

Лабораторна робота № 6

Тема: Особливості утворення лимонної кислоти *Aspergillus niger* в різних умовах вирощування

Мета роботи: вивчити особливості утворення лимонної кислоти грибом *Aspergillus niger* в різних умовах вирощування.

Обладнання та матеріали: 20%-й розчин сахарози; 10%-ві розчини NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4 та FeSO_4 ; колби ємністю 100 мл; циліндри ємністю 100 мл; піпетки на 10 і 1 мл; препарувальні голки; вата

Теоретичні відомості

Незважаючи на значний прогрес у сфері органічного синтезу, на сьогодні лимонну кислоту отримують мікробіологічним синтезом, а саме шляхом лимоннокислого бродіння солодких відходів цукрового виробництва – патоки (меяси), спричиненого плісневими грибами роду *Aspergillus niger*, тому виробництво часто розташовують спільно з виробництвом цукру.

Харчова промисловість традиційно є основним споживачем виробленої таким чином кислоти, оскільки продукти природного бродіння мають переваги порівняно з хімічно синтезованими та не містять токсичних для організму людини домішок. Лимонна кислота є широкоживаною нешкідливою харчовою добавкою (E330), крім того, її застосовують у медицині, кондитерській промисловості, друкарській справі тощо. Лимонна кислота (ЛК) широко застосовується в харчовій, медичній, фармацевтичній, косметичній та інших галузях промисловості.

У промисловому виробництві лимонної кислоти широко застосовують гриби *A. niger*, оскільки цей вид дає високий вихід цільового продукту, з ним легко працювати, він відