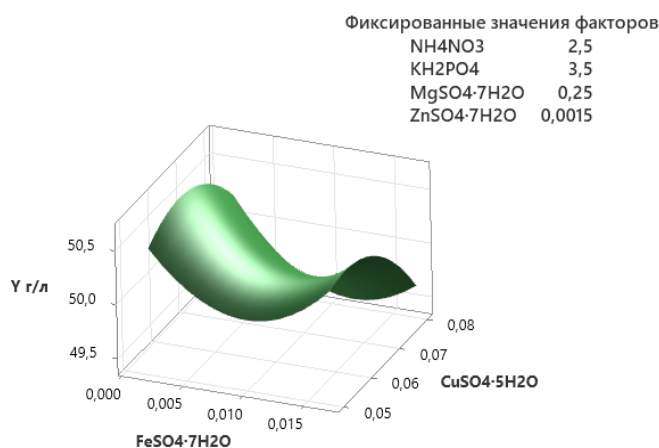
Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении MgSO₄·7H₂O и CuSO₄·5H₂O



Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении ZnSO₄·7H₂O и FeSO₄·7H₂O



Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении ZnSO₄·7H₂O × CuSO₄·5H₂O



Поверхности отклика выхода лимонной кислоты при изменении FeSO₄·7H₂O × CuSO₄·5H₂O

Из пятнадцати поверхностей отклика, построенных для всех пар факторов среды (рис. 19), почти все показали нелинейный характер зависимости с чётко выраженным внутренним оптимумом. Это означает, что для большинства сочетаний элементов можно выделить область концентраций, обеспечивающую максимальный выход лимонной кислоты. Во всех моделях, включающих нитрат аммония (NH_4NO_3), наблюдались монотонные или умеренно выпуклые зависимости, при которых максимальные значения отклика формировались при концентрациях 3,5–4,0 г/л; в то время как дигидрофосфат калия (KH_2PO_4) проявлял стабилизирующее действие, обеспечивая повышенный выход лимонной кислоты в диапазоне 4,0 - 4,5 г/л. Поверхности, включающие сульфат магния семиводный ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), сульфат цинка семиводный ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), сульфат железа(II) семиводный ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и сульфат меди(II) пятиводный ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), демонстрировали выраженную параболическую кривизну, что согласуется с высокой значимостью квадратичных терминов модели; максимальные значения отклика формировались в узких диапазонах концентраций данных микроэлементных солей: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,20-0,22 г/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0013-0,0016 г/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,009-0,011 г/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,060-0,070 г/л.

Многокритериальная оптимизация откликов, выполненная в Minitab Statistical Software, была направлена на одновременное максимизирование концентрации лимонной кислоты (Y , г/л) и биомассы *A. niger* R5/4 (г/л). Расчёт через функцию желательности (desirability) дал единственную точку, в которой оба показателя выходят на максимум (см. рис. 20).

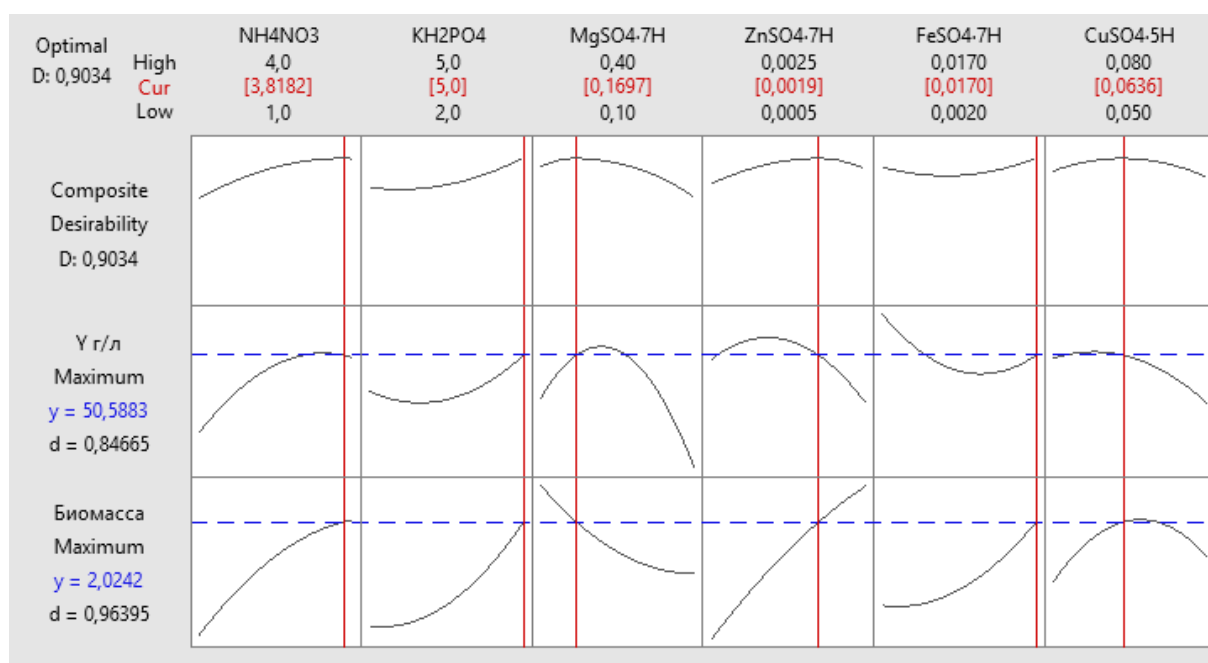


Рисунок 20 – График функции желательности, показывающий оптимальные значения макро- и микроэлементов для максимального выхода лимонной кислоты

Красные вертикальные линии на графике (рис. 20) соответствуют оптимальным уровням факторов, которые нашла модель: NH_4NO_3 – 3,8 г/л; KH_2PO_4 – 5,0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,17 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0018 г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0170 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,06 г/л. По кривым на отдельных панелях видно, как меняется функция желательности и каждый из откликов, если один фактор отклоняется от оптимума, а остальные зафиксированы.

В оптимальной точке выход лимонной кислоты достигает 50,5 г/л (индивидуальная желательность $d = 0,8467$), биомасса – 2,0 г/л ($d = 0,96395$). Общая желательность D составила 0,9034 – это высокий показатель, то есть модель хорошо согласует обе цели, а найденное сочетание факторов действительно эффективно. Окрестности оптимума выглядят так, как и следует ожидать для квадратичной модели: при сбалансированных концентрациях макро- и микроэлементов виден чёткий локальный максимум, а любое отклонение от него снижает D .

Таким образом, штамм *A. niger R5/4* даёт максимум продуктивности при умеренно повышенных уровнях азота и фосфора и точно подобранных концентрациях магния, цинка, железа и меди. Именно этот состав минерального питания можно считать оптимальным для биосинтеза лимонной кислоты.

В целом нам удалось доработать и экспериментально оптимизировать ферментационную среду, добившись от штамма *A. niger R5/4* максимального выхода лимонной кислоты. Результаты ещё раз подчёркивают, насколько сильно минеральное питание регулирует метаболизм гриба, и дают базу для следующих шагов по оптимизации процесса.

Следующая серия экспериментов была посвящена влиянию органических спиртов (метанола, этанола, изопропанола) и дозы инокулята на продуктивность *A. niger R5/4*. По литературным данным, низкомолекулярные спирты способны вмешиваться в метаболизм грибов: они не только служат добавочным источником углерода, но и влияют на проницаемость клеточных мембран и транспорт метаболитов.

Культивирование проводили на жидкой питательной среде, содержащей мальтодекстрин кукурузного крахмала с декстрозным эквивалентом (ДЭ) 19% в концентрации ферментируемых сахаров 140 г/л, а также оптимизированный минеральный состав: NH_4NO_3 – 3,8 г/л; KH_2PO_4 – 5,0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,17 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0018 г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0170 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,06 г/л.

В среду вносили 1, 2 и 3% спиртов; инкубацию проводили при температуре 30 °С, отбор проб выполнялся через 72, 120 и 168 часов (табл. 13).

Таблица 13 - Влияние добавления органических спиртов на производство лимонной кислоты *A. niger R5/4*

Добавляемый спирт		Количество лимонной кислоты, г/л		
1	2	3	4	5
Название	Концентрация, %	72 ч	120 ч	168 ч

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4	5
Контроль	0	56,94±0,3	63,51±0,5	68,62±0,2
Метанол	1,0	24,82±0,3	32,12±0,4	40,15±0,1
Метанол	2,0	42,34±0,1	51,83±0,5	56,94±0,2
Метанол	3,0	30,6±0,2	38,69±0,3	45,26±0,5
Этанол	1,0	59,13±0,9	64,97±0,2	70,08±0,2
Этанол	2,0	58,4±0,7	63,51±0,1	69,35±0,4
Этанол	3,0	60,59±0,7	67,16±0,3	79,57±0,8
Изопропанол	1,0	10,95±0,3	15,33±0,6	22,63±0,2
Изопропанол	2,0	6,57±0,1	10,22±0,3	11,68±0,4
Изопропанол	3,0	0,1±0,2	1,46±0,4	1,46±0,1

Известно, что метанол и изопропанол могут влиять на метаболизм микроорганизмов, таких как грибы или бактерии, что может привести к изменениям в процессе биосинтеза лимонной кислоты.

Полученные результаты показывают, что низкие концентрации метанола (до 2%) способны незначительно стимулировать синтез лимонной кислоты (56,9 г/л), вероятно, за счёт увеличения проницаемости клеточных мембран и облегчённого транспорта метаболитов. Однако при концентрации 3% наблюдается выраженный ингибирующий эффект, обусловленный токсическим воздействием метанола на клетки и нарушением баланса энергетического обмена. Williamson, J. R [164] заявил, что этанол может быть преобразован в ацетил-КоА, который действует как предшественник лимонной кислоты. Этанол также действует как источник углерода. Снижение роста и производства лимонной кислоты при более высоком уровне этанола может быть связано с его токсическим действием.

Сообщается, что метанол влияет на проницаемость клеточных мембран, что способствует большему выведению лимонной кислоты. Метанол может быть токсичным для организма в больших количествах и приводить к различным патологическим процессам, включая повреждение клеток и мембран. Chaudhary и др. предположили, что метанол помогает кондиционировать мицелии для производства лимонной кислоты, не нарушая их метаболизм. Выход ЛК при добавлении изопропанола был меньше, что свидетельствует о наименьшей стимуляции изопропанолом [165].

Проведенные исследования показали, что добавление в ферментационную среду этилового спирта в количестве 3% (79,57 г/л) стимулирует выработку штаммом *A. niger* R5/4 лимонной кислоты.

По совокупности проведенных исследований установлены пути регуляции метаболизма штамма, усовершенствованы оптимальные режимы процесса ферментации, обеспечивающие продуктивный биосинтез лимонной кислоты. Установлено, что при температурном режиме 30°C., кислотности среды pH 5.0, добавлении в среду 3% этилового спирта и инкубационном периоде 168 ч штамм *A. niger* R5/4 синтезирует наибольшее количество лимонной кислоты.

Для оценки влияния количества посевного материала были проведены дополнительные эксперименты с варьированием уровня инокулята от 1 до 5% (рис. 21).

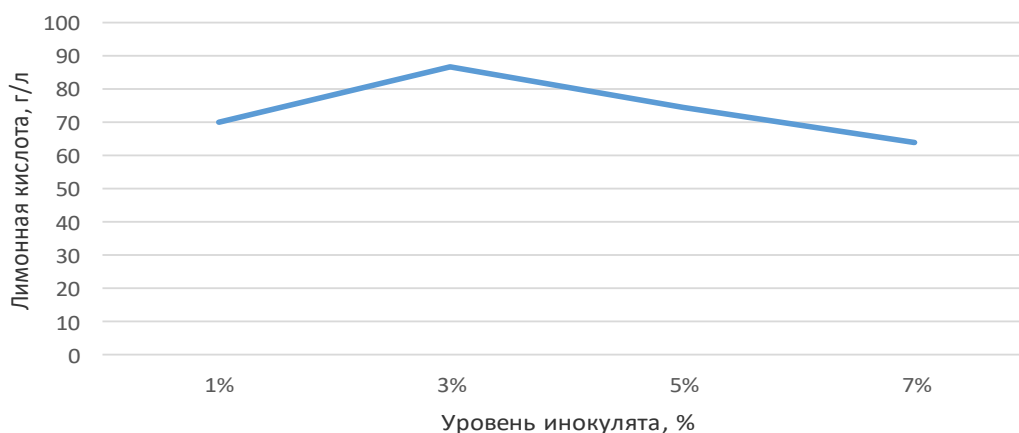


Рисунок 21 -Влияние различных уровней инокулята на выработку лимонной кислоты

Как видно из рисунка, максимальный выход лимонной кислоты составляет 85,4 г/л. и достигался при использовании 3% инокулята. Увеличение дозы свыше 3% приводило к снижению продуктивности, что объясняется чрезмерным развитием мицелия и увеличением вязкости культуральной среды, затрудняющим диффузию кислорода и питательных веществ.

При увеличении уровня посевного материала более 3% продукция лимонной кислоты снижалась, это может быть связано с чрезмерным ростом мицелия, который увеличивает вязкость среды и, следовательно, вызывает снижение выработки лимонной кислоты. Повышение вязкости среды, вызванное ростом мицелия, также может затруднить доступ микроорганизмов к питательным веществам и кислороду, что может ограничить их способность производить лимонную кислоту. Результаты исследований Maharani и др., выявили, что максимальное производство лимонной кислоты (83,24 г/л) достигается при размере посевного материала 5% [109, стр.703].

В работе Ali и др. [67, 20с.], сообщается, что наибольшее количество лимонной кислоты было получено при использовании 1% инокулята (96,86 г/л).

Таким образом, на основании совокупности экспериментальных данных и результатов оптимизации методом поверхностей отклика установлено, что максимальный биосинтез лимонной кислоты штаммом *A. niger R5/4* достигается при строго определённых параметрах культивирования. Оптимальными условиями являются температура 30 °С, начальный pH 5,0, продолжительность ферментации 168 ч. Наиболее эффективный состав ферментационной среды включает мальтодекстрин кукурузного крахмала с ДЭ = 19% (концентрация ферментируемых сахаров 140 г/л), NH_4NO_3 – 3,8 г/л; KH_2PO_4 – 5,0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,17 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0018 г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0170 г/л;

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,06 г/л. Добавление 3 % этилового спирта и использование 3 % инокулята способствуют повышению метаболической активности продуцента и усилению направленности процесса в сторону синтеза органических кислот.

При совокупности указанных технологических факторов и оптимизированного элементного состава среды максимальный выход лимонной кислоты составил 85,4 г/л что подтверждает его пригодность для масштабирования.

3.5 Оптимизация параметров озонирования ферментера при подготовке к биосинтезу лимонной кислоты штаммом *A. niger* R5/4

При переходе от лабораторных условий к масштабированным условиям опытной апробации одним из определяющих факторов, обеспечивающих воспроизводимость, устойчивость и эффективность процесса биосинтеза лимонной кислоты, является влияние параметров внешней среды. В условиях увеличенных объемов ферментации существенно возрастает значимость температурного режима, уровня pH и интенсивности перемешивания. Отклонение указанных параметров от оптимальных значений может приводить к изменению метаболической активности и продуктивности штамма *A. niger* R5/4, а также негативно сказываться на стабильности процесса накопления лимонной кислоты.

В связи с этим оптимизация параметров технологической среды является необходимым условием при масштабировании процесса биосинтеза лимонной кислоты в условиях опытной апробации. Одновременно с параметрами ферментации существенное значение имеет эффективность подготовки и стерилизации ферментера, поскольку наличие посторонней микрофлоры может существенно снижать выход целевого продукта и нарушать стабильность процесса.

В лабораторных условиях стерилизация ферментера осуществляется автоклавированием, однако в промышленных системах такие методы становятся энергозатратными и малоэффективными при сложной конфигурации аппаратуры и значительной протяжённости трубопроводов. В связи с этим в последние годы всё большее внимание уделяется альтернативным методам стерилизации, одним из которых является применение озона.

Озон (O_3), растворённый в воде, обладает выраженными бактерицидными, фунгицидными и спороцидными свойствами. При контакте с клетками микроорганизмов он разрушает клеточные мембраны, окисляет липиды и белковые структуры клеточной стенки, а также повреждает нуклеиновые кислоты. В результате происходит быстрая инактивация бактерий, дрожжей, спор и других микроорганизмов, способных вызывать контаминацию ферментационного процесса [166].

По сравнению с традиционной стерилизацией насыщенным паром, озонирование не требует нагрева оборудования до высоких температур, исключает термическое воздействие на материалы биореактора и обеспечивает равномерную обработку труднодоступных участков – фитингов, прокладок,

датчиков, клапанов и внутренних поверхностей ферментера. Это особенно важно при культивировании *Aspergillus*, поскольку она может образовывать плотные колонии в «мертвых зонах» оборудования.

Перед началом ферментации оборудование стерилизовали озоном. Озонированную воду вводили в ферментер мелкодисперсным спреем, который равномерно распределялся по всему внутреннему объёму и обрабатывал все контактные поверхности. В основе стерилизации лежит комбинированный механизм:

- поверхности оборудования обрабатываются озонированной водой в виде спрея;
- поток воды механически удаляет микроорганизмы и загрязнения с поверхностей;
- растворённый (остаточный) озон завершает процесс инактивации микроорганизмов за счёт окислительного воздействия.

На практике режимы озонирования определяются параметрами подачи озона (концентрация озона и скорость подачи). Для экспериментальной оценки рассматривались режимы, различающиеся по концентрации и скорости подачи озона, что позволяло получать различные уровни остаточного озона в воде (таблица 14).

Таблица 14 — Режимы озонирования, применяемые при стерилизации ферментера

Режим	Концентрация озона, ppm	Скорость подачи, г/мин	Остаточный озон в воде, ppm	Выход ЛК, %
Традиционная стерилизация насыщенным паром (0,5 атм. давл.)	—	—	—	70,4 ± 1,4
1	100	5	0,5	72,1 ± 1,3
2	200	10	1,0	74,8 ± 1,1
3	300	15	1,5	72,9 ± 1,7

Сравнение показало, что традиционная стерилизация насыщенным паром обеспечивает базовый уровень микробной чистоты, однако её эффективность оказалась ниже по сравнению с озонированием: выход лимонной кислоты составил 70,4 ± 1,4 %. Это связано с тем, что паровая стерилизация в условиях лабораторного ферментера не всегда обеспечивает полное устранение споровых форм микроорганизмов и может приводить к частичной контаминации, влияющей на метаболизм *A. niger*.

Следует подчеркнуть, что эффективность озонирования целесообразно оценивать не по концентрации подаваемого озона, а по остаточной концентрации растворённого О₃ в воде, поскольку озон нестабилен и часть его теряется при разложении, реакциях с примесями и в процессе массопереноса.

Именно остаточный озон отражает фактическое содержание активного окислителя в жидкой фазе и определяет стерилизующее действие.

Стабильность остаточного озона зависит от температуры и pH. Температура – один из главных факторов, определяющих стабильность озона в воде. При нагреве растворимость озона падает, а скорость его распада растёт. Период полураспада при 20°C составляет примерно 30 минут, а при 30–35°C сокращается до нескольких минут. Поэтому озонирование лучше вести при 10–20°C – так озон дольше держится в растворе [167].

Значительное влияние оказывает и pH среды. В кислой среде озон более стабилен и работает в основном по механизму прямого окисления. При повышении pH разложение ускоряется и это ведёт к появлению гидроксильных радикалов (ОН), окислительный потенциал которых существенно выше [168].

Для производства лимонной кислоты pH является очень важным показателем. Поскольку ферментация *A. niger* идёт при pH 4–5 в диапазоне, благоприятном для стабильности озона и его прямого окислительного действия.

Оптимизация параметров озонирования с использованием метода Бокса–Бенкена

Для изучения влияния параметров озонирования на выход лимонной кислоты применили метод планирования эксперимента. Этот метод относится к методологии поверхности отклика (RSM) и даёт возможность учесть линейные эффекты, квадратичные члены и парные взаимодействия при сравнительно небольшом числе опытов. Эффективность озонирования зависит от трёх факторов: температуры, pH и концентрации остаточного озона.

В качестве независимых переменных были выбраны следующие факторы с указанными диапазонами значений:

- температура озонирования: 10–30°C;
- pH среды - 4,0–5,5;
- концентрация остаточного озона - 0,5–1,5 ppm.

Всего по плану Бокса–Бенкена провели 15 опытов, включая три центральные точки (для оценки воспроизводимости). Откликом служил выход лимонной кислоты в процентах (таблица 15).

Таблица 15 – Трёхфакторный план Бокса–Бенкена

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	X_1 Т озонирования, °C	X_2 pH среды	X_3 Остаточный Оз, ppm	Выход ЛК, %
1	2	3	4	5	6	7	8
1	1	2	1	10	4,00	1,0	73,3
3	2	2	1	10	5,50	1,0	73,5
10	3	2	1	20	5,50	0,5	71,4
4	4	2	1	30	5,50	1,0	73,3
5	5	2	1	10	4,75	0,5	71,1
8	6	2	1	30	4,75	1,5	71,9

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5	6	7	8
13	7	0	1	20	4,75	1,0	74,8
6	8	2	1	30	4,75	0,5	71,6
2	9	2	1	30	4,00	1,0	73,4
15	10	0	1	20	4,75	1,0	74,8
7	11	2	1	10	4,75	1,5	72,9
12	12	2	1	20	5,50	1,5	72,4
14	13	0	1	20	4,75	1,0	74,8
11	14	2	1	20	4,00	1,5	73,2
9	15	2	1	20	4,00	0,5	71,6

Для математического описания зависимости выхода лимонной кислоты от параметров озонирования была применена методология Response Surface Methodology (RSM). На основе результатов экспериментов, проведённых по плану Бокса–Бенкена, в программном пакете Minitab была построена квадратичная регрессионная модель второго порядка.

Полученное уравнение регрессии в некодированных переменных имеет следующий вид:

$$Y \% = 35,37 + 0,4550X_1 + 10,16 X_2 + 21,18 X_3 - 0,00850X_1 \times X_1 - 1,022 X_2 \times X_2 - 8,300 X_3 \times X_3 - 0,0100 X_1 \times X_2 - 0,0750 X_1 \times X_3 - 0,400 X_2 \times X_3 \quad (13)$$

Анализ дисперсии (ANOVA) показал высокую статистическую значимость полученной модели (рис.22).

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,201246	99,08%	97,42%	85,24%

Рисунок 22 - Коэффициент детерминации модели

Высокое значение коэффициента детерминации свидетельствует о том, что модель адекватно описывает экспериментальные данные.

Анализ поверхностей показал наличие выраженного максимума выхода лимонной кислоты в области:

- температура озонирования $\approx 20^\circ\text{C}$
- pH среды $\approx 4,6-4,8$
- остаточная концентрация озона $\approx 1 \text{ ppm}$

Отклонение параметров от указанных значений приводит к постепенному снижению выхода лимонной кислоты.

Для визуализации влияния факторов были построены трёхмерные поверхности отклика (рис.23)

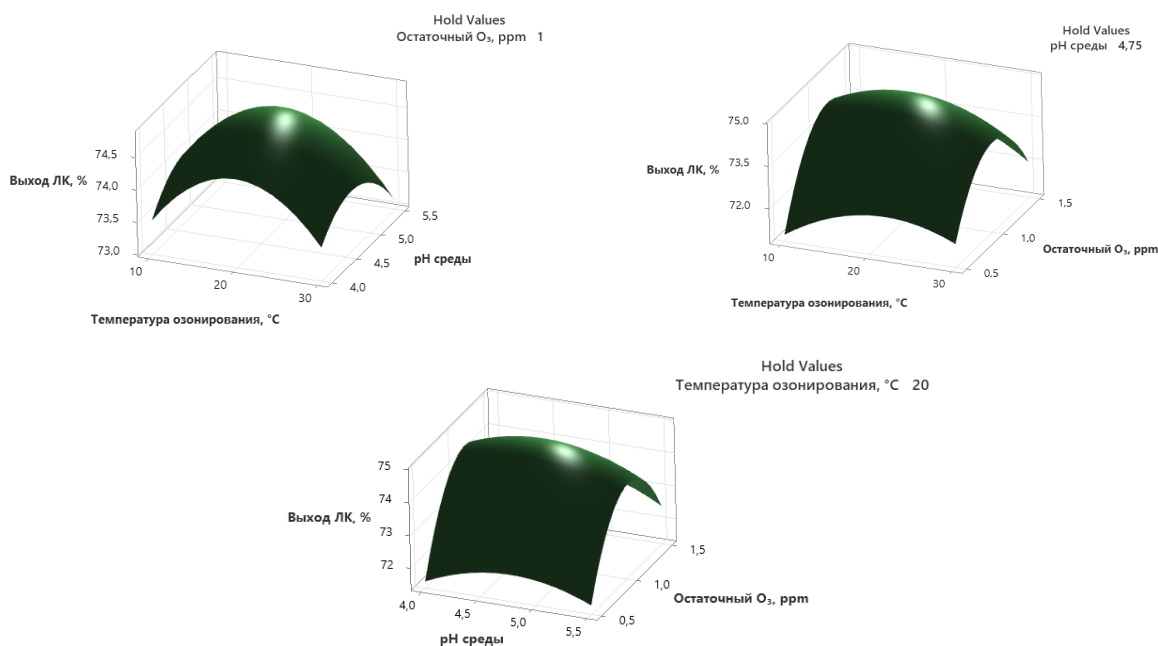


Рисунок 23 – Трёхмерные поверхности отклика, характеризующие влияние температуры озонирования, pH среды и остаточной концентрации озона на выход лимонной кислоты

Оптимизация параметров озонирования проводилась с использованием инструмента Response Optimizer программного пакета Minitab в рамках методологии поверхности отклика (RSM). Цель оптимизации заключалась в определении такого сочетания факторов, при котором достигается максимальный выход лимонной кислоты при сохранении параметров в заданных технологических пределах (рис.24).

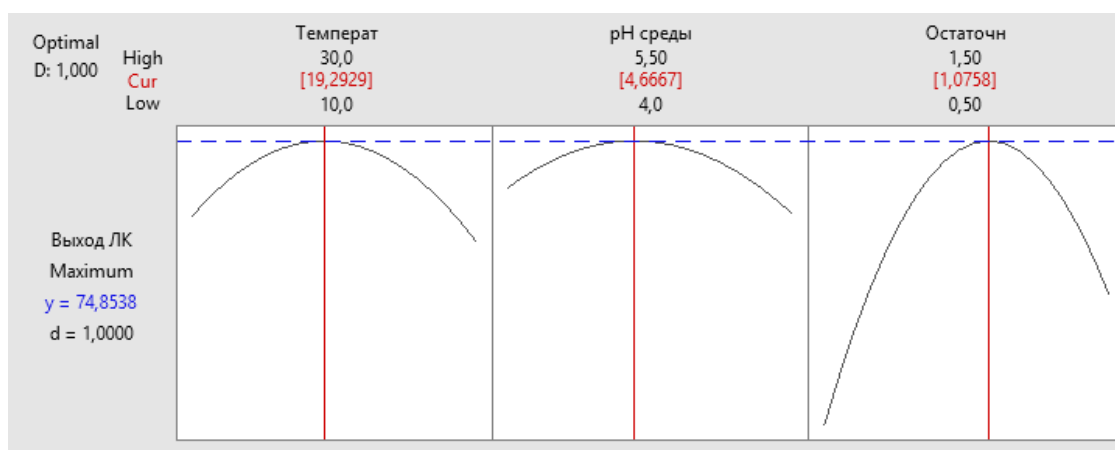


Рисунок 24 – Оптимизация параметров процесса озонирования методом поверхности отклика (Response Optimizer): влияние температуры озонирования, pH среды и остаточной концентрации озона на выход лимонной кислоты

Как видно из рисунка 24, максимальный выход лимонной кислоты достигается при температуре озонирования около 19,3 °С, значении pH $\approx$ 4,67 и остаточной концентрации озона около 1,08 ppm. При данных условиях прогнозируемый выход лимонной кислоты составляет 74,85%, что соответствует максимальному значению функции желательности ($D = 1,0$).

Таким образом, оптимизация параметров озонирования методом поверхности отклика позволила определить область технологических условий, обеспечивающих максимальный выход лимонной кислоты. Оптимальные параметры составили: $T = 19,29^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 4,67$; остаточный $\text{O}_3 = 1,076$ ppm, при которых прогнозируемый выход лимонной кислоты равен 74,85 % при высокой желательности $D = 1,0$. Установленные оптимальные значения температуры озонирования, pH среды и остаточной концентрации озона создают благоприятные условия для дальнейшего проведения биосинтеза лимонной кислоты и обеспечивают стабильность технологического процесса на начальной стадии культивирования.

3.6 Оптимизация процесса биосинтеза лимонной кислоты штаммом *A. niger* R5/4 в масштабированных условиях опытной апробации

Однако эффективность биосинтеза лимонной кислоты определяется не только условиями подготовки оборудования, но и параметрами самой ферментационной среды. После обеспечения стерильности ферментера ключевым этапом становится оптимизация факторов, непосредственно влияющих на метаболическую активность продуцента и накопление целевого продукта. В связи с этим, оптимизация параметров среды является необходимым условием при масштабировании процесса биосинтеза лимонной кислоты в условиях опытной апробации.

В настоящей работе при оптимизации процесса биосинтеза лимонной кислоты штаммом *A. niger* R5/4 был использован статистический план эксперимента Бокса-Бенкена. Влияние ключевых факторов – начального уровня pH, длительности инкубации и температуры ферментации – было исследовано с использованием модели Бокса-Бенкена на основе предварительно определённых оптимальных концентраций компонентов культуральной среды. Это позволило оценить как индивидуальные эффекты каждого параметра, так и их взаимодействия, и определить область оптимальных условий для максимизации синтеза лимонной кислоты.

На основании предварительных исследований были выбраны три ключевых фактора – температура ферментации, начальный pH среды и длительность инкубации, оказывающие наибольшее влияние на скорость накопления лимонной кислоты.

Оптимизированная ферментационная среда включала мальтодекстрин кукурузного крахмала с $\text{DE} = 19\%$ (концентрация ферментируемых сахаров 140 г/л), $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 3,8$ г/л; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 5,0$ г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,17$ г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,0018$ г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,0170$ г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,06$ г/л. Ранее были определены оптимальные концентрации этанола (3%) и инокулята (3%).

Для исследования влияния отдельных факторов были выбраны следующие уровни: температура – 29, 30 и 31 °С; время ферментации – 144, 168 и 192 ч; начальный pH – 4,5; 5,0 и 5,5. Всего выполнено 15 экспериментов согласно матрице плана Бокса-Бенкена, а результаты выхода лимонной кислоты после 168 ч ферментации представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Матрица плана Бокса–Бенкена с фактическими значениями выхода лимонной кислоты, Y г/л

Std Order	Run Order	Pt Type	Blocks	X ₁ τ, час	X ₂ pH	X ₃ T, °C	τ, час	pH	T, °C	ЛК, Y г/л
5	1	2	1	-1	0	-1	144	5,0	29	92,48
8	2	2	1	1	0	1	192	5,0	31	95,91
2	3	2	1	1	-1	0	192	4,5	30	94,23
13	4	0	1	0	0	0	168	5,0	30	116,90
4	5	2	1	1	1	0	192	5,5	30	95,40
15	6	0	1	0	0	0	168	5,0	30	116,90
10	7	2	1	0	-1	-1	168	5,5	29	90,37
7	8	2	1	-1	0	1	144	5,0	31	96,13
14	9	0	1	0	0	0	168	5,0	30	117,90
3	10	2	1	-1	1	0	144	5,5	30	100,03
11	11	2	1	0	-1	1	168	4,5	31	87,04
9	12	2	1	0	-1	-1	168	4,5	29	72,16
1	13	2	1	-1	-1	0	144	4,5	30	88,79
6	14	2	1	1	0	-1	192	5,0	29	89,26
12	15	2	1	0	1	1	168	5,5	31	92,58

Таблица 16 представляет матрицу экспериментального плана Бокса-Бенкена, включающую комбинации факторов в кодированных (X₁, X₂, X₃) и реальных значениях (τ, ч; pH; T, °C), а также фактический выход лимонной кислоты (Y, г/л), полученный в каждой точке эксперимента. Планирование эксперимента осуществляли по трём уровням факторов (–1; 0; +1), что обеспечило равномерное покрытие факторного пространства и возможность оценки как линейных, так и квадратичных эффектов, а также взаимодействий между переменными. По экспериментальным данным была построена квадратичная модель поверхности отклика для выхода лимонной кислоты. Модель получилась точной, коэффициент детерминации R² = 98,86%, что свидетельствует о том, что модель объясняет практически всю изменчивость производительности лимонной кислоты. Скорректированный коэффициент R² (adj) составил 96,81%, а предсказательный R² (pred) = 82,18%. Последнее значение вполне приемлемо, поэтому модель можно использовать для прогнозирования и за пределами изученного диапазона. Стандартная ошибка регрессии невелика S = 2,2254, значит, разброс между измеренными и предсказанными значениями минимален.

Уравнение регрессии в кодированных факторах, связывающее выход лимонной кислоты (%) с параметрами озонирования, имеет вид (14):

$$Y_{г/л} = -17673 + 4,39X_1 + 844,9 X_2 + 1015,7 X_3 - 0,01277X_1 \times X_1 - 61,06 X_2 \times X_2 - 16,43 X_3 \times X_3 - 0,2098 X_1 \times X_2 + 0,0312 X_1 \times X_3 - 6,34 X_2 \times X_3 \quad (14)$$

Для оценки статистической значимости и адекватности построенной модели были проведены диагностические проверки, результаты которых представлены на рисунке 25.

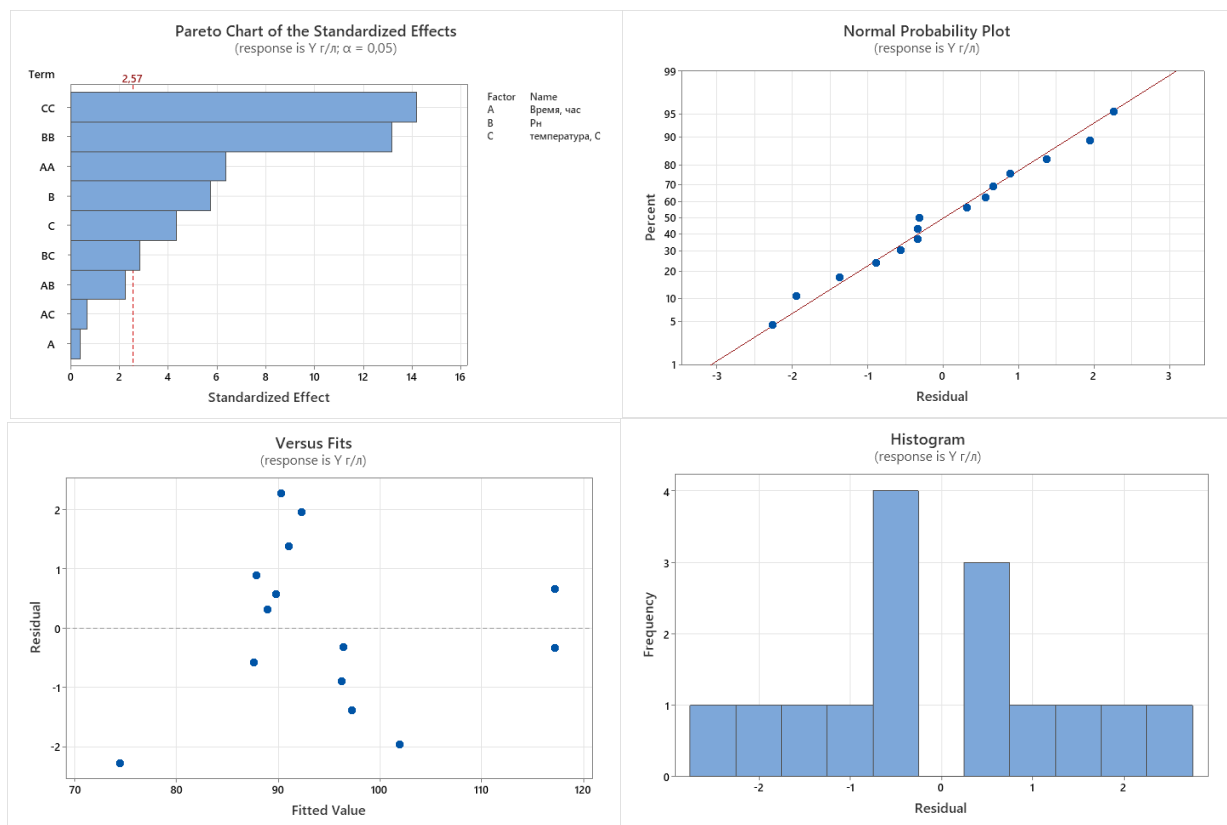
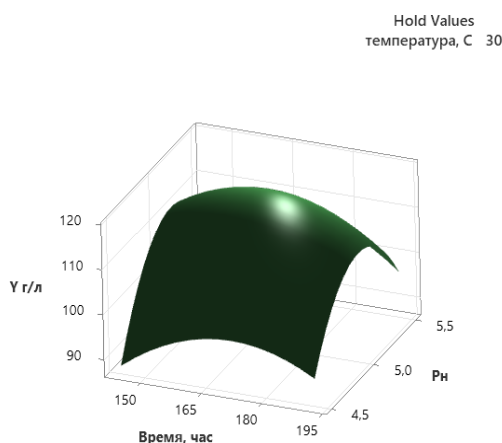


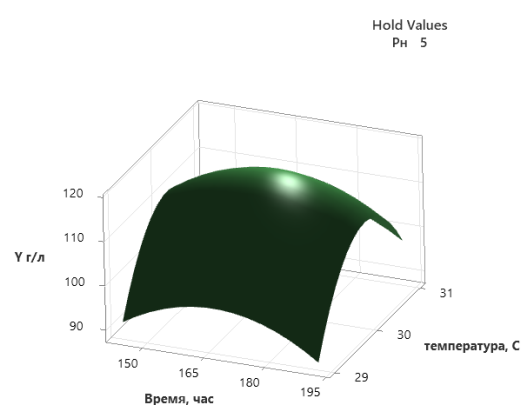
Рисунок 25 – Диагностические графики регрессионной модели для выхода лимонной кислоты (Y , г/л), построенной по плану Бокса–Бенкена

Диагностические графики (рис. 25) показали, что модель корректна и статистически адекватна. На диаграмме Парето хорошо видны значимые квадратичные эффекты. Анализ остатков – нормальный вероятностный график, гистограмма и график остатков против предсказанных значений – не выявил отклонений от нормального распределения и систематических смещений.

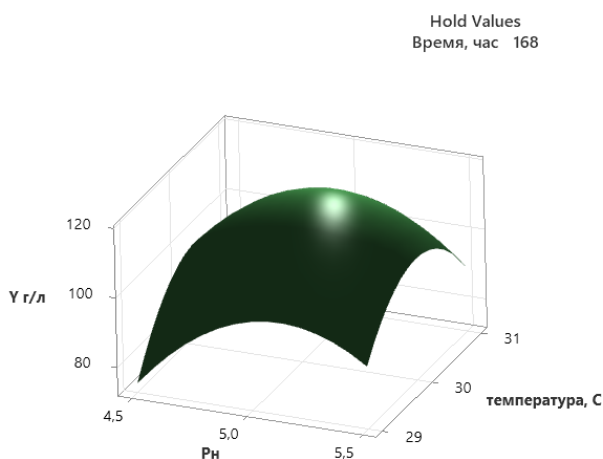
Трёхмерные поверхности отклика, показывающие совместное влияние факторов, приведены на рисунке 26.



Кривая зависимость выхода лимонной кислоты Y (г/л) от времени ферментации и pH (температура фиксирована, 30°C)



Кривая зависимость выхода лимонной кислоты Y (г/л) от времени ферментации и температуры при фиксированном pH 5.



Кривая зависимость выхода лимонной кислоты Y (г/л) от pH и температуры при фиксированном времени ферментации $\tau = 168$ ч.

Рисунок 26 – Трёхмерные поверхности отклика для выхода лимонной кислоты Y (г/л) в зависимости от времени ферментации, pH и температуры (план Бокса-Бенкена)

На трёхмерных поверхностях (рис. 26) видно, как меняется выход лимонной кислоты при варьировании двух факторов, когда третий зафиксирован. Зависимость всюду нелинейная, с чётко выраженным внутренним максимумом.

Максимальный выход достигается при pH около 5.0, температуре 30°C и времени ферментации 167,27ч., что подтверждает адекватность математической модели и точность описания процесса.

На рисунке 27 представлен график функции желательности (Desirability Plot), полученный в результате оптимизации модели поверхности отклика. Графическое представление позволяет визуально определить область

факторного пространства, в которой достигается максимальное значение отклика – выхода лимонной кислоты.

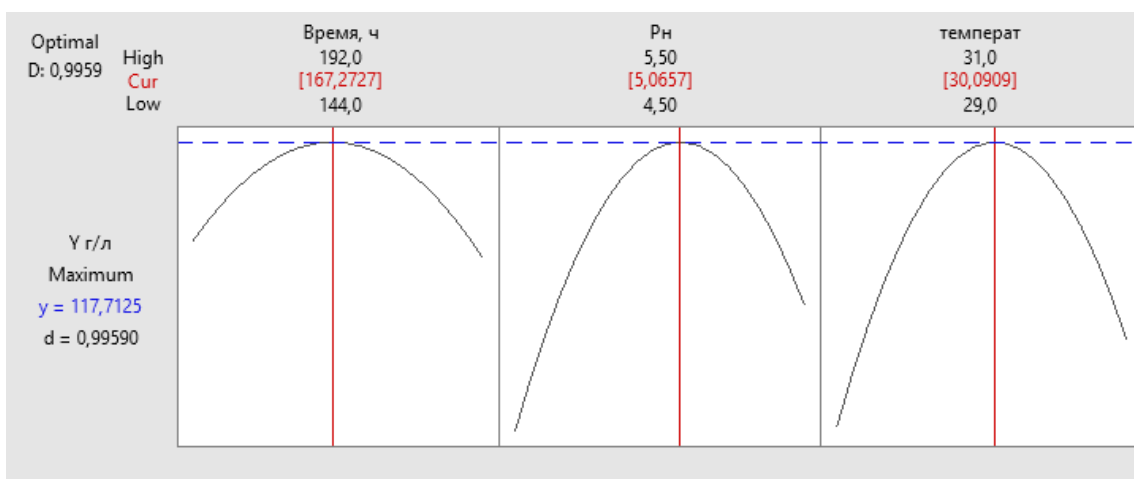


Рисунок 27 – График функции желательности (Desirability Plot), отражающий оптимальные значения факторов (τ, pH, T), обеспечивающие максимальный выход лимонной кислоты

Красные вертикальные линии обозначают оптимальные уровни факторов, при которых достигается максимум функции желательности. Синие пунктирные линии соответствуют максимальному значению отклика, определённому моделью.

Таблица 17 – Оптимальные параметры, обеспечивающие максимальный выход лимонной кислоты, составляют:

Факторы	Показатели
Время, τ ч.	167
pH среды	5,0
Температура, T °C	30
Мальтодекстрин кукурузного крахмала, ДЭ, % (концентрация ферментируемых сахаров 140 г/л)	19
NH ₄ NO ₃ , г/л	3,8
KH ₂ PO ₄ , г/л	5,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O, г/л	0,17
ZnSO ₄ ·7H ₂ O, г/л	0,0018
FeSO ₄ ·7H ₂ O, г/л	0,017
CuSO ₄ ·5H ₂ O, г/л	0,06
Этанол %	3
Инокулят %	3

Проведённый анализ экспериментальных данных позволил определить оптимальные параметры состава питательной среды и условий культивирования, обеспечивающие максимальный выход лимонной кислоты 117,71 г/л. (рисунок 27, таблица 17). В результате проведённой оптимизации установлено, что

наиболее благоприятные условия для метаболической активности штамма *A. niger* R5/4 формируются при продолжительности ферментации 167 ч, начальном pH среды 5,0 и температуре 30°C. Оптимальная концентрация ферментируемых сахаров составляет 140 г/л в виде мальтодекстрина с ДЭ 19 %, что обеспечивает сбалансированный углеродный поток в клетке. Кроме того, были рассчитаны эффективные концентрации минеральных солей NH_4NO_3 – 3,8 г/л; KH_2PO_4 – 5,0 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,17 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0018 г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0170 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,06 г/л. Добавление 3 % этанола и использование 3 % инокулята положительно влияют на биосинтез. Эти добавки повышают проницаемость клеточных мембран и ускоряют начало процесса ферментации.

Таким образом, полученный оптимизированный режим культивирования характеризуется высокой воспроизводимостью и стабильностью и может быть рекомендован для масштабирования в промышленных условиях.

Коэффициент оборота субстрата, удельная скорость синтеза и выход лимонной кислоты являются основными критериями оценки производительности штамма. Расчётные данные по эффективности ферментации через 168 часов представлены в таблице 18. Продуктивность ферментационного процесса определялась с помощью вычисления коэффициентов эффективности ферментации через 168 ч.

Таблица 18 – Показатели продуктивности ферментационного процесса через 168 ч культивирования

Номер опыта	Коэффициенты эффективности ферментации		Содержание ЛК, г/л	Коэффициент конверсии, %
	Выход продукта из субстрата ($Y_{P/S}$), г/г	Удельная скорость образования продукт, q_p , г/(г×ч)		
1	2	3	4	5
1	0,60±0,3	0,067±0,10	92,48±1,3	66,4
2	1,01±0,01	0,12±0,02	117,70±0,4	86,15
3	0,63±0,3	0,07±0,10	94,15±1,2	66,8
4	0,65±0,13	0,08±0,07	95,14±1,0	68,9
5	0,68±0,21	0,07±0,24	84,27±0,2	61,4
6	0,72±0,10	0,08±0,16	87,99±2,1	64,3
7	0,58±0,68	0,08±0,61	97,48±0,3	69,5
8	0,721±0,24	0,082±0,18	88,47±1,9	64,9
9	1,0±0,01	0,12±0,02	117,20±0,5	86,05
10	0,64±0,48	0,07±0,98	93,46±0,2	58,2
11	1,01±0,01	0,12±0,02	117,20±0,0	86,10
12	0,55±0,20	0,07±0,5	90,25±1,2	63,3
13	0,71±0,11	0,079±0,18	86,68±0,5	82,7
14	0,66±0,72	0,05±0,02	72,12±1,2	48,6
15	0,59±0,68	0,08±0,61	97,68±0,8	69,7

Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности ферментационного процесса при оптимальных параметрах, что подтверждается стабильным увеличением выхода лимонной кислоты и коэффициента конверсии. Эти результаты также показали, что удельная скорость образования продукта составила 0,12 г/г×ч. коэффициент конверсии достигал значения 86,15%.

3.7 Исследование процессов выделения, очистки и кристаллизации лимонной кислоты из ферментационного раствора

Выделение и очистка лимонной кислоты из ферментированного раствора проходят через несколько ключевых этапов, каждый из которых играет важную роль в получении высококачественного продукта

Изучены способы экстракции и очистки лимонной кислоты из ее разбавленных растворов. Для этого в биореактор объемом 3,6 л. питательной среды и засеивается мицелием гриба *A. niger R5/4*.

Ферментацию проводили при температуре 31 °С и числе оборотов мешалки в минуту 120 на первые сутки процесса, 150-200 оборотов - на 2 сутки, 250-300 оборотов - 3-4 сутки, 300-350 оборотов - 5-7 сутки. После ферментации биомассу гриба отделяли на воронке Бюхнера и в ферментированном растворе определяли концентрацию лимонной кислоты.

На последующих стадиях технологического процесса – нейтрализации, фильтрации, осветления, выпаривания и кристаллизации – все операции выполнялись в строго одинаковых условиях. В связи с этим основное внимание было сосредоточено на изучении влияния концентрации карбоната кальция и температуры нейтрализации на выход лимонной кислоты.

На этапе нейтрализации предварительно подогретый до 55-70 °С ферментационный раствор при интенсивном перемешивании обрабатывали карбонатом кальция CaCO_3 . Изучались различные концентрации CaCO_3 и диапазоны температур, позволяющие оценить их влияние на полноту выделения лимонной кислоты (таблица 19).

Таблица 19 - Влияние концентрации карбоната кальция и температуры нейтрализации на выход ЛК из ферментационного раствора, %

Концентрация CaCO_3 , г/л	Температура, °С			
	40	50	60	70
60	76,9 ± 1,29	78,2 ± 0,81	75,6 ± 1,51	73,1 ± 0,9
65	77,5 ± 0,70	82,4 ± 1,02	79,6 ± 3,07	75,9 ± 2,03
70	84,0 ± 0,01	85,3 ± 2,07	83,2 ± 1,0	78,7 ± 2,55
75	81,5 ± 3,07	93,8 ± 1,62	85,3 ± 0,08	88,4 ± 1,50
80	84,4 ± 1,15	88,14 ± 1,47	82,1 ± 0,15	84,8 ± 1,4

Полученные данные указывают на наличие чётко выраженного оптимума условий нейтрализации: концентрация CaCO_3 75 г/л и температура 50 °С. Повышение температуры выше этого значения (до 60-70 °С) или концентрации CaCO_3 свыше 75 г/л не приводит к дальнейшему увеличению выхода лимонной кислоты, а напротив, сопровождается его снижением. Это может быть

обусловлено образованием более плотных осадков цитрата кальция, способных сорбировать часть растворённой лимонной кислоты, затрудняя её экстракцию. При концентрации CaCO_3 80 г/л выход ниже, чем при 75 г/л во всех температурных режимах, что подтверждает наличие избытка реагента и переход от оптимума к снижению эффективности. При пониженных температурах процесс нейтрализации протекает менее эффективно, что обусловлено снижением скорости взаимодействия лимонной кислоты с карбонатом кальция и ухудшением условий образования кальций цитрата

После нейтрализации образовавшийся осадок цитрата и оксалата кальция тщательно промывали горячей водой. Для удаления окрашивающих и органических примесей к раствору добавляли суспензию активированного угля одновременно с серной кислотой. Образованную смесь, содержащую лимонную кислоту и гипсовый осадок, фильтровали, промывали водой и отделяли твёрдую фазу. Полученный раствор лимонной кислоты подвергали выпариванию.

Кристаллизация проводилась методом охлаждения до $+8^\circ\text{C}$ с последующим перемешиванием в течение 1,5 часов. Образовавшуюся суспензию кристаллов центрифугировали при $+8^\circ\text{C}$, кристаллы отделяли фильтрацией, промывали водой температурой 30°C и сушили при 50°C на протяжении 1,5 часов.

Для получения лимонной кислоты первого сорта маточный раствор упаривали до концентрации 69% и подвергали кристаллизации. Для получения высшего сорта маточные растворы дополнительно обрабатывали активированным углём.

Сушка кристаллов лимонной кислоты осуществлялась в барабанной сушилке при 35°C .

Параллельно проводили изучение влияния температуры и длительности перемешивания на эффективность осветления раствора активированным углём. Осветление осуществлялось путём смешивания раствора лимонной кислоты с суспензией активного угля из расчёта 0,05 г угля на 10 г лимонной кислоты при температурах 18, 20, 22 и 24°C и продолжительности перемешивания 1, 1,5 и 2 часа. После фильтрации осветлённый раствор направляли на упаривание до плотности 1260–1280 кг/м³ при давлении не ниже 0,082 МПа.

В таблице 20 представлено влияние температурных режимов и длительности перемешивания на выход лимонной кислоты.

Таблица 20 - Влияние температурных режимов и периодов перемешивания смеси на выход лимонной кислоты при стадии осветления, %.

Температура	Время перемешивания		
	1 ч	1.5 ч	2 ч
18°C	$84,6 \pm 0,98$	$88,1 \pm 2,01$	$83,1 \pm 0,08$
20°C	$86,5 \pm 0,08$	$91,6 \pm 2,07$	$87,2 \pm 0,71$
22°C	$80,7 \pm 4,09$	$86,1 \pm 0,69$	$81,3 \pm 5,90$
24°C	$78,5 \pm 2,01$	$77,6 \pm 5,08$	$75,9 \pm 0,03$

Для визуализации полученных зависимостей результаты, представленные на рисунке 28, были графически интерпретированы. На рисунке 26 показано влияние температуры и времени перемешивания на выход лимонной кислоты при стадии осветления.

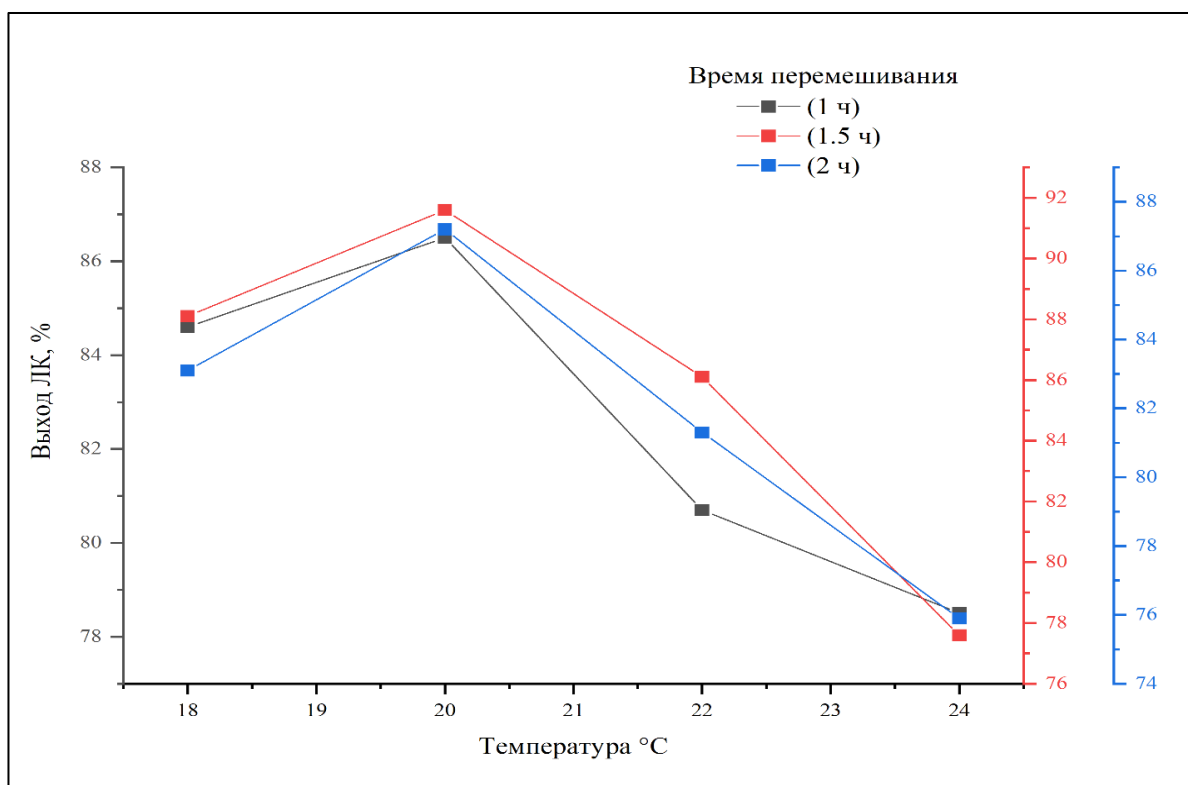


Рисунок 28 - Влияние температурных режимов и периодов перемешивания смеси на выход лимонной кислоты при стадии осветления %

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что температура 20°C и время перемешивания 1,5 ч обеспечивают максимальный выход лимонной кислоты на стадии осветления. Это, вероятно, связано с тем, что при данной температуре достигается оптимальная активность адсорбции активированного угля, способствующая более полному удалению примесей, не подавляя при этом растворимость лимонной кислоты. Повышение температуры до 22-24 °C приводит к снижению эффективности осветления, что может быть обусловлено снижением сорбционной способности угля при более высокой кинетической энергии молекул, а также возможным нарушением равновесия между твёрдой и жидкой фазой. При более низкой температуре (18°C) сорбция также менее эффективна, возможно, из-за замедления массопереноса и диффузионных процессов.

3.8 Усовершенствование технологии производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала

Процесс производства лимонной кислоты представляет собой сложную систему взаимосвязанных стадий: от подготовки сырья и гидролиза крахмала до

ферментации и последующей очистки продукта. На каждом этапе происходят химико-биологические и физико-механические преобразования, эффективность которых зависит от точности соблюдения технологических параметров.

Усовершенствована технология получения лимонной кислоты из кукурузного крахмала, приведенная в Приложении А. Особенностью технологии является введение в процесс стерилизации ферментеров озонированием, а также применение нового штамма *A. niger* R5/4, полученного в результате радиооблучения и химического мутагенеза.

В технологическую схему производства лимонной кислоты вводится процесс озонирования, который используется для стерилизации оборудования (рисунок 29). Озонированная вода применяется в виде спрея, обеспечивая эффективное уничтожение микробов.

Механизм стерилизации:

1. Оборудование обрабатывается озонированной водой в виде спрея.
2. Поток воды смывает микроорганизмы с поверхностей.
3. Остаточный озон в воде завершает процесс уничтожения микробов.

Этот метод позволяет повысить уровень стерильности оборудования, минимизировать риск контаминации и улучшить общий контроль качества производства лимонной кислоты. Кроме того, озонирование снижает потребность в химических стерилизационных средствах, что делает процесс более экологически безопасным.

Технологическая схема производства лимонной кислоты приведена на рисунке 29.

Полученный продуцент лимонной кислоты – штамм гриба *A. niger* R5/4 задепонирован в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК (Приложение Е).

Усовершенствована технология производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала на ТОО «Жаркентский крахмалопаточный завод», получен акт производственных испытаний (Приложение А, Б, В).

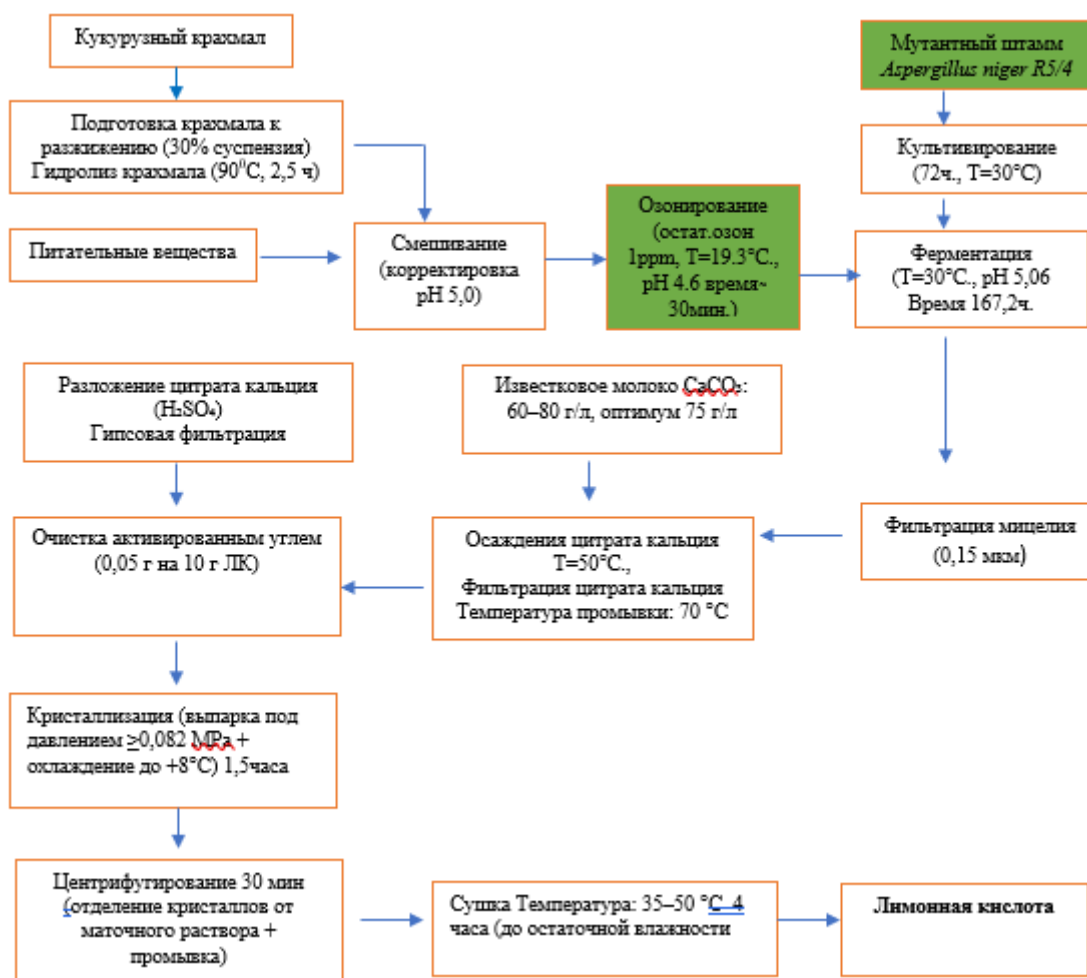


Рисунок 29 – Технологическая схема производства лимонной кислоты

Технологическая схема производства включает в себя следующие процессы: стерилизацию и подготовку ферментационной среды и оборудования, подготовку гидролизата крахмала, приготовление ферментационной среды, получение посевного материала, ферментацию, отделение мицеллия от раствора лимонной кислоты, отделение лимонной кислоты из раствора, разложение цитрата кальция и отделение гипсового шлама, выпарку раствора лимонной кислоты кристаллизацию и сушку.

Таким образом, на основании проведенных исследований усовершенствована технология производства лимонной кислоты с применением мутантного штамма *A. niger* R5/4, позволяющего увеличить выход лимонной кислоты, тем самым, повысить экономическую эффективность производства.

3.9 Качественная характеристика полученной лимонной кислоты и оценка её функциональных свойств

Оценка качественных характеристик полученной лимонной кислоты является ключевым этапом валидации усовершенствованной технологии и подтверждением её соответствия требованиям промышленного производства. Для этого была проведена сравнительная характеристика основных физико-

химических показателей опытной партии продукта и коммерческой лимонной кислоты, представленной на рынке. В качестве коммерческой продукции использован образец лимонной кислоты моногидрата торговой марки Ensign (производитель Weifang Ensign Industry Co., Ltd., Китай), относящийся к наиболее распространённым импортируемым маркам на казахстанском рынке. Продукт соответствует международным стандартам BP/USP/FCC/E330, что позволяет объективно сопоставить его характеристики с параметрами полученной по усовершенствованной технологии лимонной кислоты. Такой выбор коммерческого аналога обеспечивает корректность сравнения, поскольку именно китайская лимонная кислота (в частности Ensign) занимает наибольшую долю рынка и фактически является стандартом, относительно которого оценивается качество импортируемой продукции в пищевой, фармацевтической и химической промышленности.

В анализ включены параметры, регламентируемые действующими стандартами (ГОСТ 908-2004), а также дополнительные показатели, отражающие чистоту, степень кристалличности и отсутствие посторонних примесей.

Физико-химические показатели опытной и коммерческой лимонной кислоты представлены в таблице 21, что позволяет провести их сопоставительную оценку в соответствии с требованиями ГОСТ 908-2004

Таблица 21 – Сравнение физико-химических показателей опытной и коммерческой лимонной кислоты

Показатель	Норма по ГОСТ 908- 2004	Опытная лимонная кислота	Коммерческая лимонная кислота
1	2	3	4
Массовая доля лимонной кислоты моногидрата ($C_6H_8O_7 \times H_2O$), %, не менее не более	99,0 100	99,3	97,9
Массовая доля воды, %, не менее не более	7,5 8,8	8,2	7,6
Массовая доля влаги, %	$\leq 0,5$	0,21	0,25
Массовая доля сульфатной золы, %, не более	0,05	0,015	0,02
Массовая доля сульфатов, %, не более	0,015	0,005	0,008
Массовая доля оксалатов, %, не более	0,01	0,006	0,009
Испытание на ферроцианиды	Выдерживает испытание	Выдерживает испытание	Выдерживает испытание

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4
Испытание на легкообугливаемые вещества	Выдерживает испытание	Выдерживает испытание	Выдерживает испытание
Испытание на железо	Выдерживает испытание	Выдерживает испытание	Выдерживает испытание
pH 10 % раствора	2,1–2,3	2,10	2,15
Оптическая плотность (420 нм)	$\leq 0,050$	0,011	0,025
Оптическая плотность (600 нм)	$\leq 0,015$	0,005	0,010
Цвет раствора	бесцветный	бесцветный	бесцветный

По всем исследованным параметрам опытная лимонная кислота соответствует требованиям ГОСТ 908-2004 и при этом характеризуется:

- пониженным содержанием влаги (0,21 %), что указывает на более устойчивую к хранению кристаллическую форму;
- минимальной зольностью (0,03 %), свидетельствующей о высокой степени очистки;
- более низкая оптическая плотность растворов опытной лимонной кислоты при 420 и 600 нм также подтверждает высокую степень очистки продукта;
- меньшим содержанием хлоридов и сульфатов, что отражает высокую степень удаления минеральных остатков после нейтрализации;
- высокой прозрачностью и чистотой кристаллов, обеспеченной оптимальными условиями кристаллизации и сушения.

Таким образом, физико-химические показатели опытной лимонной кислоты полностью соответствуют современным требованиям к пищевой лимонной кислоте.

Помимо физико-химических показателей, определяющих соответствие лимонной кислоты нормативным требованиям, важное значение имеют её функциональные свойства, отражающие практическую ценность продукта в различных областях применения. Одним из ключевых функциональных параметров является антиоксидантная активность, обусловленная способностью лимонной кислоты хелатировать ионы переходных металлов и предотвращать развитие металл-катализируемых окислительных процессов. Оценка антиоксидантной активности опытного образца относительно коммерческой лимонной кислоты позволяет установить влияние особенностей биосинтеза, очистки и кристаллизации на формирование функциональных характеристик полученного продукта. В этой связи, проведено сравнительное исследование антиоксидантной активности опытной и коммерческой лимонной кислоты. Результаты оценки антиоксидантной активности опытной и коммерческой лимонной кислоты, полученные методами FRAP, DPPH и определения хелатирующей способности по отношению к ионам Fe^{2+} , представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Антиоксидантная активность опытной и коммерческой лимонной кислоты

Показатель	Опытная ЛК	Коммерческая ЛК
FRAP, мкмоль ТЕ/г	22,1 ± 0,9	18,4 ± 0,7
Хелатирование Fe ²⁺ , % (1 мг/мл) >95 %)	71,8 ± 1,0	63,5 ± 1,2
IC ₅₀ (хелатирование), мг/мл	0,74 ± 0,8	0,92 ± 0,9
DPPH-ингибирование, % (5 мг/мл)	15,9 ± 0,8	14,2 ± 0,6
IC ₅₀ (DPPH), мг/мл	9,4 ± 0,4	9,8 ± 10,5

Повышенные значения восстановительной способности (FRAP), полученные для опытной лимонной кислоты, показано, что органические кислоты с выраженной комплексообразующей способностью демонстрируют умеренную, но воспроизводимую восстановительную активность в FRAP-тесте, особенно при высокой степени очистки. По данным FRAP-анализа восстановительная способность опытной лимонной кислоты составляет 22,1 мкмоль ТЕ/г, что на ≈20% выше, чем у коммерческой (18,4 мкмоль ТЕ/г). Этот показатель отражает некоторое усиление электронодонорной способности исследуемого образца и может быть связано с более высокой степенью очистки и отсутствием сопутствующих примесей.

Наиболее значимые различия наблюдаются по показателю хелатирования ионов Fe²⁺, который является ключевым механизмом антиоксидантного действия органических кислот (Рисунок 30).

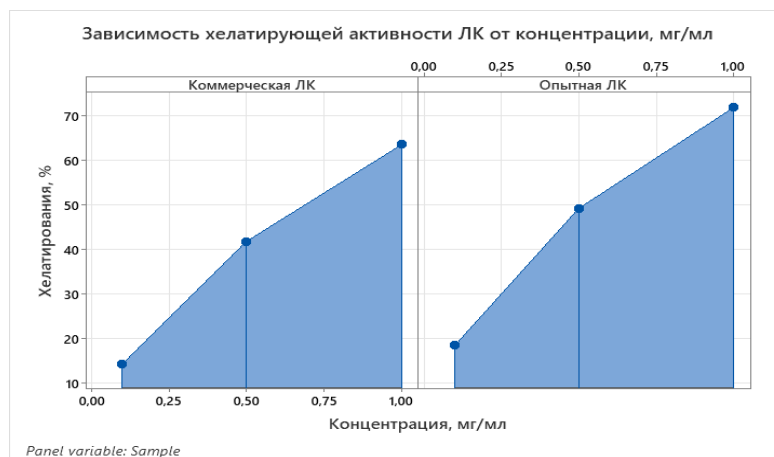


Рисунок 30 - Зависимость хелатирующей активности лимонной кислоты от концентрации для коммерческого и опытного образцов

Опытный образец обеспечивает 71,8 % связывания железа при концентрации 1 мг/мл, что превышает значение коммерческого аналога (63,5%). Опытная лимонная кислота демонстрирует более высокую способность связывать ионы Fe²⁺ на всех уровнях концентрации. Сопоставление двух графиков демонстрирует, что на всех тестируемых концентрациях хелатирующая активность опытной лимонной кислоты превышает аналогичный

показатель коммерческого образца, что подтверждает улучшенные функциональные свойства продукта.

Радикал-поглощающая активность по методу DPPH, как и ожидалось для лимонной кислоты, остаётся низкой в обоих образцах. Значения ингибирования составляют 15,9 % (опытная) и 14,2 % (коммерческая) при 5 мг/мл, что согласуется с литературными данными о минимальном участии лимонной кислоты в прямом радикал-скивинге.

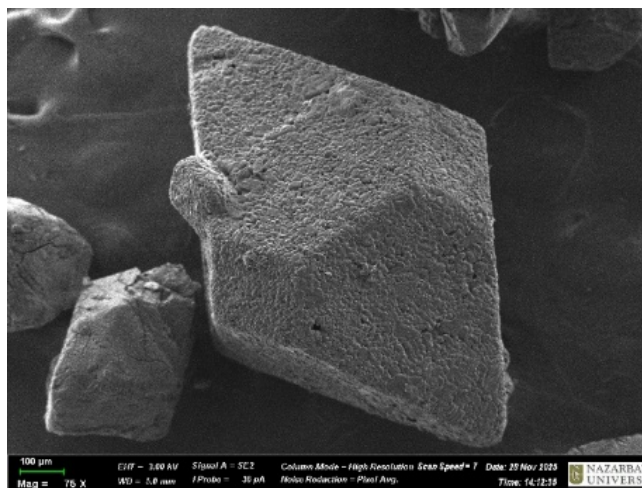
Значения IC_{50} (9,4-9,8 мг/мл) также лежат в диапазоне, характерном для слабых радикал-поглощающих молекул, и существенных различий между образцами не выявлено.

Таким образом, полученные результаты указывают, что основным вкладом в антиоксидантную активность лимонной кислоты является её способность хелатировать ионы переходных металлов, а не прямое взаимодействие со свободными радикалами. При этом опытная лимонная кислота демонстрирует более высокую хелатирующую способность и повышенную восстановительную активность, что отражает качество проведённых стадий очистки и указывает на улучшенные функциональные свойства конечного продукта по сравнению с коммерческим образцом [169].

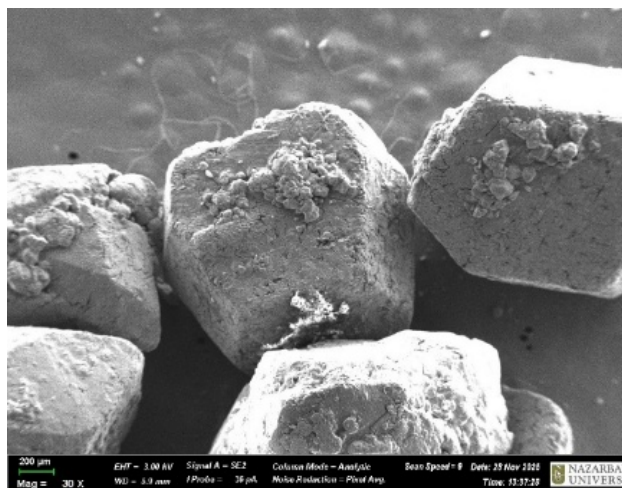
С учётом полученных результатов, следующим этапом исследования стало изучение структурно-морфологических характеристик полученной лимонной кислоты, поскольку кристаллическая форма, размер и однородность кристаллов оказывают существенное влияние на физико-химические свойства продукта, растворимость и технологическое поведение при последующем промышленном использовании. В связи с этим особое внимание было уделено исследованию морфологии кристаллов с применением методов электронной микроскопии.

Морфологические характеристики кристаллов лимонной кислоты являются ключевыми показателями эффективности процессов выпаривания, очистки и последующей кристаллизации. Анализ полученных образцов с помощью сканирующей электронной микроскопии (рисунок 31) показали, что образцы заметно различаются по развитости поверхности, количеству дефектов и склонности к агрегации. Эти особенности непосредственно отражают условия кристаллизации, такие как скорость охлаждения, степень пересыщения и начальные параметры зародышеобразования.

На снимках со сканирующего электронного микроскопа (рис. 31) видны хорошо сформированные, относительно однородные кристаллы с четкими гранями и формой моногидрата лимонной кислоты. Поверхности кристаллов преимущественно гладкие, с очень небольшим количеством признаков дефектов или агрегации. Это свидетельствует о тщательно контролируемых условиях кристаллизации и высокой чистоте конечного продукта.



А Образец №1



Б Образец №2

Образец №1 - опытная лимонная кислота, Образец №2 - коммерческая лимонная кислота

Рисунок 31 – СЭМ-микрофотографии лимонной кислоты

В отличие от этого, коммерческая лимонная кислота отличается менее однородной морфологией. Кристаллы имеют закруглённые края и явно шероховатую поверхность, а также признаки агломерации и локальные поверхностные включения. Эти особенности можно объяснить неоптимальными условиями кристаллизации и наличием остаточных примесей, которые влияют на рост и форму кристаллов.

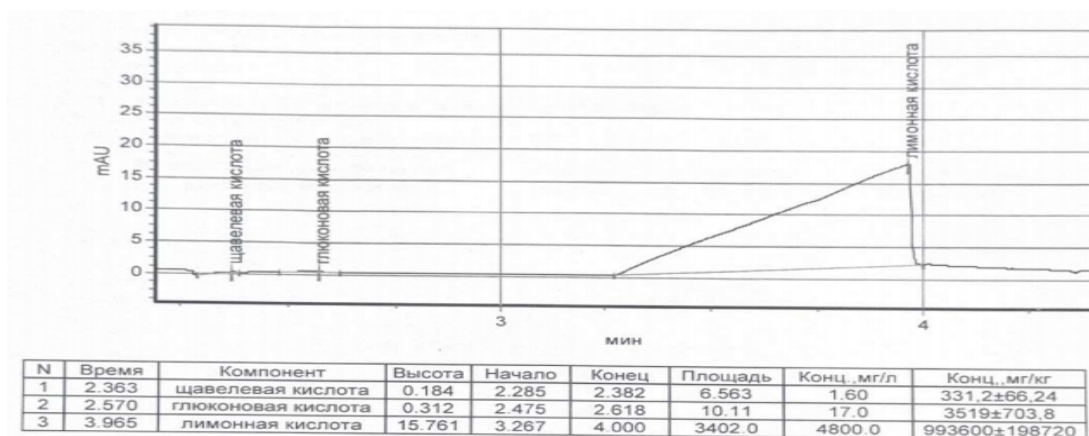
Таким образом, результаты СЭМ-анализа подтверждают, что усовершенствованная технология получения лимонной кислоты обеспечивает формирование более структурно упорядоченных и морфологически стабильных кристаллов по сравнению с коммерческим образцом, что согласуется с данными по более высокой чистоте, прозрачности растворов и улучшенным функциональным свойствам опытного продукта.

Определение подлинности и чистоты полученной лимонной кислоты проводили методом капиллярного электрофореза на приборе Lumex Elforun согласно ГОСТ Р 52841-2007 «Продукты пищевые (рис.32). Определение органических кислот методом капиллярного электрофореза». Идентификацию органических кислот осуществляли по времени миграции пиков, сравнивая их со стандартными растворами органических кислот. Основным критерием подлинности лимонной кислоты являлось совпадение времени миграции основного пика исследуемого образца с временем миграции стандартного раствора лимонной кислоты. Результаты анализа представлены в таблице 23, а также подтверждены протоколами испытаний, приведёнными в Приложении Г.

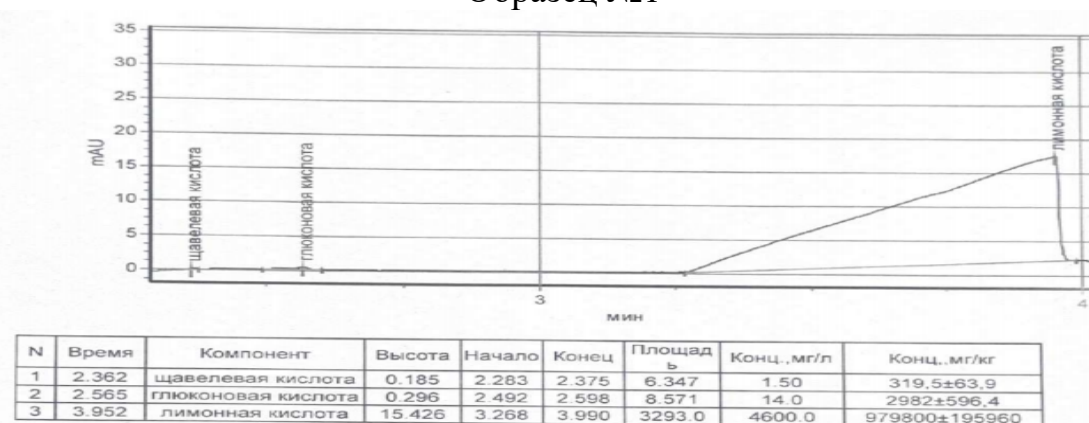
Таблица 23 – Содержание органических кислот в образцах лимонной кислоты по данным капиллярного электрофореза

Показатель	Образец №1 (опытная лимонная кислота), мг/кг	Образец №2 (коммерческая лимонная кислота), мг/кг
Щавелевая кислота	331,2±66,24	319,5±63,9
Глюконовая кислота	3519±703,8	2982±596,4
Лимонная кислота	993600±198720	979800±195960

По результатам анализа установлено, что основным компонентом исследуемых образцов является лимонная кислота. В качестве сопутствующих соединений обнаружены небольшие количества глюконовой и щавелевой кислот, характерных для ферментационного синтеза лимонной кислоты микроорганизмом *A. niger*. Суммарное содержание побочных органических кислот составило: в образце №1 – 3850,2 мг/кг (0,385%), в образце №2 – 3301,5 (0,330%).



Образец №1



Образец №2

Образец №1 - опытная лимонная кислота, Образец №2 - коммерческая лимонная кислота

Рисунок 32 – Электрофореграммы опытного и коммерческого образцов лимонной кислоты по данным капиллярного электрофореза

На электрофореграммах образцов (рис. 32) основной пик лимонной кислоты выявлен при времени миграции 3,9-4,0 мин., что совпадает со стандартом. Низкое содержание глюконовой и щавелевой кислот подтверждает эффективность очистки и соответствие продукта требованиям к пищевой лимонной кислоте.

После подтверждения подлинности методом капиллярного электрофореза конечный продукт был получен в виде белой гранулированной лимонной кислоты (рис.33). Такая форма обусловлена особенностями кристаллизации, промывки и сушки и не снижает качество продукта. По результатам анализа опытный образец характеризуется высоким содержанием лимонной кислоты и низким уровнем сопутствующих органических кислот.



Рисунок 33 – Конечный продукт: лимонная кислота

Таким образом, полученная лимонная кислота является конечным продуктом усовершенствованной технологии и по результатам комплексной оценки соответствует требованиям, предъявляемым к пищевой лимонной кислоте.

Выводы по разделу 3

В ходе исследований выполнен скрининг и отбор активных продуцентов лимонной кислоты, в результате чего выделен перспективный штамм *Aspergillus niger* CA20, на основе которого путём многоступенчатого химического и физического мутагенеза получен новый высокоэффективный штамм *Aspergillus niger* R5/4; установлено влияние физико-химических свойств крахмалосодержащего сырья на эффективность гидролиза и ферментации, обоснован выбор кукурузного мальтодекстрина с DE 19±1 как оптимального субстрата; определены закономерности влияния технологических параметров и состава питательной среды на выход лимонной кислоты, при этом с использованием методов математического моделирования и планирования эксперимента установлены оптимальные условия ферментации и значимые факторы процесса, что обеспечило повышение выхода продукта и подтверждает эффективность разработанного технологического подхода.

4 ОЦЕНКА ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДСТВА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Экономическая оценка усовершенствованной технологии является ключевым этапом обоснования её промышленной применимости и целесообразности внедрения. На основании данных опытной апробации была проведена калькуляция себестоимости получения лимонной кислоты включающая стоимость сырья, вспомогательных материалов, энергоносителей и операционных затрат.

Расчёт себестоимости выполнен исходя из выхода готовой продукции 750 кг на цикл. Используемые цены отражают актуальные рыночные значения на август 2025 года. Итоговые данные сведены в таблицу 24.

Таблица 24 – Расчетная себестоимость затрат на производство 1 кг лимонной кислоты

Наименование статей расходов	Единица измерения	Цена за единицу, тенге	Количество	Затраты, тенге
1	2	3	4	5
Кукурузный крахмал	кг	250	1000	250000
Термостабильный фермент α -амилаза Termamyl L120	кг	10280	0,4	4112
Кизельгур 545	кг	320	12	3840
Кислота серная	кг	2450	80	196000
Карбонат кальция	кг	1257	485	609645
Калий фосфорнокислый однозамещенный	кг	2140	16,67	35674
Цинк сернокислый 7-водный	кг	1200	0,0063	7,6
Магний сернокислый 7-водный	кг	1172	0,57	668
Аммоний азотнокислый	кг	365	12,73	4647
Карбонат натрия	кг	300	20	6000
Сульфат железа	кг	600	0,0567	34
Сульфат меди	кг	1500	0,212	318
Этанол	кг	500	79	39500
Уголь активный осветляющий древесный порошкообразный марки ОУ-А или ОУ-В	кг	754	40	30160
Лимонная кислота	кг	2500	0,5	1250
Кислота олеиновая	кг	2000	10	20000
Кислота соляная	кг	1800	15	27000
Натр едкий	кг	600	10	6000
Заработная плата	дней/ чел	8000	7	56000
Вода	м ³	400	30	12000
Электроэнергия	кВт·ч	900	24,43	21987
Теплоэнергия	Гкал	6301	2,1	13232

Продолжение таблицы 24

1	2	3	4	5
Итого себестоимость	тенге		-	1338075
Транспортно-заготовительные расходы	тенге		-	21350
Прочие производственные расходы	тенге		-	53020
Амортизация оборудования	тенге		-	66904
Административные расходы	тенге		-	93665
Итого полная себестоимость	тенге		-	1573014
Полная себестоимость на 1 кг	тенге		-	2097
Реализационная цена без НДС, тг	тенге		-	2621
НДС 12%	тенге		-	315
Реализационная цена с НДС,	тенге		-	2936
Прибыль до налогообложения	тенге		-	524
Налог на прибыль 20%	тенге		-	105
Чистая прибыль, т/кг	тенге		-	419
Рыночная цена продукции	тенге		-	2900-3500
Рентабельность	%		-	25

Суммарные производственные затраты на получение указанного количества продукции составляют 1338075 тенге, а с учетом транспортно-заготовительных, прочих производственных, амортизационных и административных расходов полная себестоимость производства достигает 1 573 014 тенге.

Расчетная полная себестоимость 1 кг лимонной кислоты составляет 2097 тенге. При установленной реализации продукции по цене 2621 тенге за 1 кг без учета НДС, прибыль до налогообложения составляет 524 тенге на 1 кг продукции. После уплаты налога на прибыль (20 %) чистая прибыль составляет 419 тенге на 1 кг продукции.

Проведенные расчеты показывают, что уровень рентабельности производства лимонной кислоты составляет около 25%, что свидетельствует об экономической целесообразности и эффективности, этом установленная расчетная цена реализации продукции остается конкурентоспособной по отношению к среднерыночной стоимости лимонной кислоты, которая составляет около 2900-3500 тенге за 1 кг, что подтверждает перспективность внедрения предложенной технологии в промышленное производство.

Для оценки экономической эффективности был проведён сравнительный анализ полной себестоимости опытной продукции и среднерыночной стоимости коммерческой лимонной кислоты (табл.25).

Таблица 25 – Сравнение экономических показателей опытной и коммерческой лимонной кислоты

Показатель	Опытная лимонная кислота	Коммерческая лимонная кислота	Экономический эффект
Полная себестоимость, тг/кг	2097	-	-
Рыночная цена, тг/кг	-	2900-3500	-
Разница (экономия), тг/кг	-	-	803-1403
Относительная экономия, %	-	-	27,7-40,1
Объём партии, кг	750	750	-
Экономический эффект на партию, тг	-	-	602250-1052250
Примечание. Расчёт выполнен при выходе лимонной кислоты 750 кг из 1000 кг кукурузного крахмала. Экономический эффект определён как разница между рыночной ценой коммерческой лимонной кислоты и полной себестоимостью опытной продукции			

Проведённые экономические расчёты показали, что технология получения лимонной кислоты является экономически эффективной. При переработке 1000 кг кукурузного крахмала выход целевого продукта составляет около 750 кг. Полная себестоимость производства партии продукции составляет 1573014 тенге, а себестоимость 1 кг лимонной кислоты – 2097 тенге.

Сравнение с коммерческой лимонной кислотой, среднерыночная цена которой составляет 2900-3500 тг/кг, показало, что себестоимость опытной продукции ниже на 803-1403 тг/кг, что соответствует экономии 27,7-40,1 %. Экономический эффект при производстве расчетной партии 750 кг лимонной кислоты составляет 602250-1052250 тенге.

Следует отметить, что при переходе на промышленный уровень ожидается снижение себестоимости за счёт оптовых закупок сырья, уменьшения доли фиксированных затрат; оптимизации энергопотребления.

Выводы по разделу 4

Полученные результаты свидетельствуют о том, что данная технология обеспечивает снижение себестоимости продукции при сохранении ее конкурентоспособности на рынке. Это подтверждает экономическую целесообразность и перспективность промышленного внедрения технологии производства лимонной кислоты, полученной на основе углеводсодержащего сырья.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённого комплексного исследования, направленного на совершенствование технологии производства лимонной кислоты на основе углеводсодержащего сырья, все поставленные задачи были последовательно решены.

1. Проведён скрининг и селекция активного продуцента лимонной кислоты. В результате многоступенчатого мутагенеза родительского штамма *Aspergillus CA20* получен новый высокопродуктивный штамм *A. niger R5/4*, обладающий кислотообразующей активностью 37,5 г/л. Полученный штамм запатентован, что подтверждает научную новизну и практическую значимость проведённых исследований.

2. Исследованы физико-химические свойства крахмалосодержащего сырья и обоснована возможность его применения в качестве субстрата для биосинтеза лимонной кислоты. Установлено, что наиболее технологически эффективным источником углерода является мальтодекстрин кукурузного крахмала с декстрозным эквивалентом $DE=19\pm1\%$, обеспечивающий стабильное поступление ферментируемых сахаров в процессе культивирования.

3. В результате проведённых исследований определены оптимальный состав питательной среды и параметры культивирования микроорганизма в лабораторных условиях. Установлено, что максимальная эффективность процесса достигается при следующих условиях: продолжительность ферментации – 168 ч, значение pH среды – 5,0, температура культивирования – 30°C, концентрация ферментируемых сахаров – 140 г/л на основе мальтодекстрина кукурузного крахмала ($DE = 19\%$). Определены оптимальные концентрации минеральных компонентов питательной среды: NH_4NO_3 – 3,8 г/л; KH_2PO_4 – 5,0 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,17 г/л; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,0018 г/л; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,0170 г/л; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,063 г/л. Установлено, что добавление этанола 3% и инокулята в концентрации 3% положительно сказывается на метаболизме *A. niger* и увеличивает выход лимонной кислоты.

4. Определены оптимальные параметры озонирования, при которых выход лимонной кислоты увеличился с 70,4 до 74,8 %.

5. В результате проведённых исследований были определены оптимальные параметры процесса: продолжительность культивирования – 167,2 часа, pH 5,0 и температура 30°C. При этих условиях получен максимальный выход лимонной кислоты 117,71 г/л. Это подтверждает высокую эффективность усовершенствованной технологии в масштабированных условиях.

6. Проведена комплексная оценка качества, подлинности и чистоты полученной лимонной кислоты. Установлено, что готовый продукт соответствует требованиям ГОСТ 908-2004 для лимонной кислоты пищевого назначения. Он характеризуется высокой степенью чистоты, а также выраженной восстановительной и хелатирующей активностью. Подлинность и чистота продукта подтверждены методом капиллярного электрофореза. Содержание основного вещества составило 99,36 %, а суммарное содержание

сопутствующих органических кислот (глюконовой и щавелевой) всего 0,33 %, что свидетельствует о высокой эффективности стадии очистки продукта. Результаты СЭМ-анализа показали формирование структурно стабильных и однородных кристаллов лимонной кислоты.

7. Проведённый технико-экономический анализ показал, что технология производства лимонной кислоты является экономически эффективной. Полная себестоимость опытной продукции составляет 2097 тг/кг, что на 803 тг/кг (27,7%) ниже среднерыночной цены коммерческой лимонной кислоты (2900 тг/кг). Экономический эффект при производстве 750 кг продукции достигает 602,25 тыс. тг, что подтверждает экономическую целесообразность и перспективность промышленного внедрения данной технологии.

8. Проведена опытно-промышленная апробация технологии на ТОО «Жаркентский крахмалопаточный завод», которая показала воспроизводимость полученных в работе результатов исследований, и возможность реализации в промышленности. Полученные результаты подтверждены актом производственных испытаний (Приложение Б). Разработана 1 рекомендация по получению лимонной кислоты из кукурузного крахмала с применением мутантного штамма *Aspergillus niger*R5/4 для предприятий (Приложение В).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Администрация Президента Республики Казахстан. Послание Главы государства Касым-Жомарта Токаева народу Казахстана «Экономический курс Справедливого Казахстана». – 01.09.2023. <https://www.akorda.kz/ru/poslanie-glavy-gosudarstva-kasym-zhomarta-tokaeva-narodu-kazahstana-ekonomicheskij-kurs-spravedlivogo-kazahstana-18588>. 21.10.2025.
- 2 Проекты по глубокой переработке зерна обсудили в Правительстве. – 2024. – URL: <https://ortcom.kz/ru/novosti/1732279569> .18.03.2025.
- 3 Książek E. Citric acid: properties, microbial production, and applications in industries // *Molecules*. – 2023. – Т. 29, № 1. – 22 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29010022>
- 4 Кудасов К., Берстенёв С., Волков Д., Жамбакин К. Лимонная кислота. Обзор // *Новости науки Казахстана*. – 2015. -№ 3. – С. 121-153.
- 5 Magnuson J. K., Lasure L. L. Organic acid production by filamentous fungi // *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. – 2016.
- 6 Kubicek C. P., Punt P., Visser J. Production of organic acids by filamentous fungi // *Industrial applications*. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. – С. 215-234. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8_10
- 7 John M. C. *Global Price Fixing* // *Studies in Industrial Organization*, 2nd ed.; Springer: Boston, MA, USA. – 2008.
- 8 Citric Acid Market Report. – 2025. – URL: <https://www.researchandmarkets.com/reports/5741687/citric-acid-market-report> .17 марта 2025.
- 9 West T. P. Citric acid production by *A. niger* using solid-state fermentation of agricultural processing coproducts // *Applied biosciences*. – 2023. – Т. 2, № 1. – P. 1-13. DOI: <https://doi.org/10.3390/applbiosci2010001>
- 10 Behera B. C. Citric acid from *A. niger*: a comprehensive overview // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2020. – Т. 46, № 6. – P. 727-749. DOI: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1828815>
- 11 Dhillon G. S., Brar S. K., Kaur S., Verma M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *A. niger* by rotating drum type solid-state bioreactor // *Industrial Crops and Products*. – 2013. – Т. 41. – P. 78-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.001>
- 12 Ciriminna R., Chavarría-Hernández N., Inés Rodríguez Hernández A., Pagliaro M. Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint // *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. – 2015. – Т. 9, № 4. – P. 368-377. DOI: <https://doi.org/10.1002/bbb.1551>
- 13 Ke S., Huang Y., Decker E. A., Hultin H. O. Impact of citric acid on the tenderness, microstructure and oxidative stability of beef muscle // *Meat science*. – 2009. – Т. 82, № 1. – P. 113-118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.12.010>
- 14 Sammel L. M., Claus J. R. Citric acid and sodium citrate effects on pink color development of cooked ground turkey irradiated pre-and post-cooking // *Meat science*.

- 2006. – T. 72. – №. 3. – P. 567-573. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.09.006>
- 15 Queiroz C., da Silva A. J. R., Lopes M. L. M., Fialho E., Valente-Mesquita V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing // Food Chemistry. – 2011. – T. 125, № 1. – P. 128-132. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.048>
- 16 Lücke F.-K. Food Technologies: Biopreservation // Encyclopedia of Food Safety / ed. by Y. Motarjemi. Vol. 3. Academic Press, 2014. P. 135–139. DOI: 10.1016/B978-0-12-378612-8.00272-9
- 17 Eleni M., Theodoros V. Effect of storage conditions on the sensory quality, colour and texture of fresh-cut minimally processed cabbage with the addition of ascorbic acid, citric acid and calcium chloride // Food and Nutrition Sciences. – 2011. – T2. – P. 956-963. DOI: <https://doi.org/10.4236/fns.2011.29130>
- 18 Lambros M., Tran T., Fei Q., Nicolaou M. Citric acid: A multifunctional pharmaceutical excipient // Pharmaceutics. – 2022. – T. 14, № 5. – 972 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050972>
- 19 Fiume M. M., Heldreth B. A., Bergfeld W. F., Belsito D. V., Hill R. A., Klaassen C. D., Liebler D. C., Marks Jr J. G., Shank R. C., Slaga T. J. Safety assessment of citric acid, inorganic citrate salts, and alkyl citrate esters as used in cosmetics // International journal of toxicology. – 2014. – T. 33, № 2. – P. 16-46. DOI: <https://doi.org/10.1177/1091581814526891>
- 20 Meijer G. W., Kanny G., Briois J. F. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry // Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA. – 2000.- № 1. DOI: <https://doi.org/10.1002/14356007>
- 21 Leśniak, Władysław. Biotechnologia żywności: procesy fermentacji i biosyntezy. / Leśniak W.: Wydaw. Akademii Ekonomicznej im. Oskara Langego, 2002.
- 22 Poerwono H., Higashiyama K., Kubo H., Achmad Toto Poernomo N., Sudiana I. K., Indrayanto G., Brittain H. G. Citric acid //. – 2001. – T.28. – P.1-76. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1075-6280\(01\)28002-1](https://doi.org/10.1016/S1075-6280(01)28002-1)
- 23 Oliveira M. L. N., Malagoni R. A., Franco Jr M. R. Solubility of citric acid in water, ethanol, n-propanol and in mixtures of ethanol+ water // Fluid Phase Equilibria. – 2013. – T. 352. – P. 110-113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.05.014>
- 24 Wyrzykowski D., Hebanowska E., Nowak-Wicz G., Makowski M., Chmurzyński L. Thermal behaviour of citric acid and isomeric aconitic acids // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. – 2011. – T. 104, № 2. – P. 731-735. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-010-1015-2>
- 25 Pietkiewicz J. J. Biosynteza kwasu cytrynowego przez *A. niger* w warunkach jedno-i wielostopniowych hodowli ciągłych // Prace Naukowe Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu. Seria: Monografie i Opracowania (nr 100). – 2002.- № 927. ISSN 0324-8445

26 Buchholz K., Collins J. The roots—a short history of industrial microbiology and biotechnology // Applied microbiology and biotechnology. – 2013. – T. 97. – P. 3747-3762. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4768-2>.

27 Vandenberghe L., Rodrigues C., De Carvalho J., Medeiros A., Soccol C. Production and application of citric acid // Current developments in biotechnology and bioengineering Elsevier, 2017. – P. 557-575. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00025-7>

28 Chen Y., Nielsen J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms // Current opinion in biotechnology. – 2016. – T. 37. – P. 165-172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.004>

29 Singh Dhillon G., Kaur Brar S., Verma M., Tyagi R. D. Recent advances in citric acid bio-production and recovery // Food and Bioprocess Technology. – 2011. – T. 4. – P. 505-529. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0399-0>

30 Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J., Van Dijck P. On the safety of *A. niger*—a review // Applied microbiology and biotechnology. – 2002. – T. 59. – P. 426-435. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>

31 Ozdal M., Kurbanoglu E. B. Citric acid production by *A. niger* from agro-industrial by-products: Molasses and chicken feather peptone // Waste and Biomass Valorization. – 2019. – T. 10. – P. 631-640. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0240-y>

32 Steiger M. G., Rassinger A., Mattanovich D., Sauer M. Engineering of the citrate exporter protein enables high citric acid production in *A. niger* // Metabolic engineering. – 2019. – T. 52. – P. 224-231. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.004>

33 Roukas T., Kotzekidou P. Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *A. niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions // Environmental Science and Pollution Research. – 2020. – T. 27, № 12. – P. 13105-13113. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07928-9>

34 Kumar L. R., Yellapu S. K., Yan S., Tyagi R. D., Drogui P. Elucidating the effect of impurities present in different crude glycerol sources on lipid and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SKY7 // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2021. – T. 96, № 1. – P. 227-240. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.6531>

35 Vandenberghe L. P., Soccol C. R., Pandey A., Lebeault J.-M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *A. niger* // Bioresource Technology. – 2000. – T. 74, № 2. – P. 175-178. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00107-8)

36 Ait-Lahsen H., Soler A. s., Rey M., de la Cruz J. s., Monte E., Llobell A. An antifungal exo- α -1, 3-glucanase (AGN13. 1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – T. 67, № 12. – P. 5833-5839. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5833-5839.2001>

37 Viterbo A., Ramot O., Chernin L., Chet I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens // Antonie Van

Leeuwenhoek. – 2002. – Т. 81. – С. 549-556. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020553421740>

38 Ellaiah P., Prabhakar T., Ramakrishna B., Taleb A. T., Adinarayana K. Strain improvement of *A. niger* for the production of lipase // *Indian Journal of Microbiology*. – 2002. – Т. 42, № 2. – P. 151-153.

39 Щербакова Е., Никифорова Т., Львова Е., Степанова А. Способ отбора штамма гриба *A. niger*-продуцента лимонной кислоты//. – 2003.

40 Niu J., Arentshorst M., Nair P. D. S., Dai Z., Baker S. E., Frisvad J. C., Nielsen K. F., Punt P. J., Ram A. F. Identification of a classical mutant in the industrial host *A. niger* by systems genetics: *LaeA* is required for citric acid production and regulates the formation of some secondary metabolites // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2016. – Т. 6, № 1. – P. 193-204. DOI: <https://doi.org/10.1534/g3.115.024067>

41 Henner W., Grunberg S., Haseltine W. Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks // *Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – Т. 257, № 19. – P. 11750-11754.

42 Tabuchi T., Hara S. Conversion of citrate fermentation to polyol fermentation in *Candida lipolytica* // book conversion of citrate fermentation to polyol fermentation in *Candida lipolytica* / editor Japan Soc Biosci Biotechn Agrochem Japan Acad Soc Ctr Bldg, 2-4-6 Yayoi, 1973. – P. 33-34.

43 Adeoye A., Lateef A., Gueguim-Kana E. Optimization of citric acid production using a mutant strain of *A. niger* on cassava peel substrate // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2015. – Т. 4, № 4. – P. 568-574. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.004>

44 Pelechova J., Petrova L., Ujcova E., Martinkova L. Selection of a hyperproducing strain of *A. niger* for biosynthesis of citric acid on unusual carbon substrates // *Folia microbiologica*. – 1990. – Т. 35. – P. 138-142. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02820770>

45 Shafique S., Bajwa R., Shafique S. Strain improvement in *Trichoderma viride* through mutation for overexpression of cellulase and characterization of mutants using random amplified polymorphic DNA (RAPD) // *African Journal of Biotechnology*. – 2011. – Т. 10, № 84. – P. 19-59. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB10.2464>

46 Crawford I. T., Streips U. N. Methods for mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* // *Journal of microbiological methods*. – 1990. – Т. 11, № 3-4. – P. 241-246. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(90\)90060-J](https://doi.org/10.1016/0167-7012(90)90060-J)

47 Rosenkranz H. S., Rosenkranz S., Schmidt R. M. Effects of nitrosomethylurea and nitrosomethylurethane on the physical chemical properties of DNA // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. – 1969. – Т. 195, № 1. – P. 262-265. DOI: [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(69\)90627-3](https://doi.org/10.1016/0005-2787(69)90627-3)

48 Grimaux E., Adam P. Synthese der citronensäure // *Journal fuer praktische Chemie*. – 1880. – Т. 22, № 1. – P. 105-107.

49 Akiyama S.-i., Suzuki T., Sumino Y., Nakao Y., Fukuda H. Induction and citric acid productivity of fluoroacetate-sensitive mutant strains of *Candida lipolytica*

// Agricultural and Biological Chemistry. – 1973. – Т. 37, № 4. – P. 879-884. DOI: <https://doi.org/10.1080/00021369.1973.10860763>

50 Prasad M., Sridevi V., Surendrababu N., Reddy O., Harsha N. Studies on fermentative production of citric acid by *A. niger* isolate using sorghum malt and it's optimization // IJIR Sci. Eng. Technol. – 2013. – Т. 2, № 7. – P. 2961-2968.

51 Ikram-Ul H., Ali S., Qadeer M., Iqbal J. Citric acid production by selected mutants of *A. niger* from cane molasses // Bioresource Technology. – 2004. – Т. 93, № 2. – P. 125-130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.018>

52 Kirimura K., Hirowatari Y., Usami S. Alterations of respiratory systems in *A. niger* under the conditions of citric acid fermentation // Agricultural and biological chemistry. – 1987. – Т. 51, № 5. – P. 1299-1303. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb1961.51.1299>

53 Фаусек Е. А. Физиолого-биохимические особенности биосинтеза изолимонной кислоты дрожжами из этанола; Ин-т биохимии и физиологии микроорганизмов, 1991.

54 Karaffa L., Kubicek C. P. *A. niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? // Applied microbiology and biotechnology. – 2003. – Т. 61. – P. 189-196. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1201-7>

55 Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *A. niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling // Biotechnology advances. – 2007. – Т. 25, № 3. – P. 244-263. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>

56 Legiša M., Matthey M. Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *A. niger* // Biotechnology letters. – 2007. – Т. 29. – P. 181-190. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9235-z>

57 Karaffa L., Sándor E., Fekete E., et al. The biochemistry of citric acid of accumulation by *A. niger* (A review) // Acta microbiologica et immunologica Hungarica. – 2001. – Т. 48, № 3-4. – P. 429-440. DOI: <https://doi.org/10.1556/amicr.48.2001.3-4.11>

58 Li C., Yang X., Gao S., Wang H., Lin C. S. K. High efficiency succinic acid production from glycerol via in situ fibrous bed bioreactor with an engineered *Yarrowia lipolytica* // Bioresource Technology. – 2017. – Т. 225. – P. 9-16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.016>

59 Yang L., Lübeck M., Lübeck P. S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production // Fungal Biology Reviews. – 2017. – Т. 31, № 1. – P. 33-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.001>

60 Cordes T., Michelucci A., Hiller K. Itaconic acid: the surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite // Annual review of nutrition. – 2015. – Т. 35, № 1. – P. 451-473. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034243>

61 Yang X., Kim D. S., Choi H. S., Kim C. K., Thapa L. P., Park C., Kim S. W. Repeated batch production of 1, 3-propanediol from biodiesel derived waste glycerol by *Klebsiella pneumoniae* // Chemical Engineering Journal. – 2017. – Т. 314. – P. 660-669. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.029>

- 62 Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism // *Cell biochemistry and biophysics*. – 2014. – T. 68, № 3. – P. 475-478. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12013-013-9750-1>
- 63 Soccol C. R., Vandenberghe L. P., Rodrigues C., Pandey A. New perspectives for citric acid production and application // *Food Technology and Biotechnology*. – 2006. – T. 44, № 2. – P. 141-149.
- 64 Shu P., Johnson M. J. The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation // *Journal of bacteriology*. – 1948. – T. 56. – №. 5. – P. 577-585.
- 65 Max B., Salgado J. M., Rodríguez N., Cortés S., Converti A., Domínguez J. M. Biotechnological production of citric acid // *Brazilian journal of Microbiology*. – 2010. – T. 41. – P. 862-875. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400005>
- 66 Kishore K. A., Kumar M. P., Krishna V. R., Reddy G. V. Optimization of Process Variables of Citric Acid Production Using *A. niger* In A Batch Fermentor // *Engineering Letters*. – 2008. – T. 16, № 4. – P. 572-577.
- 67 Ali S., Haq I.-u., Qadeer M., Iqbal J. Production of citric acid by *A. niger* using cane molasses in a stirred fermentor // *Electronic Journal of Biotechnology*. – 2002. – T. 5, № 3. – P. 19-20.
- 68 Xu D.-B., Kubicek C. P., Röhr M. A comparison of factors influencing citric acid production by *A. niger* grown in submerged culture and on filter paper // *Applied microbiology and biotechnology*. – 1989. – T. 30. – P. 444-449. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00263848>
- 69 Papadaki E., Mantzouridou F. T. Citric acid production from the integration of Spanish-style green olive processing wastewaters with white grape pomace by *A. niger* // *Bioresource Technology*. – 2019. – T. 280. – P. 59-69. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.139>
- 70 Alam M. Z., Bari M. N., Muyibi S. A., Jamal P. Development of culture inoculum for scale-up production of citric acid from oil palm empty fruit bunches by *A. niger* // *Procedia Environmental Sciences*. – 2011. – T. 8. – P. 396-402. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.062>
- 71 Amenaghawon N., Osazuwa O., Okieimen C. Dynamic Modelling and Simulation of Citric Acid Production from Dilute Acid Hydrolysed Corn Starch Using *A. niger* // *Nigerian Journal of Technology*. – 2014. – T. 33, № 2. – P. 222-229. DOI: <https://doi.org/10.4314/njt.v33i2.12>
- 72 Matthey M. The production of organic acids // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 1992. – T. 12, № 1-2. – P. 87-132. DOI: <https://doi.org/10.3109/07388559209069189>
- 73 Kubicek C., Röhr M. Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *A. niger* // *European journal of applied microbiology and biotechnology*. – 1977. – T. 4. – P. 167-175. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01390476>
- 74 Gupta J., Heding L., Jorgensen O. Effect of sugars, hydrogen ion concentration and ammonium nitrate on the formation of citric acid by *A. niger* // *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. – 1976. – T. 23, № 1. – P. 63-67.

- 75 Ghanbartabar S. A., Najafpour G. D., Mohammadi M. Comparative studies on citric acid production from cheese whey by submerged and immobilized *A. niger* // Pakistan Journal of Biotechnology. – 2016. – T. 13, № 2. – P. 79-85.
- 76 Show P. L., Oladele K. O., Siew Q. Y., Aziz Zakry F. A., Lan J. C.-W., Ling T. C. Overview of citric acid production from *A. niger* // Frontiers in life science. – 2015. – T. 8, № 3. – P. 271-283. DOI: <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>
- 77 Lotfy W. A., Ghanem K. M., El-Helow E. R. Citric acid production by a novel *A. niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs // Bioresource technology. – 2007. – T. 98, № 18. – P. 3470-3477. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.032>
- 78 Al-Mahin A., Hasan S. M., Khan M. H., Begum R. Citric acid production by *A. niger* through solid-state fermentation on sugarcane bagasse // Bangladesh Journal of Microbiology. – 2008. – T. 25, № 1. – P. 9-12. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjm.v25i1.4664>
- 79 Zhuang X., Zhang H., Yang J., Qi H. Preparation of levoglucosan by pyrolysis of cellulose and its citric acid fermentation // Bioresource Technology. – 2001. – T. 79, № 1. – P. 63-66. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00023-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00023-2)
- 80 Drysdale C., McKay A. Citric acid production by *A. niger* in surface culture on inulin // Letters in applied microbiology. – 1995. – T. 20, № 4. – P. 252-254. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00440.x>
- 81 Shetty V. G. Production and optimization of citric acid by *A. niger* using molasses and corncob // Int J Pharm Pharm Sci. – 2015. – T. 7, № 5. – P. 152-157.
- 82 Addo M. G., Kusi A., Andoh L., Obiri-Danso K. Citric acid production by *A. niger* on acorn cob solid substrate using one-factor-at-a-time optimisation method //. – 2016. – T.3, №1. – P. 95-99. DOI: <https://doi.org/10.17148/IARJSET.2016.312099>
- 83 Ghanbarzadeh B., Almasi H., Entezami A. A. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose // Industrial Crops and products. – 2011. – T. 33, № 1. – P. 229-235. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.016>
- 84 Angumeenal A., Venkappayya D. An overview of citric acid production // LWT-Food Science and Technology. – 2013. – T. 50, № 2. – P. 367-370. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.016>
- 85 Książek, E. E., Janczar-Smuga, M., Pietkiewicz, J. J., & Walaszczyk, E. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from waste glycerol using the central composite rotatable design of experiments //Molecules. – 2023. – T. 28. – №. 7. – P. 3268. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28073268>
- 86 Haq I.-U., Ali S., Qadeer M., Iqbal J. Stimulatory effect of alcohols (methanol and ethanol) on citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *A. niger* GCB-47 // Bioresource Technology. – 2003. – T. 86, № 3. – P. 227-233. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00172-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00172-4)
- 87 Anastassiadis S., Morgunov I. G., Kamzolova S. V., Finogenova T. V. Citric acid production patent review // Recent patents on biotechnology. – 2008. – T. 2, № 2. – P. 107-123. DOI: <https://doi.org/10.2174/187220808784619757>

88 Sarangbin S., Watanapokasin Y. Yam bean starch: a novel substrate for citric acid production by the protease-negative mutant strain of *A. niger* // Carbohydrate polymers. – 1999. – Т. 38, № 3. – P. 219-224. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00094-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00094-0)

89 Шарова Н., Никифорова Т. Современная биотехнология лимонной кислоты и кислотостабильных ферментов // Современные наукоемкие технологии. – 2005. № 8. – С. 79-79.

90 Кулёв Д., Шарова Н. Применение гидролизатов крахмала в производстве пищевых кислот // Глубокая переработка зерна для производства крахмала, его модификаций и сахаристых продуктов. Тенденции развития производства и потребления, 2013. – С. 159-163.

91 Betiku E., Adesina O. A. Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *A. niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate // Biomass and Bioenergy. – 2013. – Т. 55. – P. 350-354. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.034>

92 Suzuki A., Sarangbin S., Kirimura K., Usami S. Direct production of citric acid from starch by a 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of *A. niger* // Journal of fermentation and bioengineering. – 1996. – Т. 81, № 4. – P. 320-323. DOI: [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)80584-8](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)80584-8)

93 Mourya S., Jauhri K. Production of citric acid from starch-hydrolysate by *A. niger* // Microbiological research. – 2000. – Т. 155, № 1. – P. 37-44. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80020-8](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80020-8)

94 Almousa A. A., Abd El-Ghany M. N., Ashour E. H. Citric acid fermentation by *A. niger* // Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences. – 2018. – Т. 5, № 4. – P. 20-37.

95 Papagianni M., Wayman F., Matthey M. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *A. niger* // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – Т. 71, № 11. – P. 7178-7186. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7178-7186.2005>

96 Ali S., Qadeer M., Iqbal J. Optimization of nitrogen for enhanced citric acid productivity by a 2-deoxy D-glucose resistant culture of *A. niger* NGd-280 // Bioresource technology. – 2005. – Т. 96, № 5. – P. 645-648. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.010>

97 Dashen M., Ado S., Ameh J., Mawak J. Effect of Different Nitrogen Sources on Citrus Acid Production by *A. NIGER* //. – 2008.

98 Pandey A., Soccol C. R., Rodriguez-Leon J. A., Nigam P. S.-N. “Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications” Reference Book //. – 2001. ISBN (Print)81-87680-06-7

99 Kristiansen B., Sinclair C. Production of citric acid in continuous culture // Biotechnology and Bioengineering. – 1979. – Т. 21, № 2. – P. 297-315. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.260210214>

100 Shankaranand V., Lonsane B. Ability of *A. niger* to tolerate metal ions and minerals in a solid-state fermentation system for the production of citric acid // Process

Biochemistry. – 1994. – T. 29, № 1. – P. 29-37. DOI: [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80056-1](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80056-1)

101 Kubicek C., Zehentgruber O., Röhr M. An indirect method for studying the fine control of citric acid formation by *A. niger* // Biotechnology Letters. – 1979. – T. 1. – P. 47-52. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01395790>

102 Vandenberghe L. P., Soccol C. R., Pandey A., Lebeault J.-M. Microbial production of citric acid // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 1999. – T. 42., №3 – P. 263-276. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000300001>

103 Milsom P. Organic acids by fermentation, especially citric acid // Food Biotechnology-1Springer, 1987. – P. 273-307. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-009-3411-5_7

104 Moyer A. J. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture: I. Nature of the alcohol effect // Applied Microbiology. – 1953. – T. 1, № 1. – P. 1-7.

105 Takahashi J. Studies on the effect of some physical conditions on the submerged mold culture. VI. Effects of non-ionic surface-active agents on the mycelial forms of *Asp. niger* NRRL-337 and its amylase production // J. Agric. Chem. Soc. Jpn. – 1960. – T. 34. – P. 1043-1045.

106 Van Suijdam J., Kossen N., Paul P. An inoculum technique for the production of fungal pellets // European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. – 1980. – T. 10. – P. 211-221. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00508608>

107 Khattab A. A., Salem A., Soheam A. E. Optimization of citric acid production by *A. niger* isolated from different habitats // Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences. – 2017. – T. 8, № 6. – P. 614-623.

108 Ali S., Ashraf H. Enhancement in citrate production by alcoholic limitation // OnLine Journal of Biological Sciences (Pakistan). – 2002. – T. 2, № 2. – P.70-72. DOI: <https://doi.org/10.3923/jbs.2002.70.72>

109 Maharani V., Reeta D., Sundaramanickam A., Vijayalakshmi S., Balasubramanian T. Isolation and characterization of citric acid producing *A. niger* from spoiled coconut // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2014. – T. 3, № 3. – P. 700-705. IJCMAS.

110 Farouk A. Effect of alcohols and related compounds on citric acid production from beet molasses by *A. niger*//. – 1978. Pascal and Francis Bibliographic Databases

111 Manonmani H., Sreekantiah K. Studies on the conversion of cellulose hydrolysate into citric acid by *A. niger* // Process Biochemistry. – 1987. – T. 22, № 3. – P. 92-94.

112 Georgieva M., Philipova K., Charakchieva S., Petkov G., Aleksieva K. Influence of methanol on the phospholipid and fatty acid composition of *A. niger* IM-13 during citric acid fermentation // Comptes rendus-academie bulgare des sciences. – 1992. – T. 45, № 5. – P. 87-90.

113 Dasgupta J., Nasim S., Khan A., Vora V. Production of citric acid in molasses medium: effect of addition of lower alcohols during fermentation // *Journal of Microbial Biotechnology*. – 1994. – T. 9, № 2. – P. 123-125.

114 Barrington S., Kim J.-W. Response surface optimization of medium components for citric acid production by *A. niger* NRRL 567 grown in peat moss // *Bioresource technology*. – 2008. – T. 99, № 2. – P. 368-377. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.007>

115 A. Nadeem., Q. Syed., S. Baig., M. Irfan., M. Nadeem. Enhanced production of citric acid by *A. niger* M-101 using lower alcohols // *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]. – 2010. – T. 35, № 1. – P. 7-13.

116 Rugasaseel S., Morikawa S., Kirimura K., Usami S. Stimulation of citric acid production in *A. niger* by addition of viscous substances in shake culture // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1995. – T. 42. – P. 839-843. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00191179>

117 Ali S., Haq I. Role of different additives and metallic micro minerals on the enhanced citric acid production by *A. niger* MNNG-115 using different carbohydrate materials // *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*. – 2005. – T. 45, № 1. – P. 3-11. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.200410460>

118 Kurbanoglu E. B. Enhancement of citric acid production with ram horn hydrolysate by *A. niger* // *Bioresource Technology*. – 2004. – T. 92, № 1. – P. 97-101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.08.002>

119 Auta H. S., Abidoye K. T., Tahir H., Ibrahim A. D., Aransiola S. A. Citric acid production by *A. niger* cultivated on *Parkia biglobosa* fruit pulp// *International scholarly research notices*. – 2014. – T. 2014, № 1. – P. 20-21. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/762021>

120 Andersen M. R., Lehmann L., Nielsen J. Systemic analysis of the response of *A. niger* to ambient pH // *Genome Biology*. – 2009. – T. 10. – P. 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-5-r47>

121 Walaszczyk E., Podgórski W., Janczar-Smuga M., Dymarska E. Effect of medium pH on chemical selectivity of oxalic acid biosynthesis by *A. niger* W78C in submerged batch cultures with sucrose as a carbon source // *Chemical paper*. – 2018. – T. 72. – P. 1089-1093. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11696-017-0354-x>

122 Papagianni M., Matthey M. Morphological development of *A. niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology // *Microbial cell factories*. – 2006. – T. 5. – P. 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-3>

123 Ujcová E., Fenclová Z., Musilková M., Seichert L. Dependence of release of nucleotides from fungi on fermentor turbine speed // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1980. – T. 22, № 1. – P. 237-241. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.260220119>

- 124 König B., Seewald C., Schügerl K. Process engineering investigations of penicillin production // European journal of applied microbiology and biotechnology. – 1981. – T. 12. – P. 205-211. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00499488>
- 125 Mitard A., Riba J. Morphology and growth of *A. niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates // Biotechnology and Bioengineering. – 1988. – T. 32, № 6. – P. 835-840. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.260320617>
- 126 Shankar T., Sivakumar T. Optimization of citric acid production using *A. niger* isolated from the leaf litter soil of Sathuragiri Hills // Universal Journal of Microbiology Research. – 2016. – T. 4, № 4. – P. 79-87. DOI: <https://doi.org/10.13189/ujmr.2016.040401>
- 127 Ramesh T., Kalaiselvam M. An experimental study on citric acid production by *A. niger* using *Gelidiella acerosa* as a substrate // Indian journal of microbiology. – 2011. – T. 51. – P. 289-293. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0066-9>
- 128 Bhattacharjee I., Baruah P. Isolation and screening of citric acid producing *Aspergillus* Spp and optimisation of citric acid production by *A. niger* S-6 // Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. – 2015. – T. 9, № 3. – P. 19-23. DOI: <https://doi.org/10.6084/M9.FIGSHARE.1347401.V1>
- 129 Box G. E., Behnken D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables // Technometrics. – 1960. – T. 2, № 4. – P. 455-475. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00401706.1960.10489912>
- 130 Experimental design in biotechnology. / Haaland P. D.: CRC press, 2020. – .284 p. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781003065968>
- 131 Strobel Jr R., Nakatsukasa W. Response surface methods for optimizing *Saccharopolyspora spinosa*, a novel macrolide producer // Journal of industrial microbiology and biotechnology. – 1993. – T. 11, № 2. – P. 121-127. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01583684>
- 132 Dhillon G., Brar S., Verma M., Tyagi R. Enhanced solid-state citric acid bio-production using apple pomace waste through surface response methodology // Journal of applied microbiology. – 2011. – T. 110, № 4. – P. 1045-1055. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04962.x>
- 133 Dhillon G. S., Brar S. K., Verma M., Tyagi R. D. Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *A. niger* // Biochemical Engineering Journal. – 2011. – T. 54, № 2. – P. 83-92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.02.002>
- 134 Ozone in food processing. / O'Donnell C., Tiwari B. K., Cullen P., Rice R. G.: John Wiley & Sons, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118307472>
- 135 Uhm H. S., Choi E. H., Cho G. S., Hwang D. H. Influence of reactive oxygen species on the sterilization of microbes // Current Applied Physics. – 2013. – T. 13. – P. 30-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cap.2012.12.018>
- 136 Schneider P. M. New technologies and trends in sterilization and disinfection // American journal of infection control. – 2013. – T. 41, № 5. – P. 81-86. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.007>
- 137 Redigueri C. F., de Jesus Andreoli Pinto T., Bou-Chacra N. A., Galante R., de Araújo G. L. B., do Nascimento Pedrosa T., Maria-Engler S. S., De Bank P. A.

Ozone gas as a benign sterilization treatment for PLGA nanofiber scaffolds // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – 2016. – Т. 22, № 4. – P. 338-347. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0298>

138 Dufresne S., Leblond H., Chaunet M. Relationship between lumen diameter and length sterilized in the 125L ozone sterilizer // *American journal of infection control*. – 2008. – Т. 36, № 4. – P. 291-297. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2007.06.006>

139 Бурак Л. Использование технологии озонирования в пищевой промышленности // *Sciences of Europe*. – 2022. № 98. – С. 85-100.

140 ГОСТ 13496.15–97. Корма, комбикорма, комбикормовое сырьё. Методы определения содержания жира. — Москва: ИПК Издательство стандартов, 1998. — 8 с.

141 Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Т. 72, № 1-2. – P. 248-254. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

142 Juliano B. O., Tuaño A., Monteroso D., Aoki N., Mestres C., Duldulao J., Bergonio K. Replacement of acetate with ammonium buffer to determine apparent amylose content of milled rice // *Cereal Foods World*. – 2012. – Т. 57, № 1. – 14 p.

143 Juliano B. O. A simplified assay for milled-rice amylose // *Cereal Sci. Today*. – 1971. – Т. 12. – P. 334-360.

144 Antonio-Estrada C., Bello-Pérez L., Martínez-Sánchez C., Montañez-Soto J., Jiménez-Hernández J., Vivar-Vera M. Enzymatic production of maltodextrins from taro (*Colocasia esculenta*) starch // . – 2009.

145 Dokic P., Jakovljevic J., Dokic-Baucal L. Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 1998. – Т. 141, № 3. – P. 435-440. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(97\)00118-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(97)00118-0)

146 Лукин Н. Д., Ананских В. В., Лapidус Т. В., Хворова Л. С. Технологический контроль производства сахаристых крахмалопродуктов // . – 2007.

147 Алиева И., Бабьева И., Бызов Б. Методы почвенной микробиологии и биохимии. /Под. ред // ДГ Звягинцева. М.: Изд-во Московского университета. – 1991.

148 The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. / Dugan F. M., 2006.

149 Корса-Вавилова, Е. В., Егоров, И. А., Штеле, А. Л., Волчков, В. И., Разумовский, С. Д. Озонирование производственных помещений, инкубационных и пищевых яиц // *Птицеводство*. – 2011. – № 12. – С. 39-41. ISSN: 0033-3239

150 Priede M., Viesturs U. Effect of pulsing mixing interruptions on the *A. niger* morphology and citric acid production // *Chemical and biochemical engineering quarterly*. – 2005. – Т. 19, № 4. – P. 359-366. <https://hrcak.srce.hr/3632>

- 151 Konczak I., Zhang W. Anthocyanins—more than nature's colours // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2004. – Т. 2004. – №. 5. – P. 239-240. DOI: <https://doi.org/10.1155/S1110724304407013>
- 152 Benzie I. F. F., Strain J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay // *Analytical biochemistry*. – 1996. – Т. 239. – №. 1. – P. 70-76. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- 153 Dinis T. C. P., Madeira V. M. C., Almeida L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1994. – Т. 315. – №. 1. – P. 161-169. DOI: <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1485>
- 154 Munteanu I. G., Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Т. 22. – №. 7. – P. 33-80. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- 155 Abirami S., Revathi P., Pushpa A. S. R., Kannan M. Random UV Mutagenesis Stimulated over Production of Citric Acid by *A. niger* // *International Journal of Recent Research Aspects* ISSN:2349-7688, Special Issue: Conscientious Computing Technologies. – 2018. – P. 316-324.
- 156 Angumeenal A., Kamalakannan P., Prabhu H., Venkappayya D. Effect of transition metal cations on the production of citric acid using mixed cultures of *A. niger* and *Candida guilliermondii* // *Journal of the Indian Chemical Society*. – 2003. – Т. 80, № 10. – P. 903-906.
- 157 Roukas T. Production of citric acid from beet molasses by immobilized cells of *A. niger* // *Journal of Food Science*. – 1991. – Т. 56, № 3. – P. 878-880. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05409.x>
- 158 Винаров А. Ю., Сидоренко Т. Е., Сметанина С. Е., Яшина В. Н. Штамм гриба *A. niger* — продуцент лимонной кислоты: патент РФ № RU2103346C1; заявл. 27.06.1996; опубл. 27.01.1998.
- 159 Shaimenova B., Ospankulova G., Saduakhasova S., Murat L., Toimbayeva D. Improving the citric acid production by mutant strains *A. niger* using carbohydrate-containing raw materials as a carbon source// *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. - 2024.-№ 18.- P. 157–173// DOI: <https://doi.org/10.5219/1948>
- 160 Haq I. U., Ali S., Iqbal J. Direct production of citric acid from raw starch by *A. niger* // *Process Biochemistry*. – 2003. – Т. 38. – №. 6. – P. 921-924. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00201-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00201-7)
- 161 Tong, Z., Zheng, X., Tong, Y., Shi, Y. C., & Sun, J. Systems metabolic engineering for citric acid production by *A. niger* in the post-genomic era // *Microbial cell factories*. – 2019. – Т. 18. – №. 1. – 28 p. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1064-6>
- 162 Sawant O., Mahale S., Ramchandran V., Nagaraj G., Bankar A. Fungal citric acid production using waste materials: a mini-review // *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. – 2018. – Т. 8, № 2. – P. 821-828. DOI: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.2.821-828>

163 Aboyeji O., Oloke J., Arinkoola A., Oke M., Ishola M. Optimization of media components and fermentation conditions for citric acid production from sweet potato peel starch hydrolysate by *A. niger* // Scientific African. – 2020. – T. 10. – 554 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00554>

164 Williamson J. R., Smith C. M., LaNoue K. F., Bryla J. Feedback control of the citric acid cycle // Energy metabolism and the regulation of metabolic processes in mitochondria Academic Press New York, 1972. – P. 667-679.

165 Chaudhary K., Ethiraj S., Lakshminarayana K., Tauro P. Citric acid production from Indian cane molasses by *A. niger* under solid state fermentation conditions // Journal of fermentation technology. – 1978. – T. 56, № 5. – P. 554-557.

166 Kim J. G., Yousef A. E., Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review // Journal of food protection. – 1999. – T. 62. – №. 9. – P. 1071-1087. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.1071>

167 Herbold K., Flehmig B., Botzenhart K. Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms // Applied and environmental microbiology. – 1989. – T. 55. – №. 11. – P. 2949-2953. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.55.11.2949-2953.1989>

168 Farooq S., Akhlaque S. Comparative response of mixed cultures of bacteria and virus to ozonation // Water research. – 1983. – T. 17. – №. 7. – P. 809-812. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90076-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90076-3)

169 Igliński B., Piechota G., Iwański P. Modification of Citric Acid Technology Using Electrodialysis // Sustainable Chemical Engineering. – 2020. – P. 62-71. DOI: <https://doi.org/10.37256/sce.122020179.62-71>

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Технология производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан

АО «КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С.СЕЙФУЛЛИНА»

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КУКУРУЗНОГО КРАХМАЛА

Нур-Султан, 2019

Настоящая технология получения лимонной кислоты из кукурузного крахмаларазработана для крахмалопаточных производств. Лимонная кислота используется в производстве различных напитков - газированных, негазированных безалкогольных, тонизирующих, сухих напитков, холодных чаев; в кондитерской и хлебопекарной отраслях, консервной промышленности, при производстве соусов, кетчупов, майонезов, плавленых сыров, замороженных продуктов; животноводстве, косметической и фармацевтической промышленности и т. д.

1 Сырье и дополнительные материалы

Суспензия крахмала поступает в паточный цех, концентрация суспензии крахмала должна быть 30% сухих веществ (СВ), температура 26 –30 °С.

При более низком содержании сухих веществ в суспензии необходимо внести в нее дополнительно сухой крахмал.

В качестве производственного штамма применяют микромицет *Aspergillus niger* R5/4, обладающий высокой кислотообразующей активностью. В лабораторных условиях культуру получают размножением конидий в пробирках на агаризованной среде Чапека-Докса (г/л, сахара - 30,0; нитрат натрия - 2,0; сульфат магния - 0,5; хлорид калия - 0,5; сульфат железа (III) - 0,01; фосфат калия двузамещенный - 1,0; агар-агар - 20,0), а затем в колбах, инкубация при 30°С, 150 об/мин в течение 7 суток. Зрелые конидии собирают в одну емкость при соблюдении правил асептики и переносят в посевной аппарат.

При производстве лимонной кислоты используется следующее сырье и материалы:

- Кукурузный крахмал;
- ферменты α -амилазы и глюкоамилазы
- посевной материал – культуры гриба *Aspergillus niger* R5/4
- вода питьевая по ГОСТ 2874;
- калий фосфорнокислый однозамещенный, ч., по ГОСТ 4198 или аммоний фосфорнокислый двузамещенный, ч., по ГОСТ 3772, или аммофос марки А по ГОСТ 18918;
- цинк сернокислый 7-водный, ч., по ГОСТ 4174;
- аммоний хлористый, ч., по ГОСТ 3773;
- магний сернокислый 7-водный, ч., по ГОСТ 4523;
- аммоний азотнокислый, ч., по ГОСТ 22867;
- известь или мел химически осажденный по ГОСТ 8253;
- кальций хлористый технический марки кальцинированный или гидратированный по ГОСТ 450;
- уголь активный осветляющий древесный порошкообразный марки ОУ-А или ОУ-В по ГОСТ 4453*;

* Допускается при изготовлении лимонной кислоты первого сорта использовать уголь КАД молотый марки А.

- кислота олеиновая техническая (олеин) по ГОСТ 7580;
- кислота соляная синтетическая техническая по ГОСТ 857;
- натр едкий технический по ГОСТ 2263;
- известь хлорная по ГОСТ 1692.

2 Общие особенности технологического процесса

2.1 Процессуальная технологическая схема производства лимонной кислоты

Процессуальная технологическая схема производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала представлена на рисунке 1, аппаратурная технологическая схема показана на рисунке 2.

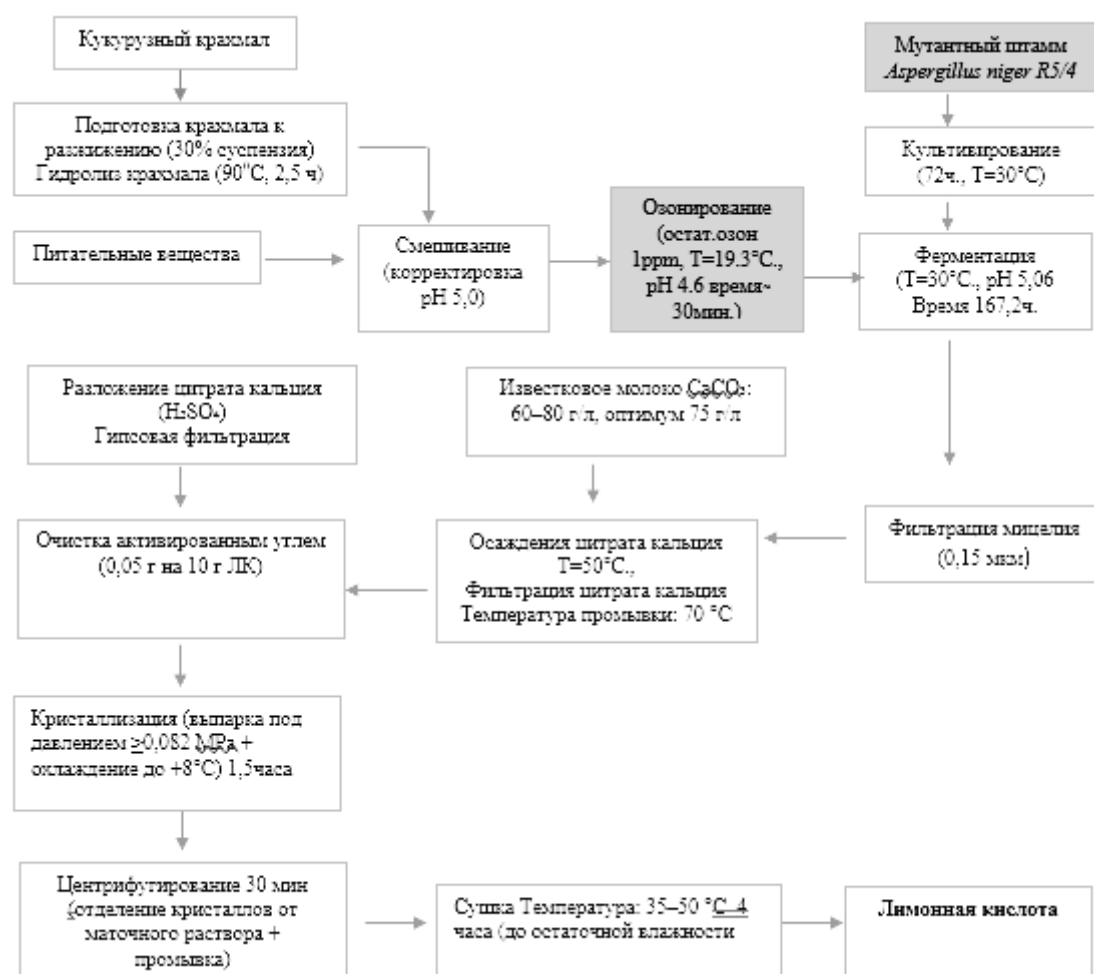


Рисунок 1 - Технологическая схема производства лимонной кислоты

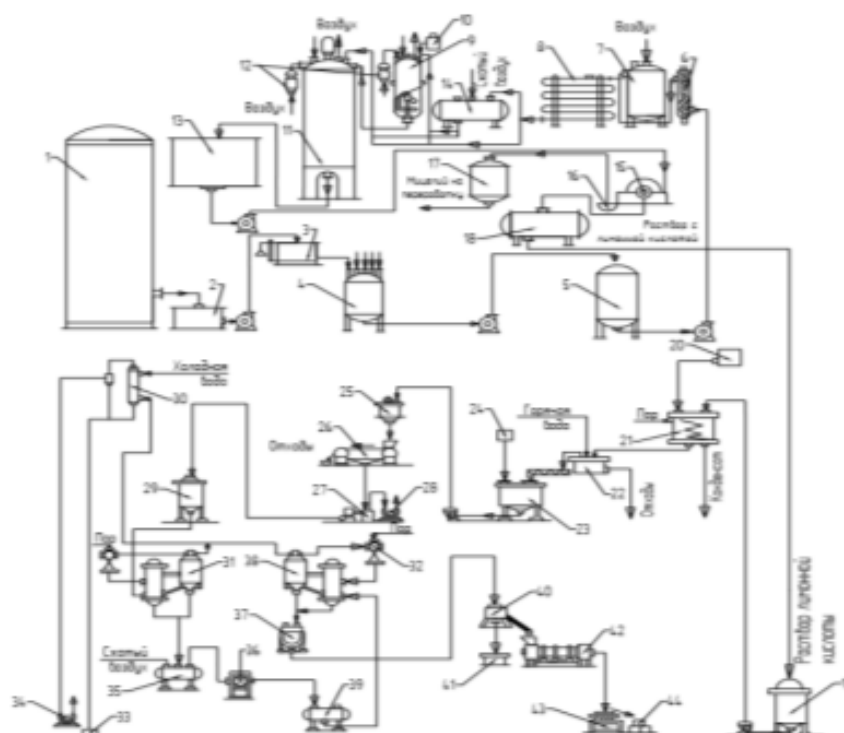


Рисунок 2 - Схема установки для получения лимонной кислоты из кукурузного крахмала

1 – резервуар подготовки крахмальной суспензии, 2 – приемный бак крахмальной суспензии, 3 – весы, 4 – реактор, 5 – промежуточный сборник питательной среды, 6 – стерилизационная колонна, 7 – выдерживатель, 8 – теплообменник, 9 – посевной аппарат, 10 – инокулятор, 11 – производственный ферментер, 12 – противобактериальный фильтр, 13 – сборник сброженного раствора, 14 – монтажу, 15 – вакуум-фильтр, 16 – сборник промытого мицеллия, 17 – вакуум сборник мицеллия, 18 – сборник фильтрата, 19 – сборник раствора лимонной кислоты, 20 – сборник известкового или мелового молока, 21 – нейтрализатор, 22 – нутч-фильтр для отделения осадка, 23 – реактор для отделения лимонной кислоты от осадка, 24 – сборник активного угля, 25 – промежуточный сборник, 26 – ленточный вакуум фильтр, 27 – вакуум сборник, 28, 34 – вакуум насосы, 29 – сборники раствора лимонной кислоты, 30 – барометрический конденсатор выпарной установки первой упарки, 31, 38 – вакуум-выпарные аппараты первичного и вторичного упаривания раствора, 32 – пароструйные компрессоры выпарных аппаратов, 33 – барометрический ящик, 35 – монтажу, 36 – фильтр пресс для дополнительного освобождения раствора от осадка гипса, 37 – кристаллизатор, 39 – промежуточный сборник, 40 – центрифуга, 41 – сборник маточного раствора, 42 – барабанная сушилка, 43 – трясито, 44 – фасовочный автомат.

2.2 Технологический процесс производства лимонной кислоты

Стерилизация оборудования осуществляется озонированной водой в виде спрея. Вводимая доза озона при этом составляет 200 ppm (~400 мг/м³), скорость подачи – 10 грамм

в минуту, остаточный озон в воде - 1 ppm ($\sim 2 \text{ мг/м}^3$). В результате, микробы смываются потоком воды, а затем погибают в озонированной воде.

Технология глубинного культивирования продуцентов лимонной кислоты включает следующие стадии: приготовление питательной среды, получение посевного материала, ферментация, выделение и очистка ЛК. На рисунках 1, 2 представлены технологическая схема и схема установки для получения лимонной кислоты из кукурузного крахмала.

Подготовка кукурузного крахмала

Суспензия крахмала с концентрацией СВ 30% поступает в сборник 1. Далее в крахмальную суспензию добавляется раствор щелочи для доведения pH до 6,0 – 6,5 и раствор хлорида кальция CaCl_2 40-70 ppm для стабилизации фермента. Подготовленная таким образом крахмальная суспензия подается в промежуточный сборник 2, затем на весы 3, далее взвешанная крахмальная суспензия поступает в реактор 4. Раствор термостабильной α -амилазы Termamyl L120 поступает из дозатора и начинается 1 стадия разжижения. Жидкая α -амилаза предварительно разбавляется водой в соотношении 1:3 и дозируется в два приема: 1/3 часть на первую стадию, 2/3 на вторую стадию разжижения. В крахмальную суспензию вдувается пар для подогрева продукта до 130°C для полной желатинизации крахмала. Затем при постоянном перемешивании и падении температуры желатинизированного крахмала до $90\text{--}85^\circ\text{C}$ вводят первую дозу альфа амилазы и проводят гидролиз. Далее продукт вакуумным насосом перекачивается на вторую стадию разжижения в реактор 5. Оставшееся количество α -амилазы Termamyl L120 (2/3) добавляется в продукт дозатором. Продолжительность процесса второй стадии разжижения продукта – 35 минут. Процесс контролируется по йодной пробе. После окончания разжижения крахмала суспензию нейтрализуют, используя для этого раствор соляной кислоты концентрацией $15\pm 1\%$. Нейтрализацию проводят, обеспечивая снижение pH суспензии до 4. Продукт далее фильтруется и чистится с помощью фильтра. Дальнейшая обработка активным углем позволяет удалить остатки красящих веществ и получить чистый продукт. Далее в раствор добавляют хлорид аммония NH_4Cl и сульфат магния MgSO_4 и стерилизуют в стерилизационной колонне 6 при давлении в 1 атм. и температуре 121°C 15 мин.

Питательную среду выдерживают в выдерживателе 7 до стерилизации всего ее объема, далее используя теплообменную установку 8 где ее температуру доводят до $30\text{--}31^\circ\text{C}$, добавляют дигидрофосфат калия KH_2PO_4 и сульфат цинка ZnSO_4 , и с помощью монтежу 14 поднимают жидкость питательной среды в ферментер 12.

Получение посевного материала из грибов Aspergillus niger R5/4

Параллельно с этим процессом идет процесс подготовки микроорганизмов *Aspergillus niger* R5/4. Для этого сухие конидии продуцента смешивают с питательной средой,

инкубируют в термостате при 32 °С, 24 ч. Норма расхода спор для посевного ферментатора - 1 г/м³ раствора. Готовую суспензию конидий добавляют к питательной среде в посевном аппарате 9, объем которого составляет 10 об. % основного ферментатора. Мицелий выращивают при непрерывном перемешивании и аэрации среды при 31–32 °С. Расход воздуха увеличивают в процессе роста мицелия; после 24–30 ч и до окончания культивирования подают 90–100 м³/ч. Продолжительность выращивания мицелия составляет 24–28 ч.

Ферментация

Из посевного ферментера в производственный ферментер 11 со стерильной питательной средой при 30,1 °С и рН 5,0 поступает подросший мицелий. Перед подачей и поступление подросших мицелий в ферментатор воздух проходит обработку **озоном** с последующей фильтрацией через противобактериальные фильтры 12, что обеспечивает глубокую стерилизацию воздушного потока и предотвращает контаминацию на ранних стадиях биосинтеза. В ферментаторе вместимостью 100 м³ в течение первых суток подачу воздуха увеличивают со 100–150 до 2200 м³/ч и поддерживают на таком уровне до окончания ферментации. О завершении процесса судят по изменению величины рН КЖ, которая к концу процесса не должна изменяться в течение 4–8 ч, и после этого культуральную жидкость нагревают в ферментере паром до 60–70°С, а затем перекачивают в сборник сброженного раствора 13.

При выращивании культуры на средах, образующих пену в процессе ферментации для ее гашения в аппараты подается жидкий пеногаситель (олеиновая кислота).

Для получения 0,05%-ной эмульсии пеногасителя, в емкость вносят его концентрат, затем разбавляют его до необходимой концентрации. Эмульсию пеногасителя стерилизуют при температуре 123±2°С в течение 30 мин. во избежание внесения с ним инфекции в среду. После стерилизации пеногаситель охлаждают до температуры 30–32°С, затем подают в ферментер и посевной аппарат.

Отделение мицелия от раствора лимонной кислоты

Из сборника 13 раствор лимонной кислоты с микроорганизмами поступает на фильтр 15 для отделения от него мицелия. Мицелий идет в сборник 16, далее перекачивается в вакуумный сборник 17, отфильтрованный от мицелия раствор лимонной кислоты идет в сборник фильтрата 18, затем в сборник 19. Содержание кислоты в отмытом мицелии не должно превышать 0,2–0,4 масс. %.

Отделение лимонной кислоты из сброженного раствора

Для выделения ЛК растворы после предварительного нагревания до 55–70 °С в нейтрализаторе 21 подвергают при интенсивном перемешивании нейтрализации карбонатом кальция CaCO₃ (поступающего из сборника мелового молока 20) до рН > 6, в результате чего

образуются кальциевые соли кислот. Цитрат и оксалат кальция выпадают в осадок, глюконат кальция остается в растворе.

При осаждении 1 кг ЛК в виде трехкальцевого цитрата необходимо 0,53 кг гидроксида кальция (0,4 кг оксида кальция) или 0,714 кг карбоната кальция (мела).

Образующийся осадок, включающий цитрат и оксалат кальция, отделяют на вакуум-фильтрах 22, который промывают горячей водой (не ниже 90 °С) в объеме 10 м³/т суспензии.

Разложение цитрата кальция и отделение гипсового шлама

Разложение производят путем добавления серной кислоты в реактор 23 в объем 32–33% суспензии отфильтрованного цитрата кальция при температуре не ниже 75 °С; на 100 кг ЛК расходуется от 78 до 80 кг серной кислоты. Вместе с серной кислотой вводится суспензия активированного угля из сборника 24. В итоге получают суспензию лимонной кислоты вкупе с гипсовым шламмом. Полученную суспензию, содержащую лимонную кислоту и гипсовый шлам, промывают водой и выделяют осадок. В итоге получают раствор 15% лимонной кислоты. Затем суспензия отправляется в промежуточный сборник 25, далее в ленточный вакуум-фильтр 26 для отделения гипсового шлама от суспензии. Гипсовый шлам отправляется в отходы, а очищенная суспензия отправляется в вакуум-сборник 27, отфильтрованный раствор лимонной кислоты отправляется в сборник лимонной кислоты 29.

Выпарка раствора лимонной кислоты, кристаллизация и сушка

Раствор отправляется на первую выпарку в выпаривателе 31. После первого упаривания в раствор (60–70 °С) добавляют 1–2 масс. % от массы кислоты древесного угля (ОУ-А или ОУ-В), перемешивают 30 мин и отфильтровывают на фильтр-прессе 36 для дополнительной очистки раствора от гипса, затем раствор идет в сборник 39 и подается на вторую выпарку 38, после на кристаллизатор 37.

Кристаллизацию проводят охлаждением горячего раствора при непрерывном перемешивании. Охлаждение от 70 до 37 °С ведут быстро для предотвращения образования кристаллов безводной кислоты. При 37 °С вводят заправку мелких кристаллов ЛК (0,05 масс. % от массы кристаллизующегося раствора). Скорость охлаждения от 37 до 27 °С - 10 град./ч, от 27 до 22 °С - 5 град./час и до 8 °С - 3 град./ч; при конечной температуре смесь выдерживают 30 мин.

Затем уфель (смесь кристаллов и межкристаллической жидкости) отделяется на центрифуге 40, кристаллы опрыскивают водой температурой не выше 35 °С для удаления пленки маточного раствора на их поверхности и получают кристаллы влажностью 2–3 %.

Из маточного раствора после упаривания до 69 % и кристаллизации получают ЛК первого сорта. Для получения высшего сорта маточные растворы обрабатывают активным углем.

Для получения ЛК первого сорта из второго (третьего) маточного раствора их подвергают обработки активным углем.

Кристаллы ЛК сушат в барабанной сушилке при температуре 35 °С.

2.3 Упаковывание и хранение лимонной кислоты

После сушки кристаллы кислоты охлаждают, просеивают и упаковывают. Лимонную кислоту выпускают в упакованном виде, для реализации через розничную торговлю кислоту фасуют по 10-100 г. в пакеты из полиэтиленовой пленки или этикетировочной бумаги, ламинированной полиэтиленом, или пачки из бумаги с вкладышем.

Лимонную кислоту следует хранить в закрытом помещении на деревянных стеллажах или поддонах. Относительная влажность воздуха в складе должна быть не выше 70 %. Гарантийный срок хранения лимонной кислоты 6 мес. со дня изготовления. Если лимонная кислота упакована в ящики из гофрированного картона с вкладышем из подпергамента, то срок хранения сокращается до 3 мес.

При внутригородских перевозках допускается упаковка кислоты в бумажные непропитанные открытые трехслойные мешки с внутренним мешком-вкладышем из полиэтиленовой пленки массой нетто не более 25 кг; в ящики из гофрированного картона, выстланные подпергаментом марки П-3, полностью покрывающим всю внутреннюю поверхность тары.

Транспортную тару маркируют с нанесением манипуляционного знака «Бойтся сырости».

3 Качество готового продукта

В зависимости от качества лимонная кислота выпускается в виде моногидрата трех сортов: экстра, высшего и I сорта.

По органолептическим показателям к лимонной кислоте предъявляют следующие требования.

Внешний вид - бесцветные кристаллы или белый порошок без комков. Для лимонной кислоты I сорта допускается желтоватый оттенок. Двухпроцентный раствор в дистиллированной воде должен быть прозрачным и не содержать механических примесей.

Вкус кислый, без постороннего привкуса. Двухпроцентный раствор лимонной кислоты в дистиллированной воде не должен иметь запаха.

Структура сыпучая и сухая, на ощупь нелипкая, без посторонних примесей.

По физико-химическим показателям лимонная кислота должна отвечать нормам, указанным в таблице 1.

Таблица - 1

Показатель	Норма для сорта лимонной кислоты		
	экстра	высший	первый
Массовая доля, %: Лимонной кислоты в пересчете на моногидрат:			
Не менее	99,5	99,5	99,5
Не более	101,0	не нормируется	
Золы, не более	0,07	0,10	0,35
Свободной серной кислоты, не более	0,01	0,01	0,03
Мышьяка, не более	0,00007		
Сульфатной золы, не более	0,1	не нормируется	
Цвет*, не более	4	6	10
Проба:			
С сероводородом на свинец, медь, цинк, олово	выдерживает		
С ацетатом кальция на оксалаты	выдерживает		
С серной кислотой на барий	выдерживает		
С хлорным железом на ферроцианиды	выдерживает		
С хлоридом бария на сульфаты	выдерживает	не нормируется	
На легкообугливаемые вещества с серной кислотой	выдерживает	не нормируется	
*Единица показателя цветности раствора йодной шкалы			

4 Контроль технологического процесса

Контроль качества технологического процесса, вспомогательных материалов, готовой продукции осуществляется согласно схеме технологического контроля предприятия, согласованной и утвержденной в установленном порядке.

5 Основные потенциальные поставщики технологий/оборудования лимонной кислоты в зарубежных странах

	Потенциальные поставщики технологий
1	Company: «VOGELBUSCH Biocommodities GmbH» Blechturmstraße 11 1051, г. Вена, Австрия Тел.: +43 1 54 661-0 Факс: +43 1 545 29 79 vienna@vogelbusch.com
2	Anhui Fengyuan Biochemical Co., Ltd. Address: 73 Daqing Rd., Bengbu City, Anhui 233010, China Country/Region: China Tel: +91-(0552)-4926486 Fax: +91-(552)-4926733

3	Company: ADM (Archer Daniels Midland) 77 West Wacker Drive, Suite 4600 Chicago, Illinois 60601 Phone: 312-634-8100
4	Company: JUNGBUNZLAUER SUISSE AG St. Alban-Vorstadt 90 CH-4002 Basel Switzerland Phone +41-61-2955 100 Fax +41-61-2955 108
5	Company: Hoffmann-La Roche Grenzacherstrasse 124 4070 Basel Switzerland +41 61 6881111 +41 61 6919391
6	Changzhou Changjiang Drying Equipment Co., Ltd. ADD: Jiaoxi Industrial Zone, Changzhou City, Jiangsu Province, China Frank Zhu tel:0086 13961120588 E-mail:market@china-yangtze.com We Chat:13961120588 TEL: 0086-519-88901888 88902888 FAX: 0086-519-88902479

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Акт производственных испытаний технологии производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала

АКТ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КУКУРУЗНОГО КРАХМАЛА

Проведены испытания технологии производства лимонной кислоты на ТОО «Жаркентский крахмалопаточный завод», разработанной сотрудниками НАО «КАТУ им. С.Сейфулина», в рамках программы «Научно-технологическое обеспечение перерабатывающих предприятий агропромышленного комплекса с целью повышения их эффективности и конкурентоспособности» (проект «Разработка технологии производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала»), с применением нового высокоэффективного штамма *Aspergillus niger* R5/4, с адаптацией технологических режимов: температуры, времени ферментации, начальной кислотности среды, pH.

Для производства лимонной кислоты использовались следующее сырье и вспомогательные материалы:

№	Наименование сырья и материалов	Ед. изм.	Расход на 1,0 т продукта
1	Кукурузный крахмал	т	1,0
2	Термостабильный фермент α -амилаза Termamyl L120	кг	0,4
3	Культуральная суспензия штамма <i>Aspergillus niger</i> R5/4	л	50
4	Вода питьевая	л	10000
5	Кислота серная	кг	1720
6	Карбонат кальция	кг	154
7	Калий фосфорнокислый однозамещенный	кг	0,16
8	Цинк сернокислый 7-водный	кг	0,005
9	Магний сернокислый 7-водный	кг	0,25
10	Аммоний азотнокислый	кг	2,5
11	Карбонат натрия	кг	20
12	Сульфат железа	кг	0,06
13	Сульфат меди	кг	0,35
14	Этанол	л	50

15	Уголь активный осветляющий древесный порошкообразный марки ОУ-В	кг	40
16	Лимонная кислота	кг	0,5
17	Кислота олеиновая	кг	10
18	Кислота соляная	кг	15
19	Натр едкий	кг	10

Этапы получения лимонной кислоты штаммом *Aspergillus niger* R5/4 из кукурузного крахмала включали:

- 1) Приготовление суспензии крахмала с концентрацией СВ 30%, натр едкий CaCl_2 , рН 6-6,5;
- 2) Клейстеризация крахмала при постепенном повышении температуры суспензии от 55°C до 85°C .
- 3) Одностадийное ферментативное разжижение клейстеризованного крахмала - α -амилаза, Т $85-90^\circ\text{C}$, рН 5,0-6,2 до ДЭ 18-20, инаktivация фермента снижением температуры и рН 3,0, очистка кизильгуром и ионообменными смолами;
- 4) Подготовка питательной среды: сиропы с ДЭ 18-20 (СВ 25%) в пересчете на СВ 140 г/л среды, NH_4NO_3 - 3 г/л, KH_2PO_4 - 2 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 г/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1 мг/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 12 мг/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 70 мг/л.
- 5) Получение посевного материала в опытных реакторах - Т $30-31^\circ\text{C}$, 24-30 ч, 1 г/м³;
- 6) Ферментация - Т $30-33^\circ\text{C}$, аэрация - 20 кг/м³ч, рН 4,5-5,5, 6-8 суток, 3% этанол, олеин;
- 7) Отделение мицеллия - H_2O Т 100°C , содержание кислоты не более 0,2 %;
- 8) Отделение лимонной кислоты из сброженного раствора - Т $55-70^\circ\text{C}$, CaCO_3 , рН > 6, промывка H_2O Т 100°C ;
- 9) Разложение цитрата кальция - H_2SO_4 , активный уголь, $75-90^\circ\text{C}$;
- 10) Выпаривание раствора лимонной кислоты - Т $60-70^\circ\text{C}$, плотность 1,37-1,38 г/мл, давление 80кПа, концентрация ЛК 69-71%;
- 11) Кристаллизация - при 37°C , заправка 0,05% ЛК, охлаждение до 8°C , 30 мин;
- 12) Отделение кристаллов кислоты - H_2O Т $32-34^\circ\text{C}$, влажность кристаллов 2-3%;
- 13) Сушка воздухом - Т 35°C ;
- 14) Упаковывание и хранение - срок хранения 6 мес.

В результате испытаний с применением нового штамма - продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger* R5/4 получено 749,7кг лимонной кислоты из кукурузного крахмала.



ОО «Жарынтский крахмалопаточный завод»

Ев. Генеральный директор

НАО «КАТУ» и.м. С.Сейфулина»

Руководитель программы

МНС, докторант

МНС

МНС

Халиков В.Р.

Оспанкулова Г.Х.

Шайменова Б.С.

Тойымбаева Д.Б.

Мурат Л.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Рекомендации по получению лимонной кислоты из кукурузного крахмала



**ТОО «ЖАРКЕНТСКИЙ
КРАХМАЛОПАТОЧНЫЙ ЗАВОД»**



**НАО «КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМ.
С. СЕЙФУЛЛИНА»**



Генеральный директор ТОО «Жаркентский
крахмалопаточный завод»

В.Р.Халиков
2020г.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Председателя правления
по науке, инновационной деятельности
и международным связям НАО «КазАТУ им.
С. Сейфуллина»

Токбергенов
«02» 10/2020г.



**Рекомендации
по получению лимонной кислоты из кукурузного
крахмала**

НУР-СУЛТАН, 2020

40

Настоящие методические рекомендации разработаны в рамках выполнения проекта «Разработка технологии производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала», научно-технической программы МСХ РК (ИРН BR06249419) «Научно-технологическое обеспечение перерабатывающих предприятий агропромышленного комплекса с целью повышения их эффективности и конкурентоспособности»

Настоящие рекомендации распространяются на пищевую добавку лимонную кислоту, получаемую из мальтодекстринов кукурузного крахмала в результате микробиологического синтеза с использованием штамма микромицета *A.niger R5/4* и предназначенную для использования в пищевой промышленности.

Рекомендации устанавливают последовательность проведения технологических процессов и параметров производства лимонной кислоты, а также санитарно-гигиенические требования к производству.

Авторы: Оспанкулова Г.Х., Алимгазинова Б.Ш., Садуахасова С.А., Шайменова Б.С., Тоймбаева Д.Б., Ермаков Е.Е., Мурат Л.А.

1 Характеристика сырья и материалов

Суспензия крахмала поступает в пачочный цех, концентрация суспензии крахмала должна быть 30% сухих веществ (СВ), температура 26 –30 °С. При более низком содержании сухих веществ в суспензии необходимо внести в нее дополнительно сухой крахмал. Получают раствор мальтодекстринов из кукурузного крахмала с ДЭ 18-20, устанавливают уровень сахаров 140г/л.

В качестве производственного штамма используется микромицет *A.niger R5/4*, обладающий высокой кислотообразующей активностью. В лабораторных условиях культуру получают размножением конидий на среде следующего состава, г/л: сахароза - 30,0; дигидроортофосфат калия - 0,16; нитрат аммония - 2,5; сульфат магния гептагидрат - 0,25. Суспензию конидий гриба в колбе ставят на качалку с числом оборотов 160 мин⁻¹ и выдерживают 5-6 часов при температуре 30°С. Для выращивания посевного мицелия в колбу емкостью 750 мл помещают 50 мл питательной среды (200 мл раствора мальтодекстрина из кукурузного крахмала с ДЭ 18-20; 0,50 мл 10% раствора сульфата магния гептагидрата; 5 мл 10% раствора нитрата аммония и 0,30 мл 10% раствора гидрофосфата калия) и заливают 1% суспензией конидий. Колбу ставят на качалку с числом оборотов 160 мин⁻¹ и выдерживают в течение 36 часов при температуре 30°С.

При производстве лимонной кислоты используется следующее сырье и материалы:

- кукурузный крахмал;
- мальтодекстрин с ДЭ 18-20;
- фермент α -амилаза
- посевной материал – культуры гриба *Aspergillusniger R5/4*
- вода питьевая по ГОСТ 2874;
- калий фосфорнокислый двузамещенный, ч., по ГОСТ 3772;
- цинк сернокислый 7-водный, ч., по ГОСТ 4174;
- аммоний хлористый, ч., по ГОСТ 3773;
- магний сернокислый 7-водный, ч., по ГОСТ 4523;
- нитрат аммония, ч., по ГОСТ 2-2013;
- сульфат железа (II) 7-водный, ч., по ГОСТ 6981-94;
- сульфат меди 5-водный, ч., по ГОСТ 4165-78;
- этиловый спирт, ч., по ГОСТ 17299-78;
- известь или мел химически осажденный по ГОСТ 8253;
- кальций хлористый технический марки кальцинированный или гидратированный по ГОСТ 450;
- уголь активный, осветляющий древесный порошкообразный марки ОУ-А или ОУ-В по ГОСТ 4453*;

* Допускается при изготовлении лимонной кислоты первого сорта использовать уголь КАД молотый марки А.

- кислота олеиновая техническая (олеин) по ГОСТ 7580;
- кислота соляная синтетическая техническая по ГОСТ 857;
- натр едкий технический по ГОСТ 2263;
- известь хлорная по ГОСТ 1692.

2 Общие требования к качеству готового продукта

По органолептическим показателям лимонная кислота должна соответствовать требованиям, указанным в таблице А.1.

Таблица А.1 - Органолептические показатели лимонной кислоты

Наименование показателей	Характеристика
Внешний вид	Бесцветные кристаллы или белый порошок без комков
Вкус	Кислый, без постороннего привкуса
Запах	Без запаха
Структура	Сыпучая и сухая, на ощупь не липкая
Механические примеси	Не допускаются

По физико-химическим показателям лимонная кислота должна соответствовать требованиям, указанным в таблице А.2.

По показателям требования безопасности, лимонная кислота не горюча, не взрывоопасна, не токсична.

Таблица А.2 - Физико-химические показатели лимонной кислоты

Наименования показателя	Норма
1	2
Идентификация лимонной кислоты	Выдерживает испытание
Массовая доля воды, %	7,5
Не менее	8,8
Не более	
Массовая доля сульфатной золы, % не более	0,05
Массовая доля сульфатов, % не более	0,015
Массовая доля оксалатов, % не более	0,01
Тест на ферроцианиды	Выдерживает испытание
Тест на легкообугливаемые вещества	Выдерживает испытание
Тест на железо	Выдерживает испытание

Содержание токсичных элементов в пищевой лимонной кислоте не должно превышать допустимые уровни, указанным в таблице А.3.

Таблица А.3 – Нормы содержания токсичных элементов в пищевой лимонной кислоте

Наименование токсичного элемента	Содержание токсичного элемента, мг/кг, не более	Метод испытания
Свинец	1,0	По ГОСТ 26932
Мышьяк	0,7	По ГОСТ 26930
Кадмий	0,5	По ГОСТ 26933
Ртуть	0,5	По ГОСТ 26927

3 Описание технологического процесса

Схема установки для получения лимонной кислоты из кукурузного крахмала представлена на рисунке А.1.

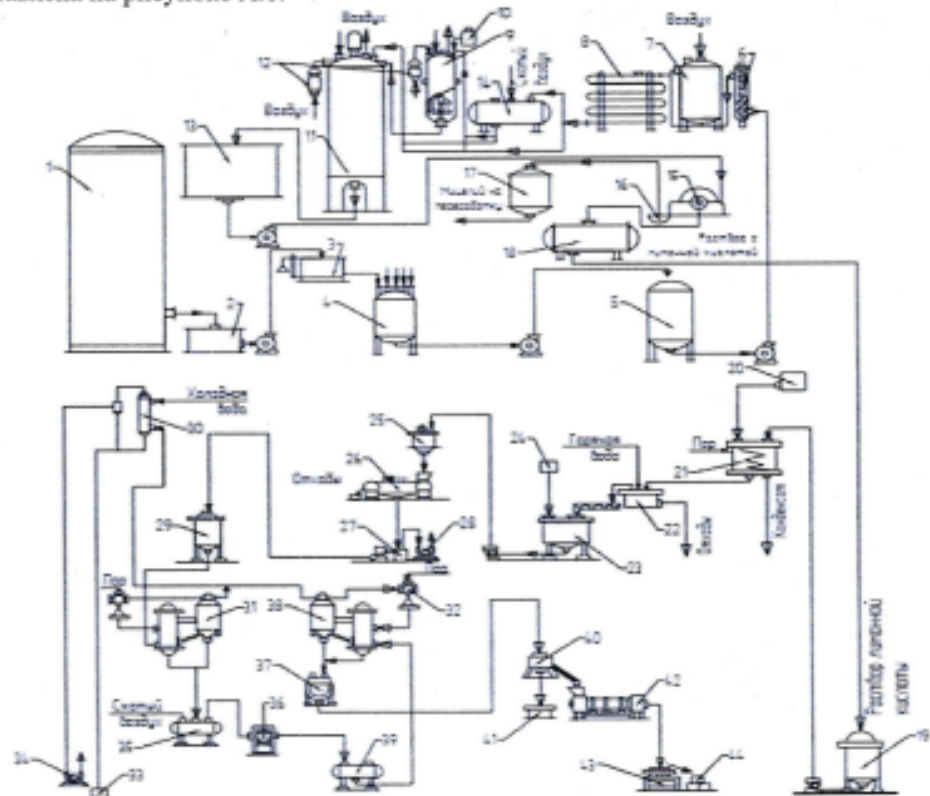


Рисунок А.1 - Схема установки для получения лимонной кислоты из кукурузного крахмала

1 – резервуар подготовки крахмальной суспензии, 2 – приемный бак крахмальной суспензии, 3 – весы, 4 – реактор, 5 – промежуточный сборник питательной среды, 6 – стерилизационная колонна, 7 – выдерживатель, 8 – теплообменник, 9 – посевной аппарат, 10 – инокулятор, 11 – производственный ферментатор, 12 – противобактериальный фильтр, 13 – сборник сброженного раствора, 14 – монтажно, 15 – вакуум-фильтр, 16 – сборник промытого мицеллия, 17 – вакуум сборник мицеллия, 18 – сборник фильтрата, 19 – сборник раствора лимонной кислоты, 20 – сборник известкового или мелового молока, 21 – нейтрализатор, 22 – нутч-фильтр для отделения осадка, 23 – реактор для отделения лимонной кислоты от осадка, 24 – сборник активного угля, 25 – промежуточный сборник, 26 – ленточный вакуум фильтр, 27 – вакуум сборник, 28, 34 – вакуум насосы, 29 – сборники раствора лимонной кислоты, 30 – барометрический конденсатор выпарной установки первой упарки, 31, 38 – вакуум-выпарные аппараты первичного и вторичного упаривания раствора, 32 – пароструйные компрессоры выпарных аппаратов, 33 – барометрический ящик, 35 – монтажно, 36 – фильтр пресс для дополнительного освобождения раствора от осадка гипса, 37 – кристаллизатор, 39 – промежуточный сборник, 40 – центрифуга, 41 – сборник маточного раствора, 42 – барабанная сушилка, 43 – трясито, 44 – фасовочный автомат.

4 Рекомендуемая схема, оборудование, параметры для производства лимонной кислоты

Описание процесса производства лимонной кислоты представлены на рисунке А.2.

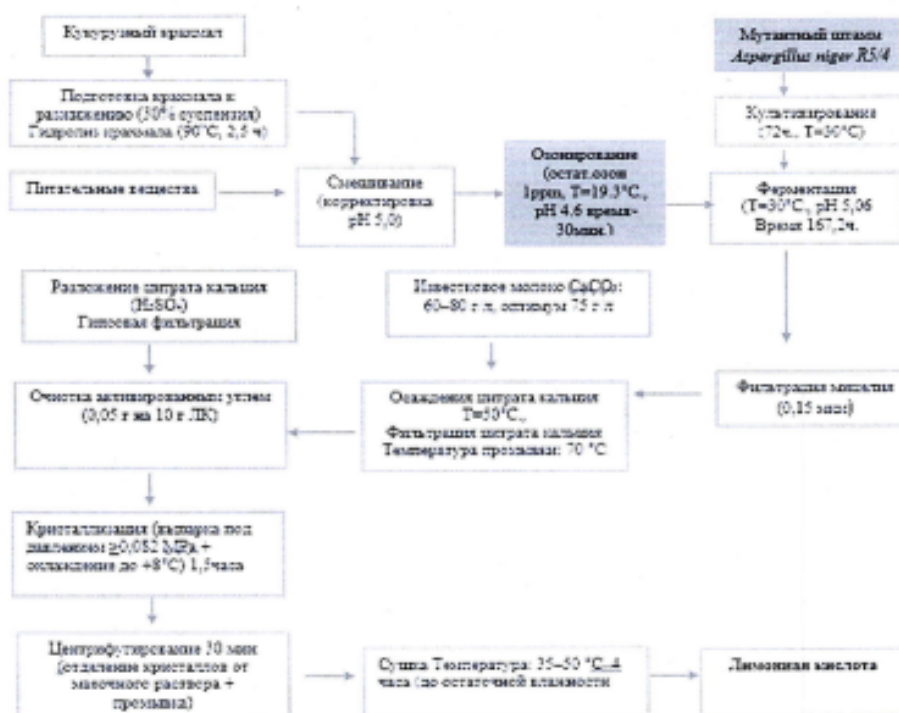


Рисунок А.2 – Технологическая схема производства лимонной кислоты из кукурузного крахмала

4.1 Технологический процесс производства лимонной кислоты

Стерилизация оборудования осуществляется озонированной водой в виде спрея. Вводимая доза озона при этом составляет 200 ppm (~400 мг/м³), скорость подачи – 10 грамм в минуту, остаточный озон в воде - 1 ppm (~2 мг/м³). В результате, микробы смываются потоком воды, а затем погибают в озонированной воде.

Технология глубинного культивирования продуцентов лимонной кислоты включает следующие стадии: приготовление питательной среды, получение посевного материала, ферментация, выделение и очистка ЛК. На рисунках А.1, А.2 представлены схема установки и технологическая схема для получения лимонной кислоты из кукурузного крахмала.

Подготовка кукурузного крахмала

Суспензия крахмала с концентрацией СВ 30% поступает в сборник 1. Далее в крахмальную суспензию добавляется раствор щелочи для доведения pH до 6,0 – 6,5 и раствор хлорида кальция CaCl₂ 40-70 ppm для стабилизации фермента. Подготовленная таким образом крахмальная суспензия подается в промежуточный сборник 2, затем на весы 3, далее взвешенная крахмальная суспензия поступает в реактор 4. Раствор термостабильной α-амилазы Termamyl L120 поступает из дозатора и начинается 1 стадия разжижения. Жидкая α-амилаза предварительно разбавляется водой в соотношении 1:3 и дозируется в два приема: 1/3 часть на первую стадию, 2/3 на вторую стадию разжижения. В крахмальную суспензию вдувается пар для подогрева продукта до 130°C для полной

желатинизации крахмала. Затем при постоянном перемешивании и падении температуры желатинизированного крахмала до 90–85°C вводят первую дозу альфа амилазы и проводят гидролиз. Далее продукт вакуумным насосом перекачивается на вторую стадию разжижения в реактор 5. Оставшееся количество α -амилазы Termamyl L120 (2/3) добавляется в продукт дозатором. Продолжительность процесса второй стадии разжижения продукта – 35 минут. Процесс контролируется по йодной пробе. После окончания разжижения крахмала суспензию нейтрализуют, используя для этого раствор соляной кислоты концентрацией 15±1%. Нейтрализацию проводят, обеспечивая снижение pH суспензии до 4. Продукт далее фильтруется и чистится с помощью фильтра. Дальнейшая обработка активным углем позволяет удалить остатки красящих веществ и получить чистый продукт, раствор мальтодекстринов с ДЭ 18-20, устанавливают уровень сахаров – 140 г/л. Далее в раствор добавляют нитрат аммония NH_4NO_3 и сульфат магния MgSO_4 стерилизуют в стерилизационной колонне 6 при давлении в 1 атм. и температуре 121°C 15 мин.

Питательную среду выдерживают в выдерживателе 7 до стерилизации всего ее объема, далее используя теплообменную установку 8 где ее температуру доводят до 30–31°C, добавляют дигидрофосфат калия KH_2PO_4 , сульфат железа FeSO_4 , сульфат меди CuSO_4 , сульфат цинка ZnSO_4 , этанол и с помощью монтежю 14 поднимают жидкость питательной среды в ферментатор 12.

Получение посевного материала из грибов A.niger R5/4

Параллельно с этим процессом идет процесс подготовки микроорганизмов *A.niger* R5/4. Для этого сухие конидии продуцента смешивают с питательной средой, инкубируют в термостате при 32°C, 24 ч. Норма расхода спор для посевного ферментатора – 1 г/м³ раствора. Готовую суспензию конидий добавляют к питательной среде в посевном аппарате 9, объем которого составляет 10 об. % основного ферментатора. Мицелий выращивают при непрерывном перемешивании и аэрации среды при 31–32 °C. Расход воздуха увеличивают в процессе роста мицелия; после 24–30 ч и до окончания культивирования подают 90–100 м³/ч. Продолжительность выращивания мицелия составляет 24–28 ч.

Ферментация

Из посевного ферментера в производственный ферментер 11 со стерильной питательной средой при 30,1 °C и pH 5,0 поступает подросший мицелий. Перед подачей и поступлением подросших мицелий в ферментатор воздух проходит обработку **озоном** с последующей фильтрацией через противобактериальные фильтры 12, что обеспечивает глубокую стерилизацию воздушного потока и предотвращает контаминацию на ранних стадиях биосинтеза. В ферментаторе вместимостью 100 м³ в течение первых суток подачу воздуха увеличивают со 100–150 до 2200 м³/ч и поддерживают на таком уровне до окончания ферментации. О завершении процесса судят по изменению величины pH КЖ, которая к концу процесса не должна изменяться в течение 4–8 ч, и после этого культуральную жидкость нагревают в ферментере паром до 60–70°C, а затем перекачивают в сборник сброженного раствора 13.

При выращивании культуры на средах, образующих пену в процессе ферментации для ее гашения в аппараты подается жидкий пеногаситель (олеиновая кислота).

Для получения 0,05%-ной эмульсии пеногасителя, в емкость вносят его концентрат, затем разбавляют его до необходимой концентрации. Эмульсию пеногасителя стерилизуют при температуре 123±2°C в течение 30 мин. во избежание внесения с ним инфекции в среду. После стерилизации пеногаситель охлаждают до температуры 30–32°C, затем подают в ферментер и посевной аппарат.

Отделение мицеллия от раствора лимонной кислоты

Из сборника 13 раствор лимонной кислоты с микроорганизмами поступает на фильтр 15 для отделения от него мицеллия. Мицелий идет в сборник 16, далее перекачивается в вакуумный сборник 17, отфильтрованный от мицеллия раствор лимонной

кислоты идет в сборник фильтрата 18, затем в сборник 19. Содержание кислоты в отмытом мицеллии не должно превышать 0,2–0,4 масс. %.

Отделение лимонной кислоты из сброженного раствора

Для выделения ЛК растворы после предварительного нагревания до 55–70 °С в нейтрализаторе 21 подвергают при интенсивном перемешивании нейтрализации карбонатом кальция CaCO_3 (поступающего из сборника мелового молока 20) до $\text{pH} > 6$, в результате чего образуются кальциевые соли кислот. Цитрат и оксалат кальция выпадают в осадок, глюконат кальция остается в растворе.

При осаждении 1 кг ЛК в виде трехкальциевого цитрата необходимо 0,53 кг гидроксида кальция (0,4 кг оксида кальция) или 0,714 кг карбоната кальция (мела).

Образующийся осадок, включающий цитрат и оксалат кальция, отделяют на вакуум-фильтрах 22, который промывают горячей водой (не ниже 90 °С) в объеме 10 м³/т суспензии.

Разложение цитрата кальция и отделение гипсового шлама

Разложение производят путем добавления серной кислоты в реактор 23 в объем 32–33% суспензии отфильтрованного цитрата кальция при температуре не ниже 75 °С; на 100 кг ЛК расходуется от 78 до 80 кг серной кислоты. Вместе с серной кислотой вводится суспензия активированного угля из сборника 24. В итоге получают суспензию лимонной кислоты вкупе с гипсовым шламом. Полученную суспензию, содержащую лимонную кислоту и гипсовый шлам, промывают водой и выделяют осадок. В итоге получают раствор 15% лимонной кислоты. Затем суспензия отправляется в промежуточный сборник 25, далее в ленточный вакуум-фильтр 26 для отделения гипсового шлама от суспензии. Гипсовый шлам отправляется в отходы, а очищенная суспензия отправляется в вакуум-сборник 27, отфильтрованный раствор лимонной кислоты отправляется в сборник лимонной кислоты 29.

Выпарка раствора лимонной кислоты, кристаллизация и сушка

Раствор отправляется на первую выпарку в выпаривателе 31. После первого упаривания в раствор (60–70 °С) добавляют 1–2 масс.% от массы кислоты древесного угля (ОУ-А или ОУ-В), перемешивают 30 мин и отфильтровывают на фильтр-прессе 36 для дополнительной очистки раствора от гипса, затем раствор идет в сборник 39 и подается на вторую выпарку 38, после на кристаллизатор 37.

Кристаллизацию проводят охлаждением горячего раствора при непрерывном перемешивании. Охлаждение от 70 до 37 °С ведут быстро для предотвращения образования кристаллов безводной кислоты. При 37 °С вводят заправку мелких кристаллов ЛК (0,05 масс. % от массы кристаллизующегося раствора). Скорость охлаждения от 37 до 27 °С - 10 град./ч, от 27 до 22 °С - 5 град./час и до 8 °С - 3 град./ч; при конечной температуре смесь выдерживают 30 мин.

Затем утфель (смесь кристаллов и межкристаллической жидкости) отделяются на центрифуге 40, кристаллы опрыскивают водой температурой не выше 35 °С для удаления пленки маточного раствора на их поверхности и получают кристаллы влажностью 2–3 %.

Из маточного раствора после упаривания до 69 % и кристаллизации получают ЛК первого сорта. Для получения высшего сорта маточные растворы обрабатывают активным углем.

Для получения ЛК первого сорта из второго (третьего) маточного раствора их подвергают обработке активным углем.

Кристаллы ЛК сушат в барабанной сушилке 42 при температуре 35 °С.

4.2 Упаковывание и хранение лимонной кислоты

После сушки кристаллы кислоты охлаждают, просеивают и упаковывают. Лимонную кислоту выпускают в упакованном виде, для реализации через розничную торговлю кислоту фасуют по 10–100 г. в пакеты из полиэтиленовой пленки или этикетировочной бумаги, ламинированной полиэтиленом, или пачки из бумаги с вкладышем.

Лимонную кислоту следует хранить в закрытом помещении на деревянных стеллажах или поддонах. Относительная влажность воздуха в складе должна быть не выше 70 %. Гарантийный срок хранения лимонной кислоты 6 мес. со дня изготовления. Если лимонная кислота упакована в ящики из гофрированного картона с вкладышем из подпергамента, то срок хранения сокращается до 3 мес.

При внутригородских перевозках допускается упаковка кислоты в бумажные непропитанные открытые трехслойные мешки с внутренним мешком-вкладышем из полиэтиленовой пленки массой нетто не более 25 кг; в ящики из гофрированного картона, выстланные под пергаментом марки П-3, полностью покрывающим всю внутреннюю поверхность тары.

Транспортную тару маркируют с нанесением манипуляционного знака «Бойтесь сырости».

Качество готового продукта

В зависимости от качества лимонная кислота выпускается в виде моногидрата трех сортов: экстра, высшего и I сорта.

По органолептическим показателям к лимонной кислоте предъявляют следующие требования.

Внешний вид - бесцветные кристаллы или белый порошок без комков. Для лимонной кислоты I сорта допускается желтоватый оттенок. Двухпроцентный раствор в дистиллированной воде должен быть прозрачным и не содержать механических примесей.

Вкус кислый, без постороннего привкуса. Двухпроцентный раствор лимонной кислоты в дистиллированной воде не должен иметь запаха.

Структура сыпучая и сухая, на ощупь нелипкая, без посторонних примесей.

По физико-химическим показателям лимонная кислота должна отвечать нормам, указанным в таблице А.4.

Таблица А.4 – Физико-химические показатели лимонной кислоты

Показатель	Норма для сорта лимонной кислоты		
	экстра	высший	первый
Массовая доля, %:			
Лимонной кислоты в пересчете на моногидрат:			
Не менее	99,5	99,5	99,5
Не более	101,0	не нормируется	
Золы, не более	0,07	0,10	0,35
Свободной серной кислоты, не более	0,01	0,01	0,03
Мышьяка, не более	0,00007		
Сульфатной золы, не более	0,1	не нормируется	
Цвет*, не более	4	6	10
Проба:			
С сероводородом на свинец, медь, цинк, олово	выдерживает		
С ацетатом кальция на оксалаты	выдерживает		
С серной кислотой на барий	выдерживает		
С хлорным железом на ферроцианиды	выдерживает		
С хлоридом бария на сульфаты	выдерживает	не нормируется	
На легкообугливаемые вещества с серной кислотой	выдерживает	не нормируется	
*Единица показателя цветности раствора йодной шкалы			

Контроль качества технологического процесса, вспомогательных материалов, готовой продукции осуществляется согласно схеме технологического контроля предприятия, согласованной и утвержденной в установленном порядке.

5 Требования к технологическому оборудованию

- Для аппаратурного оформления применяется оборудование, выпускаемое отечественными и зарубежными предприятиями, а также нестандартное оборудование, изготавливаемое по отдельному заказу.

- Установку и обслуживание технологического оборудования производят в соответствии с инструкциями заводов-изготовителей и инструкцией по обслуживанию, утверждённой главным инженером предприятия.

- Установка технологического оборудования должна быть выполнена в соответствии с существующими нормами для промышленных предприятий и «Правилами по технике безопасности и производственной санитарии для крахмалопаточной промышленности», М, 1976 г.

- В жидкой фазе всех продуктов производства лимонной кислоты содержатся химические вещества, что определяет агрессивность среды. В связи с этим при подборе сборников, насосов и трубопроводов необходимо использовать оборудование, трубы и арматуру, изготовленные из коррозионно-стойкого материала, например, из нержавеющей стали 12Х18Н10Т.

- Уклоны трубопроводов для концентрированных суспензий должны быть 30 мм на пог.м. Не допускается образование в трубопроводе застойных зон. После прокачки концентрированных суспензий трубопровод следует промыть водой. Металлические механизмы устанавливают в нестандартных сборниках для суспензий. При необходимости можно устанавливать переносные мешалки по ТУ 26-01-631-82.

5.1. Общие положения

5.1.1 Настоящие нормы распространяются на проектирование предприятий по производству пищевой лимонной кислоты глубинным методом сбраживания питательных растворов грибом *A.niger*.

5.1.2 Нормы обязательны для всех организаций, разрабатывающих проекты на строительство новых, реконструкцию, расширение или техническое перевооружение действующих предприятий по производству пищевой лимонной кислоты, а также для организаций, осуществляющих строительство этих предприятий, проверяющих и утверждающих проектно-сметную документацию.

5.1.3 В случае невозможности соблюдения отдельных положений норм при разработке проекта реконструкции, расширения и технического перевооружения предприятий пищевой лимонной кислоты допускаются обоснованные отступления от действующих норм, подлежащие согласованию в части этих отступлений с органами государственного надзора и организациями, утвердившими этот нормативный документ.

5.1.4 Проектирование предприятий по производству пищевой лимонной кислоты должно производиться с обязательным соблюдением действующих общесоюзных норм и правил, относящихся к проектированию и строительству промышленных предприятий, правил по технике безопасности, пожарной безопасности и производственной санитарии, а также соответствующих ГОСТов системы стандартов безопасности труда.

5.1.5 Вновь строящиеся предприятия по производству пищевой лимонной кислоты следует проектировать, как правило, в составе со свеклосахарными комбинатами (заводами) с общими объектами инженерного обеспечения и подсобно-вспомогательными производствами.

5.1.6 Состав предприятий по производству пищевой лимонной кислоты следует принимать согласно обязательному приложению 1. Перечень зданий, сооружений должен уточняться в зависимости от конкретных условий.

5.2 Мощность предприятия

5.2.1 Под мощностью предприятия по производству лимонной кислоты понимается максимально возможный годовой выпуск кристаллической кислоты в тоннах, соответствующей ГОСТам, при полном использовании производственного оборудования и

производственных площадей с учетом осуществленных и намечаемых мероприятий по внедрению передовой технологии производства и научной организации труда.

5.2.2 Мощность предприятия устанавливается заданием на проектирование и должна быть обоснована технико-экономическими расчетами.

5.2.3 Мощность предприятия определяется производительностью ведущего производственного участка - ферментационным отделением.

5.2.4 Мощность предприятия следует рассчитывать в соответствии с Инструкцией по определению производственных мощностей действующих предприятий пищевых кислот, по формуле.

$$M = \frac{C \cdot V \cdot K}{1000} \cdot 330 = 0,33 \cdot C \cdot V \cdot K, \quad (A.1)$$

где:

M - годовая мощность предприятия, тонн кристаллической кислоты (моногидрата);

C - суточный съем с/м³ геометрического объема, кг лимонной кислоты в сброженных растворах C = 8,5;

V - геометрический объем всех ферментаторов м³;

K - коэффициент выхода кислоты при химической переработке сброженных растворов K = 0,93;

330 - фонд рабочего времени ферментаторов в году, сутки;

1000 - переводной коэффициент из кг в тонны.

0,33 - Мощность, как правило, следует принимать:

а) для реконструируемых, расширяемых и технически перевооружаемых предприятий, функционирующих на базе сахарных заводов, - 1,5; 3,0; 5,0 тыс. тонн в год;

б) для вновь строящихся самостоятельных предприятий - 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 тыс. тонн в год.

Режим работы предприятия следует принимать следующий:

число дней работы в году - 330

число смен в сутки - 3.

6 Требования по технике безопасности, промышленной санитарии и взрыво - пожаробезопасности

6.1 Предприятия по санитарной классификации следует относить к V классу с санитарной защитной зоной 50 м.

6.2 При проектировании предприятий, строительстве, реконструкции, расширении и Техническом перевооружении необходимо выполнять требования по технике безопасности, пожарной безопасности и промышленной санитарии, изложенные в следующих нормативных документах:

- ТР ТС 010/2011 «О безопасности машин и оборудования» (утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 18 октября 2011 года № 823) (с изменениями и дополнениями от 16.05.2016 г.);

- Санитарно-эпидемиологические требования к объектам по производству пищевой продукции» утвержденные Министерством национальной экономики РК от 28 февраля 2015г.;

- Санитарные правила и нормы по гигиене труда в промышленности часть 2 Санитарные правила для химической, нефтехимической, микробиологической промышленности и биотехнологии;

- Правила пожарной безопасности для промышленных предприятий ГОСТ 12.1.004-91;

- Санитарные правила для предприятий по производству пищевых кислот;

- Санитарные правила проектирования, оборудования и содержания складов для хранения сильнодействующих ядовитых веществ (СДЯВ);
 - Технологическая инструкция по обеспечению микробиологической чистоты процесса ферментации;
 - Правила устройства и безопасной эксплуатации грузоподъемных кранов, утвержденные приказом министра по инвестициям и развитию Республики Казахстан от 30 декабря 2014 года № 359;
 - Правила техники безопасности для предприятий автомобильного транспорта, указанным в трудовом кодексе РК;
 - Правила технической эксплуатации железных дорог, утвержденные приказом министра по инвестициям и развитию Республики Казахстан от 30 апреля 2015 года № 544;
 - Правила безопасности во взрывоопасных и взрывопожароопасных химических и нефтехимических производствах, в соответствии с Правилами обеспечения промышленной безопасности для опасных производственных объектов в нефтехимической, нефтеперерабатывающей отраслях, нефтебаз и автозаправочных станций утвержденные приказом министра по инвестициям и развитию Республики Казахстан от 30 декабря 2014 года № 342;
 - Правила техники безопасности при эксплуатации систем водоснабжения и водоотведения населенных мест, утвержденные Приказом Министра национальной экономики Республики Казахстан от 28 февраля 2015 года № 158;
 - «Требования промышленной безопасности при использовании сжиженных углеводородных газов», «Требования промышленной безопасности систем распределения и потребления природных газов», «Требования промышленной безопасности при переработке газов» (утверждены приказом МЧС РК от 18.09.2008 года № 172);
 - «Требования устройства и безопасной эксплуатации стационарных компрессорных установок, воздухопроводов и газопроводов», «Требования промышленной безопасности при эксплуатации автомобильных заправочных станций сжиженного газа» (утверждены приказом МЧС РК от 26.02.2009 года № 36);+
 - «Требования промышленной безопасности в газовом хозяйстве предприятий черной металлургии» (утверждены приказом МЧС РК от 16.07.2009 года № 167). Правила взрывобезопасности установок для приготовления и сжигания топлива в пылевидном состоянии, утвержденные приказом министра энергетики Республики Казахстан от 27 января 2015 года № 39.
 - Правила устройства и безопасной эксплуатации паровых и водогрейных котлов, утвержденные Утверждены приказом Министерств транспорта и коммуникаций Республики Казахстан от 18 июня 1997 г. N 489 6.3;
 - При проектировании предприятий следует предусматривать мероприятия, не допускающие превышения норм уровня шума, вибрации.
- 6.3 Шумовые характеристики оборудования следует принимать по паспортным данным заводов-изготовителей.
- 6.4 Допустимые уровни шума на рабочих местах необходимо принимать в соответствии с ГОСТ 12.1.003-83.
- Защиту от шума для обеспечения допустимых уровней следует выполнять в соответствии с главами МСН 2.04-03-2005 по проектированию защиты от шума.
- 6.5 Проектируемые предприятия должны отвечать требованиям раздела «Вибрации» ГОСТ 12.1.012-2004. Утвержденный межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол N 15 от 4 февраля 2004 г.).
- 6.6 Установку холодильных машин следует выполнять в соответствии с Правилами по технике безопасности на фреоновых холодильных установках и Правилами устройства и безопасной эксплуатации аммиачных холодильных установок и дополнения к ним
- 6.7 Электродвигатели всех напряжений должны проектироваться в соответствии с Правилами устройства электроустановок, утвержденными приказом Министра энергетики

Республики Казахстан от 20 марта 2015 года № 230 зарегистрированном в Министерстве юстиции Республики Казахстан 29 апреля 2015 года № 10851.

6.8 Освещенность рабочих мест необходимо выполнять в соответствии с требованиями глав СНиП по проектированию естественного и искусственного освещения.

6.9 Здания и сооружения или их части в зависимости от назначения, интенсивности грозовой деятельности в районе строительства должны быть защищены в соответствии с категориями устройства молниезащиты и типом зоны защиты, приведенными в СП РК 2.04-103-2013 Устройство молниезащиты зданий и сооружений, утвержденной приказом комитета по делам строительства, жилищно – коммунального хозяйства и управления земельными ресурсами министерства национальной экономики Республики Казахстан.

6.10. При проектировании предприятий необходимо выполнять мероприятия по защите от статического электричества в соответствии с Постановлением Правительства Республики Казахстан от 24 октября 2012 года № 1355 Об утверждении Правил устройства электроустановок.

6.11 Материалы аппаратов, трубопроводов, арматуры следует принимать с учетом агрессивности сред.

6.12 Трубопроводы и арматура, расположенные в охлаждаемых местах, должны быть утеплены.

6.13 Насосные станции, как правило, следует проектировать с автоматическим управлением без постоянного пребывания на них обслуживающего персонала.

6.14 Категории производств предприятия по ответственности зданий и сооружений, взрывной, взрывопожарной и пожарной опасности, по опасности поражения электрическим током следует принимать согласно рекомендуемому приложению 1.

6.15 Автоматическими средствами пожаротушения должны оборудоваться помещения отделений сушки кристаллической лимонной кислоты и сушки мицелия площадью более 500 м², помещения склада ротовой продукции площадью более 1000 м².

6.16 Автоматической пожарной сигнализацией необходимо оборудовать помещения согласно требованиям санитарных норм РК.

6.17 По надежности электроснабжения установок пожаротушения и пожарной сигнализации следует относить к I категории.

6.18 Наружное пожаротушение следует предусматривать в соответствии с требованиями глав СНиП по проектированию водоснабжения, наружных сетей и сооружений.

7 Основные потенциальные поставщики технологий/оборудования лимонной кислоты в зарубежных странах:

Таблица А.5 - Потенциальные поставщики технологий

Company: «VOGELBUSCH Biocommodities GmbH», Blechturm-gasse 11, 1051, г. Вена, Австрия Тел.: +43 1 54 661-0, Факс: +43 1 545 29 79 vienna@vogelbusch.com
Company: Anhui Fengyuan Biochemical Co., Ltd. Address: 73 Daqing Rd., Bengbu City, Anhui 233010, China, Country/Region: China. Tel: +91-(0552)-4926486. Fax: +91-(552)-4926733
Company: ADM (Archer Daniels Midland), 77 West Wacker Drive, Suite 4600. Chicago, Illinois 60601. Phone: 312-634-8100
Company: JUNGBUNZLAUER SUISSE AG St. Alban-Vorstadt 90. CH-4002 Basel. Switzerland Phone +41-61-2955 100 Fax +41-61-2955 108
Company: Hoffmann-La Roche Grenzacherstrasse 124 4070 Basel Switzerland +41 61 6881111 +41 61 6919391
Changzhou Changjiang Drying Equipment Co., Ltd. ADD: Jiaoxi Industrial Zone, Changzhou City, Jiangsu Province, China Frank Zhu tel:0086 13961120588 E-mail: market@china-yangtze.com We Chat:13961120588 TEL: 0086-519-88901888 88902888 FAX: 0086-519-88902479

Технологическое оборудование для производства лимонной кислоты

Ферментеры с механическим перемешиванием барботажного типа широко применяются для стерильных процессов выращивания микроорганизмов - продуцентов биологически активных веществ. Ферментер такого типа представляет собой вертикальный аппарат цилиндрической формы, изготовленный из стали X18H10T или биметалла с эллиптическими крышкой и днищем.

Отношение высоты к диаметру равно 2,6:1. На крышке аппарата расположен привод перемешивающего устройства, состоящий из электродвигателя, редуктора, муфты, подшипника и сальника. Здесь же установлены штуцеры для загрузки питательной среды и посевного материала, подачи и вывода воздуха, смотровые окна, люки для погружения моющей механической головки; предохранительный клапан.

Для выгрузки культуры в днище аппарата предусмотрен спускной штуцер. Внутри корпуса проходит вал с закрепленными на нем перемешивающими устройствами, состоящими из закрытых турбин. Барботер соединен с трубой для подвода воздуха и выполнен в виде разборного ромба из перфорированных труб. В верхней его части расположены в шахматном порядке 2000-3000 отверстий. Вал и перемешивающие устройства с муфтами приводятся во вращение от мотор-редуктора.

Ферментер оборудован рубашкой, состоящей из 6-8 ярусов-секций. Каждая секция состоит из 8 навитых опоясывающих каналов, выполненных из уголкового профиля. Площадь поверхности охлаждения рубашки 60 м², внутренняя поверхность которой состоит из змеевиков диаметром 600 мм и общей высотой 2,4 м.

Ферментер рассчитан для работы под избыточным давлением 0,25 МПа и стерилизации при 130-140°C, а также для работы под разрежением. В процессе выращивания микроорганизмов давление внутри ферментера в пределах 50 кПа; расход стерильного воздуха до 1 м³/мин. Высота столба жидкости в аппарате 5-6 м при высоте аппарата более 8 м.

Для обеспечения стерильности процесса предусмотрены торцевые уплотнения вала перемешивающего устройства с паровой защитой. Торцевые уплотнения рассчитаны для работы при давлении до 0,28 МПа и остаточном давлении не ниже 2,7 кПа, температуре 30-250°C и частоте вращения вала до 500 мин⁻¹. С помощью торцевых уплотнений удается практически полностью предотвратить утечку среды или попадание воздуха в полость аппарата в месте вывода вала. Торцевые уплотнения, соприкасающиеся с рабочей средой, изготавливаются из стали X18H10T и X17H13M2T, а также из титана BT-10. Длительность безотказной работы торцевого уплотнения не менее 2000 ч при ресурсе работы 8000 ч. Допустимое радиальное биение вала в зоне торцевого уплотнения не более 0,25 мм, угловое биение вала не более 0,25.

Цилиндрический эрлифтный ферментер

Цилиндрический эрлифтный ферментер предназначен для непрерывного выращивания дрожжей на сусле, которое является отходом гидролизно-дрожжевого производства. Он представляет собой стальной сварной корпус с днищем в виде усеченного конуса и конической крышкой с центральным отверстием. Внутри аппарата установлены четыре диффузора, которые создают четыре самостоятельно циркулирующих потока. Через коллектор в центральные трубы каждого диффузора, на конце которых имеются конус и кювета, подается сжатый воздух. На крышке аппарата установлен распределительный бачок, куда через штуцера поступают бражка, сусло, засевные дрожжи и аммиачная вода.

Все компоненты смешиваются и образуют, питательную смесь, которая свободным потоком по трубам диаметром 100 мм поступает вниз, в кюветы аэрирующего устройства. Питательная смесь, переливаясь через край кюветы, смешивается с воздухом, выходящим через щели под кюветой. Образовавшаяся воздушно-жидкостная эмульсия поднимается вверх по диффузору к отбойнику, откуда, разрушаясь, стекает вниз. Для наружного охлаждения стенок аппарата установлен ороситель в виде коллектора. В таблице А1.1 представлены техническая характеристика.

Таблица А1.1 – Техническая характеристика ферментера

Наименование	Показатели			
Объем аппарата, м ³	320	500	600	1300
Производительность по приточному суслу, м ³ /ч	20 ... 30		30 ... 35	55 ... 62
Среда, pH	4,5		3,5 ... 4,5	4,2 ... 4,5
Расход воздуха, м ³ /ч	до 5000	9000	14 000 ... 16 000	18 000
Давление воздуха избыточное, кгс/см ²	0,6	0,75	0,4	0,6
Поверхность охлаждения рубашки диффузора, м ²	30	50 · 3 = 150	58	50 · 4 = 200
Габаритные размеры, мм	5700 x 13350	7600 x 11200	7400 x 14175	11 000 x 14500

• Микропроцессорное управление поддерживает заданные параметры (температуру приготовления, стерилизации и розлива среды, скорость перемешивания), что гарантирует высокое качество приготовленной среды.

• Полный цикл приготовления и стерилизации среды занимает от 60 до 120 минут.

• Специальный порт для внесения добавок (витаминов, антибиотиков, крови) в готовую среду до розлива.

• Продолжительность стерилизации среды регулируется от 1 до 99 минут.

• Температура автоклавирования регулируется в диапазоне от 60°C до 138°C.

• Встроенная магнитная мешалка с регулируемой скоростью от 0 до 260 об/мин обеспечивает постоянное перемешивание и однородность в течение всего цикла приготовления и розлива среды.

• Быстрое охлаждение циркулирующей холодной водой до выбранной температуры розлива готовой среды. Поддержание заданной температуры среды в течение всего цикла розлива.

• Предотвращение вскипания и пенообразования среды благодаря поддержанию избыточного давления в рабочей камере на стадии охлаждения. Техническая характеристика средоварки MediaPrep (Systec, Германия) указаны в таблице А1.2

Таблица А1.2 - Техническая характеристика средоварки MediaPrep (Systec, Германия) РУ: ФС.2006/2072

Характеристика	MediaPrep -10	MediaPrep -20	MediaPrep -30	MediaPrep -45	MediaPrep -65	MediaPrep -90
Объем приготавливаемой среды, л	0,5-10	4-20	6-30	9-45	13-65	18-90
Объем бака, л	12	23	34	47	69	98
Размер бака, Ø x высоту, мм	270x222	270x422	270x622	380x452	380x657	480x572
Внешние размеры (ШxГxВ), мм	555x635x480	555x635x715	555x635x915	550x780x1080	550x780x1210	650x895x1110
Мощность, кВт	3,6	9,3	9,3	20,0	20,0	20,0

• Полностью автоматическая система для розлива питательных сред в чашки Петри.

• Карусели на 220, 440 и 660 чашек Петри.

• Управление с помощью сенсорного дисплея.

• Встроенная пополняемая база данных размеров чашек Петри различных производителей.

- Дозирование сред в диапазоне от 1 до 1000 мл.
- Максимальная производительность 500 мл/мин.
- Возможность установки интервала дозирования от 0 до 10 сек.
- Калибровка системы под стандартные отклонения чашек Петри разных производителей (таблица А1.3).

Таблица А1.3 – Техническая характеристика

Диаметр чашек Петри	90 мм
Емкость карусели	220/440/660
Скорость розлива	2000
Управление	микропроцессор
Дисплей	сенсорный
Программы	+
Розлив под УФ	+
Охлаждение	опция
Точность розлива	1 процент
Возможность ручного розлива	+
Защита от брызг при розливе	+
Возможность внесения добавок при розливе	Опция
Принтер билетный	На средоварке
Маркер чашек петри	Опция
Интерфейс RS232 USB	+
Габариты ШхГхВ	683х662х348
Вес, кг	37,5 кг

Автоматические счетчики колоний Scan 300/500/1200 обеспечивают быстрый и эффективный подсчет колоний в чашках Петри диаметром от 55 до 150 мм, на мембранах, во флаконах и пр.

• Счетчики колоний Scan 300, 500 и 1200 работают по уникальной технологии, разработанной инженерами Interscience. При помощи всего одного нажатия все обнаруженные колонии подсчитываются и помечаются крестиками. Полученные изображения сразу сохраняются и могут быть проверены и повторно пересчитаны в любое время.

• Программное обеспечение счетчиков способно различать до 7 различных цветов колоний на одной чашке, адаптируется к большинству типов агара и позволяет автоматически определять зоны ингибирования.

Технические характеристики:

- минимальный размер колоний, мм - менее 0,1;
- диапазон счета, колоний - неограничен;
- счет на чашках Петри, d 55 - 90 мм, в том числе со спиральным посевом;
- черно-белая камера с ПЗС- матрицей (CCD) с разрешением, пикс. - 640×480;
- кратность цифрового увеличения камеры - х7;
- габариты, ДхШхВ, мм - 280×280×290;
- вес, кг - 6,6.

• Паровые автоклавы серии MLS предназначены для стерилизации питательных сред, посуды, металлических инструментов и лабораторных отходов.

• На поверхность автоклавов нанесено теплоизолирующее покрытие, острые углы закруглены. Панель управления удобно расположена в верхней части автоклава. Для обеспечения безопасности рычаг крышки снабжен системой блокировки.

• Все операции (от заполнения водой до завершения процесса стерилизации) автоклав выполняет в автоматическом режиме. Ход процесса стерилизации отображается на панели

дисплея прибора. По завершении процесса стерилизации подается звуковой сигнал и включается индикатор. Температура стерилизации регулируется микропроцессором с высокой точностью от 105 до 135°C.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Протоколы испытаний готовой продукции



АО «Алматинский технологический университет»
Научно-исследовательская лаборатория по оценке качества и безопасности
продовольственных продуктов
050061, г. Алматы, пр. Райымбека 348/5, тел. 8(727)2774743,
e-mail: food_safety@mail.ru

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ №3 от «13» января 2026 г.

Наименование продукции: Лимонная кислота (образец №1)
Регистрационный номер: 3
Дата поступления образца: 08.01.2026 г.
Основание для испытаний (акт отбора и пр.): Заявка
Заявитель: Шайменова Б.С.
Изготовитель (страна, фирма, предприятие):
Вид испытаний: Контрольный
Дата изготовления:
Срок годности:
Дата начала и окончания испытаний: 08.01.2026 г.-13.01.2026 г.
Обозначение НД на продукцию:
Условия проведения испытания: температура – 21°C, влажность – 64%.

Наименование показателей, единицы измерения	Норма по НД	Фактические результаты	НД на методы испытаний
1	2	3	4
Органические кислоты, мг/кг: -щавелевая кислота -глюконовая кислота -лимонная кислота		331,2±66,24 3519±703,8 993600±198720	ГОСТ Р 52841-2007

Директор НИИ ТБ

Исполнители:

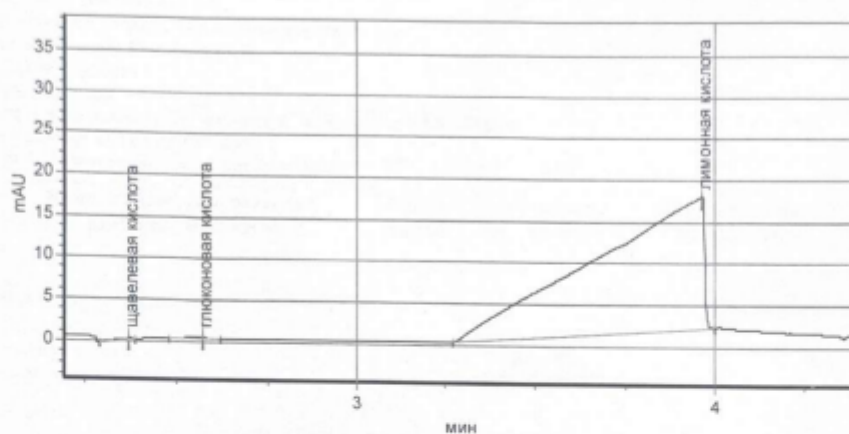
Набиева Ж.С.

Самадун А.И.

Мугилян М.Е.

Протокол испытаний распространяется только на образец, подвергнутый испытанию. Частичная или полная переписка протокола испытаний без разрешения Научно-исследовательской лаборатории по оценке качества и безопасности продовольственных продуктов запрещена.

Дата: 12.01.2026 15:56:56
 Оператор: polzovatel
 Файл ЭФГ: C:\Lumex\EI\forun\mdf\AK_П-2_2601121556.mdf
 Файл метода: C:\Lumex\EI\forun\Программы\Органические кислоты 15.11.12.mtk
 Температура анализа: 20.0 °C
 Длина волны: 254
 Проба: №2
 Этап 1. Время 599 сек, Напр. 20 кВ, Давл. 0 мбар, Длина волны 254 нм.
 Метод расчета: Абсолютная градуировка.



N	Время	Компонент	Высота	Начало	Конец	Площадь	Конц., мг/л	Конц., мг/кг
1	2.363	щавелевая кислота	0.184	2.285	2.392	6.563	1.60	331,2±66,24
2	2.570	глюконовая кислота	0.312	2.475	2.618	10.11	17.0	3519±703,8
3	3.965	лимонная кислота	15.761	3.267	4.000	3402.0	4800.0	993600±198720



АО «Алматынский технологический университет»
Научно-исследовательская лаборатория по оценке качества и безопасности
продовольственных продуктов
050061, г. Алматы, пр. Райымбека 348/5, тел. 8(727)2774743,
e-mail: food_safety@mail.ru

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ №4 от «13» января 2026 г.

Наименование продукции: **Лимонная кислота (образец №2)**

Регистрационный номер: **4**

Дата поступления образца: **08.01.2026 г.**

Основание для испытаний (акт отбора и пр.): **Заявка**

Заявитель: **Шайменова Б.С.**

Изготовитель (страна, фирма, предприятие):

Вид испытаний: **Контрольный**

Дата изготовления:

Срок годности:

Дата начала и окончания испытаний: **08.01.2026 г.-13.01.2026 г.**

Обозначение НД на продукцию:

Условия проведения испытания: температура – 21°C, влажность – 64%.

Наименование показателей, единицы измерения	Норма по НД	Фактические результаты	НД на методы испытаний
1	2	3	4
Органические кислоты, мг/кг:			ГОСТ Р 52841-2007
-щавелевая кислота		319,5±63,9	
-глюконовая кислота		2982±596,4	
-лимонная кислота		979800±195960	

Директор НИИ ТБ

Исполнители:

Набиева Ж.С.

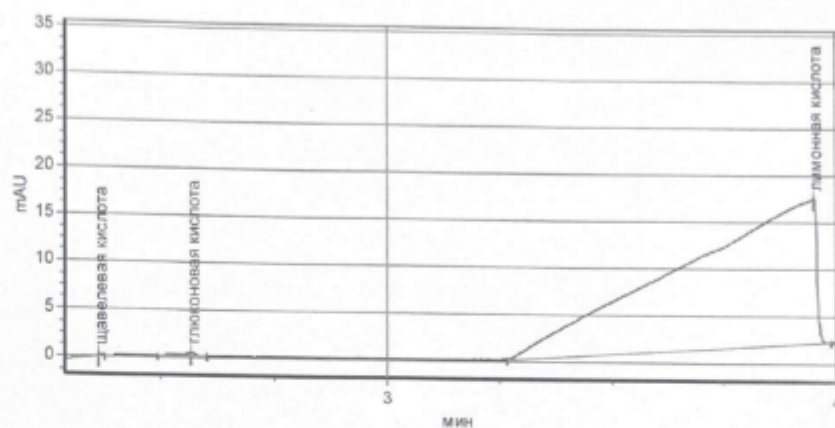
Самадун А.И.

Мугиын М.Е.



Протокол испытаний распространяется только на образец, подвергнутый испытаниям. Частичная или полная переписка протокола испытаний без разрешения Научно-исследовательской лаборатории по оценке качества и безопасности продовольственных продуктов запрещена.

Дата: 12.01.2026 16:13:29
 Оператор: polzovatel
 Файл ЭФГ: C:\Lumex\EI\forun\mdf\AK_Л-3_2601121613.mdf
 Файл метода: C:\Lumex\EI\forun\Программы\Органические кислоты 15.11.12.mtk
 Температура анализа: 20.0 °C
 Длина волны: 254
 Проба: №3
 Этап 1. Время 599 сек. Напр. 20 кВ, Давл. 0 мбар, Длина волны 254 нм.
 Метод расчета: Абсолютная градуировка.



N	Время	Компонент	Высота	Начало	Конец	Площадь	Конц., мг/л	Конц., мг/кг
1	2.362	щавелевая кислота	0.185	2.283	2.375	6.347	1.50	319,5±63,9
2	2.565	глюконовая кислота	0.296	2.492	2.598	8.571	14.0	2982±596,4
3	3.952	лимонная кислота	15.426	3.268	3.990	3293.0	4600.0	979800±195960

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Документы на интеллектуальную собственность

КАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 34800

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION

 (21) 2019/0798.1
(22) 25.10.2019
(45) 25.12.2020

(54) Мутантты штамм *Aspergillus niger* R5/4 - лимон қышқалының продуценті
Мутантты штамм *Aspergillus niger* R5/4 - продуцент лимонной кислоты
Mutant strain *Aspergillus niger* R5/4 - citric acid producer

(73) «Сәкен Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)
Некоммерческое акционерное общество «Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина» (KZ)
«Saken Seifullin Kazakh Agrotechnical University» Non-Commercial Joint-Stock Company (KZ)

(72) Оспанкулова Гульязым Хамитовна (KZ) Оспанкулова Гульязым Хамитовна (KZ)
Садуақасова Сауле Абдухапировна (KZ) Saduakhassova Saule Abdukhapirovna (KZ)
Шайменова Бақыт Сайлауовна (KZ) Shaimenova Bakhyt Sailauovna (KZ)
Киян Владимир Сергеевич (KZ) Kiyun Vladimir Sergeyevich (KZ)
Ермеков Ерпаз Ермекович (KZ) Yermekov Yermaz Yermekovich (KZ)
Мұрат Линара Азаматқызы (KZ) Murat Linara Azamatkyzy (KZ)

 ЭЦК қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

Е. Оспанов
E. Ospanov
Y. Ospanov

«Ұлттық интеллектуалдық меншік институты» РМҚ директоры
Директор РПТИ «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

КАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 35422

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION

 (21) 2020/0724.1
(22) 19.10.2020
(45) 24.12.2021

(54) Бислай крахмалынан мальтодекстриндерді алу тәсілі
Способ получения мальтодекстринов из пшеничного крахмала
Method for producing maltoextrins from wheat starch

(73) «Сәкен Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)
Некоммерческое акционерное общество «Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина» (KZ)
Non-Profit Joint-Stock Company «Kazakh Agrotechnical University named after Saken Seifullin» (KZ)

(72) Оспанкулова Гульязым Хамитовна (KZ) Оспанкулова Гульязым Хамитовна (KZ)
Садуақасова Сауле Абдухапировна (KZ) Saduakhassova Saule Abdukhapirovna (KZ)
Тоимбаева Дана Болатовна (KZ) Toimbayeva Dana Bolatovna (KZ)
Шайменова Бақыт Сайлауовна (KZ) Shaimenova Bakhyt Sailauovna (KZ)
Боктербаева Әлігерім Сағындықызы (KZ) Bokterbayeva Aigerim Sagyndykyzy (KZ)
Ермеков Ерпаз Ермекович (KZ) Yermekov Yermaz Yermekovich (KZ)
Мұрат Линара Азаматқызы (KZ) Murat Linara Azamatkyzy (KZ)

 ЭЦК қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

Е. Қуантыров
E. Kuantyrov
Y. Kuantyrov

«Ұлттық интеллектуалдық меншік институты» РМҚ директоры
Директор РПТИ «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

Свидетельство о депонировании штамма микроорганизма

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІНІҢ
«МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
КОЛЛЕКЦИЯСЫ» ШАРАШЫЛЫҚ ЖҮРГІЗУ
ҚҰРЫЛЫМДАҒЫ РЕСПУБЛИКАЛЫҚ
МЕМЛЕКЕТТІК КӨСІПОРНЫ



РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ ХОЗЯЙСТВЕННОГО
ВЕДЕНИЯ «РЕСПУБЛИКАНСКАЯ
КОЛЛЕКЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ»
КОМИТЕТА НАУКИ МИНИСТЕРСТВА
ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

010000, Астана қ., Уәлиханов көшесі, 13/1
тел./факс: +7 (7172) 20 10 32
E-mail: rcm-info@mail.ru, www.rcm.kz
БСХ 06114000336

010000, г. Астана, ул. Валиханова, 13/1
тел./факс: +7 (7172) 20 10 32
E-mail: rcm-info@mail.ru, www.rcm.kz
ИНН 06114000336

№ 00/10-590

СВИДЕТЕЛЬСТВО О ДЕПОНИРОВАНИИ ШТАММА МИКРООРГАНИЗМА

Кому: Оспанкуловой Г.Х., Садуахасовой С.А., Шайменовой Б.С., Киян В.С.,
Ермекову Е.Е., Мурат Л.А., Сармуринной З.С.
имя, и/или наименование организации и адрес депонизатора, которому выдается свидетельство о депонировании

АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина»

1. НАЗВАНИЕ ШТАММА

Aspergillus niger R5/4

Опознавательная ссылка (номер, ссылка
и т.д., присвоенный штамму
депонителем)

R5/4

Коллекционный номер,
присвоенный коллекцией

F- RKM 0861

2. НАУЧНОЕ ОПИСАНИЕ И/ИЛИ ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ШТАММА

Род *Aspergillus*
Вид *niger*

Микроорганизм, поименованный в графе 1, сопровождался ходатайством о депонировании, включающем



¹ Паспорт



¹ Справку о патогенности

001343

3. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИНЯТИЕ

Настоящим утверждается, что штамм микроорганизма, поименованный в графе 1, депонирован в Республиканской коллекции микроорганизмов с целью патентного депонирования.

Дата депонирования
04.10.2019 г.

4. КОЛЛЕКЦИЯ

РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов»

Название коллекции:
РГП «Республиканская коллекция
микроорганизмов»

Подпись лица, уполномоченного,
представлять коллекцию, или
полномочного должностного лица:

Центральный музей микроорганизмов

Ескараева А.А.

Генеральный директор
РГП «Республиканская
коллекция микроорганизмов»

Сармуринна З.С.
04.10.2019г

Адрес коллекции

Печать организации (гербовая)

010000, г. Нур-Султан,
ул. Ш. Уалиханова, 13/1
факс: 8 (7172) 20-10-32
e-mail: rcm-info@mail.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Отчет НИР и проектов, в рамках которых был выполнена диссертационная работа

С.Сейфуллин атындағы

Қазақ агротехникалық зерттеу университеті бойынша

БҰЙРЫҚТАН КӨШІРМЕ

19.09.2018ж.

723ж/к

Жеке құрам бойынша

Агроөнеркәсіп кешені қайта өңдеу кәсіпорындарының тиімділігі мен бәсекеге қабілеттілігін арттыру мақсатында ғылыми-технологиялық қамтамасыздандыру атты бағдарлама бойынша келесі қызметкерлер ғылыми-зерттеу жұмыстарын негізгі жұмыстарынан бос уақытта Қазақстан Республикасының Еңбек кодексінің 21-бабының 1-тармағы негізінде жұмысқа қабылданын:

Докторант Бахыт Саулауовна Шайменова белгілі бір жұмыстың орындалу уақытына Қазақстан Республикасы Еңбек кодексінің 30-бабы 1-тармағы 3) тармақшасына сәйкес, 2018 жылғы қыркүйектің 1-нен желтоқсанның 31-не дейін кіші ғылыми қызметкер лауазымына қосымша атқарушы ретінде еңбек шарты негізінде 129750 теңге қызметімен қабылданын.

Негіздеме: жоба жетекшісі Г.Х.Оспанкулованың қызметтік хаты, еңбек шарты.

Басқарма төрағасы

А.Куришбаев

Көшірме дұрыс
Өкімшілік департаментінің
жетекші менеджері



Ж.Сагалбекова

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан

АО «КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. С. СЕЙФУЛЛИНА»

УДК 663.15
№ государственной
Нив.Ж

УТВЕРЖАЮ
Заместитель председателя Правления
по стратегическому планированию,
науке и международным связям, к.э.н.



С.В. Мосильный

2018 г.

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

в рамках бюджетной программы 267 «Повышение доступности знаний и научных исследований», подпрограммы 101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий», научно-технической программы «Научно-технологическое обеспечение перерабатывающих предприятий агропромышленного комплекса с целью повышения их эффективности и конкурентоспособности» (шифр)

по проекту:
«РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ
КУКУРУЗНОГО КРАХМАЛА»
(промежуточный)

Руководитель НИР, к.б.н.

Г.Х. Оспанкулова

Астана 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель мероприятия, к.б.н.	Оспанкулова Г.Х. (введение, все разделы, заключение)
Исполнители:	
Главный научный сотрудник, д.с.-х.н	Алматзина Б.Ш. (раздел 3.3)
Ведущий научный сотрудник, к.б.н	Садуахасова С.А. (раздел 3)
Научный сотрудник, к. с.-х.н	Булашев Б.К. (разделы 3.2, 3.3)
Инженер	Шаринов А.К. (разделы 3.3, 3.5)
Младший научный сотрудник	Каманова С.Г. (разделы 3.1, 3.4)
Младший научный сотрудник	Тоймбаева Д.Б. (разделы 3.1, 3.4)
Младший научный сотрудник	Муратхан М. (разделы 3.1, 3.4)
Младший научный сотрудник	Боктербаева А.С. (раздел 3.4)
Младший научный сотрудник	Шайменова Б. С. (разделы 3.4, 3.6)
Младший научный сотрудник	Ибатаев Ж.А. (раздел 3.4, 3.6)
Лаборант	Руды В.Н.
Нормоконтролер	Жарылгасынов С.С.

С.Сейфуллин атындағы

Қазақ агротехникалық зерттеу университеті бойынша

БҰЙРЫҚТАН КӨШІРМЕ

15.03.2019ж.

223ж/к

Жеке құрам бойынша

Агроөнеркәсіп кешені қайта өңдеу кәсіпорындарының тиімділігі мен бәсекеге қабілеттілігін арттыру мақсатында ғылыми-технологиялық қамтамасыздандыру атты бағдарлама бойынша келесі қызметкерлер ғылыми-зерттеу жұмыстарын негізгі жұмыстарынан бос уақытта Қазақстан Республикасының Еңбек кодексінің 21-бабының 1-тармағы негізінде жұмысқа қабылданын:

Докторант Бахыт Сайлауовна Шайменова белгілі бір жұмыстың орындалу уақытына Қазақстан Республикасы Еңбек кодексінің 30-бабы 1-тармағы 3) тармақшасы негізінде, 2019 жылғы ақпанның 1-нен желтоқсанның 31-не дейін кіші ғылыми қызметкер лауазымына қосымша атқарушы ретінде еңбек шарты негізінде 42555 теңге қызметімен қабылданын.

Негіздеме: жоба жетекшісі Г.Х.Оспанкулованың қызметтік хаты, еңбек шарты.

Басқарма төрағасы

А.Куришбаев

Көшірме дұрыс
Өкімшілік департаментінің
жетекші менеджері



Ж.Сагалбекова

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан
АО «КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. С. СЕЙФУЛЛИНА»

УДК 664.28; 664.162.2; 663.15
№ госрегистрации:
0118РК01306
0118РК01319
0118РК01320
Имя №
0219РК01040
0219РК01120
0219РК01121

УТВЕРЖДАЮ

Проректор - руководитель центра

инновационной

деятельности, к.ф.-м.н.

И.Т.Токбергенов

2019 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

в рамках бюджетной программы 267 «Повышение доступности знаний и научных исследований», подпрограммы 101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий»

по научно-технической программе:

BR06249419 «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ И КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТИ» (шифр О.0897) (промежуточный)

Руководитель программы, к.б.н.

Г.Х. Оспанкулова

Г.Х. Оспанкулова

Нур-Султан 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель проекта, к.б.н. *Г.Х. Оспанкулова* 31.10.19 Оспанкулова Г.Х. (введение, все разделы, заключение)
Исполнители:
Главный научный сотрудник, д.с.-х.н. *Алимагизова Б.Ш.* 31.10.19 Алимагизова Б.Ш. (разделы 1, 3)
Ведущий научный сотрудник, к.б.н. *Садуахасова С.А.* 31.10.19 Садуахасова С.А. (разделы 1, 2, 3)
Ведущий научный сотрудник, PhD *Киян В.С.* 31.10.19 Киян В.С. (раздел 2, 3)
Ведущий научный сотрудник, к.т.н. *Даутканов Н.Б.* 31.10.19 Даутканов Н.Б. (разделы 1, 3)
Старший научный сотрудник, к.т.н. *Ермекаев С.Б.* 31.10.19 Ермекаев С.Б. (разделы 2, 3)
Научный сотрудник, к.т.н. *Касимов М.М.* 31.10.19 Касимов М.М. (разделы 3)
Научный сотрудник, к.с.-х.н. *Булашев Б.К.* 31.10.19 Булашев Б.К. (разделы 3)
Научный сотрудник, к.т.н. *Школ К.* 31.10.19 Школ К. (разделы 3)
Научный сотрудник, PhD *Игенбаев А.К.* 31.10.19 Игенбаев А.К. (разделы 2)
Научный сотрудник, к.т.н. *Мустафаев А.К.* 31.10.19 Мустафаев А.К. (разделы 3)
Инженер *Шарипов А.К.* 31.10.19 Шарипов А.К. (разделы 3)
Младший научный сотрудник *Шайменова Б.С.* 31.10.19 Шайменова Б.С. (разделы 3)
Младший научный сотрудник *Искаков Б.М.* 31.10.19 Искаков Б.М. (разделы 3)
Младший научный сотрудник *Боктербаева А.С.* 31.10.19 Боктербаева А.С. (разделы 3)
Младший научный сотрудник *Мурат Л.С.* 31.10.19 Мурат Л.С. (разделы 3)
Старший лаборант *Ермеков Е.Е.* 31.10.19 Ермеков Е.Е.
Нормоконтролер *Жарылгасинов С.С.* 31.10.19 Жарылгасинов С.С.

2

С.Сейфуллин атындағы
Қазақ агротехникалық зерттеу университеті бойынша

БҰЙРЫҚТАН КӨШІРМЕ

24.02.2020ж.

145ж/к

Жеке құрам бойынша

Агроөнеркәсіп кешені қайта өңдеу кәсіпорындарының тиімділігі мен бәсекеге қабілеттілігін арттыру мақсатында ғылыми-технологиялық қамтамасыздандыру атты бағдарлама бойынша келесі қызметкерлер ғылыми-зерттеу жұмыстарын негізгі жұмыстарынан бос уақытта Қазақстан Республикасының Еңбек кодексінің 21-бабының 1-тармағы негізінде жұмысқа қабылданын:

№	Т.Ә.Ж.	Лауазымы	Жұмыс мерзімі	Айлар саны
1	Шайменова Бахыт Сайлауовна	кіші ғылыми қызметкер	03.02.2020 31.12.2020	11

Негіздеме: жоба жетекшісі Г.Х.Оспанкулованың қызметтік хаты, еңбек шарттары.

Басқарма төрағасы

А.Куришбаев

Көшірме дұрыс
Әкімшілік департаментінің
жетекші менеджері

Көшірме дұрыс:
Әкімшілік департаменті
Ж.Сағалбекова

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан
НАО «КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. С. СЕЙФУЛЛИНА»
(НАО «КАТУ им.С.Сейфуллина»)

МРНТИ65.39.31; 65.39.00;62.09.00; 65.37.91
УДК 664.28; 664.162.2;663.15
Per.NНИОКТР: 0118РК01306; 0118РК01319; 0118РК01320
Per.NИКРБС: 0218РК01006; 0218РК01007; 0218РК01008; 0219РК01040;
0219РК01121; 0219РК01120; 0220РК0086; 0220РК0088; 0220РК0088

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Председателя Правления по науке, инновационной деятельности и международным связям
«НАО «КАТУ им.С.Сейфуллина»
И.Т.Токбергенов
2020 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

в рамках бюджетной программы 267 «Повышение доступности знаний и научных исследований», подпрограммы 101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий»

по научно-технической программе:

BR06249419 «НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ И КОНКУРЕНТОСПОСОБНОСТИ» (шифр О.0897) (заключительный)

Руководитель программы, к.б.н. *Г.Х. Оспанкулова* Г.Х. Оспанкулова

Нур-Султан 2020

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Наличие сертификата о прохождении стажировки

Учебный центр ТОО «Жаркентский Крахмалопаточный завод»

СЕРТИФИКАТ

Настоящий сертификат выдан

Шайменовой Бахыт Сайлауовне

в том, что она с 16 ноября 2020 года по 1 декабря 2020 года
прошла научную стажировку на базе

ТОО «Жаркентский Крахмалопаточный завод»

в лаборатории по теме:

«Глубокая переработка зерна кукурузы. Производные
крахмала»



И.О. генерального директора *В.Р. Халиков* Халиков В.Р.

Регистрационный номер 00029

ПРИЛОЖЕНИЕ К
Сертификаты о повышении квалификации





HACETTEPE
UNIVERSITY

This is to certify that

Shaimenova Bakhyt

completed 72 hours training on "Advanced chromatographic and mass spectrometric analysis of food quality and safety" between 01.12.2025 and 09.12.2025 at Hacettepe University.

Prof. Dr. Vural Gökmen

H.Ü. Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü
9.12.2025

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Справка о наличии публикации в базе данных Scopus

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ҒЫЛЫМ
ЖӘНЕ ЖОҒАРҒЫ БІЛІМ МИНИСТРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ

«ҰЛТТЫҚ МЕМЛЕКЕТТІК ҒЫЛЫМИ-
ТЕХНИКАЛЫҚ САРАПТАМА ОРТАЛЫҒЫ»
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫНЫҢ
АСТАНА ҚАЛАСЫНЫҢДАҒЫ ФИЛИАЛЫ



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ

ФИЛИАЛ АКЦИОНЕРНОГО ОБЩЕСТВА
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГОСУДАРСТВЕННОЙ
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
В ГОРОДЕ АСТАНА

010000, Республика Казахстан
Астана қаласы, Пушкин көшесі, 15Б, 1 қ.бөл.
тел.: 8 (7172) 27-42-13
E-mail: astana@ncste.kz

010000, Республика Казахстан
город Астана, ул. Пушкина, 15Б, к.п. 1
тел.: 8 (7172) 27-42-13
E-mail: astana@ncste.kz

Исх. №: 03-04/41
« 16 » 01 2026 г.

Шайменова Бахыт Сайлауовна

На письмо
от 08.01.2026 г.

Филиал АО «Национальный центр государственной научно-технической экспертизы» в городе Астана предоставляет информацию о наличии публикаций докторанта НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина» Шайменовой Бахыт Сайлауовны в научных изданиях, входящих в международные информационные ресурсы Web of Science (Clarivate Analytics) и Scopus (Elsevier).

«Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences» (Slovakia), ISSN: 1338-0230, годы охвата в Scopus с 2013 года по 2024 год (охват в Scopus прекращен). Предметная область – сельскохозяйственные и биологические науки о продуктах питания.

Статья Шайменовой Б.С.:

Shaimenova Bakhyt, Ospankulova Gulnazym, Saduakhasova Saule, Murat Linara, Toimbayeva Dana. Improving the citric acid production by mutant strains *Aspergillus niger* using carbohydrate-containing raw materials as a carbon source // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2024. – V. 18., – P. 157 - 173.

Статья выявлена в базе Scopus. В момент ее опубликования в 2024 году журнал «Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences» имел CiteScore за 2022 год равный 2,5, процентиль по науке о продуктах питания - 44.

Директор филиала
АО «НЦГНТЭ» в г. Астана

Г. Ташенова

Исх. Р. Манасбаева
тел. +7(7172)27-42-13

001650

КАЗАХСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ ҒЫЛЫМ
ЖӘНЕ ЖОҒАРҒЫ БІЛІМ МИНИСТЕРЛІГІ
ҒЫЛЫМ КОМИТЕТІ

«ҰЛТТЫҚ МЕМЛЕКЕТТІК ҒЫЛЫМИ-
ТЕХНИКАЛЫҚ САРАПТАМА ОРТАЛЫҒЫ»
АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫНЫҢ
АСТАНА ҚАЛАСЫНЫҢДАҒЫ ФИЛИАЛЫ



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
КОМИТЕТ НАУКИ

ФИЛИАЛ АКЦИОНЕРНОГО ОБЩЕСТВА
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ГОСУДАРСТВЕННОЙ
НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
В ГОРОДЕ АСТАНА

010000, Республика Казахстан
Астана қаласы, Пушкин көшесі, 15Б, 1 қ.б.бөл.
тел.: 8 (7172) 27-42-13
E-mail: astana@ncste.kz

010000, Республика Казахстан
город Астана, ул. Пушкина, 15Б, к.л. 1
тел.: 8 (7172) 27-42-13
E-mail: astana@ncste.kz

Исх. №: 03-04/42
« 16 » 01 2026 ж.

Шайменова Бахыт Сайлауовна

На письмо
от 08.01.2026 г.

Филиал АО «Национальный центр государственной научно-технической экспертизы» в городе Астана предоставляет информацию о наличии публикаций докторанта НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина» Шайменовой Бахыт Сайлауовны в научных изданиях, входящих в международные информационные ресурсы Web of Science (Clarivate Analytics) и Scopus (Elsevier).

«International Journal of Agricultural Resources, Governance and Ecology» (United Kingdom), ISSN: 1462-4605, годы охвата в Scopus с 2000 года по 2009 год, с 2011 года по 2012 год, с 2014 года по 2023 год, 2025 год. Предметная область – сельскохозяйственные и биологические науки: агрономия и растениеводство; экологические науки: управление, мониторинг, политика и право; экологические науки: экология.

Статья Шайменовой Б.С.:

Saduakhasova S.A., Shaimenova B.S., Yermekov Y.Y., Murat L.A., Kiyan V.S., Ospankulova G.K. Obtaining pesticides and fertilisers for hyper production of citric acid application in smart agriculture system // International Journal of Agricultural Resources, Governance and Ecology. – 2021. – V. 17., Iss. 2-4. – P. 271 - 286.

Статья выявлена в базе Scopus. В момент ее опубликования в 2021 году журнал «International Journal of Agricultural Resources, Governance and Ecology» имел CiteScore за 2020 год равный 1,1, процентиль по агрономии и растениеводству – 33, по экологии – 32, по управлению, мониторингу, политике и праву – 31.

Директор филиала
АО «НЦГНТЭ» в г. Астана

Г. Ташенова

Исп.: Р. Манасбаева
тел. +7(7172)27-42-13

001649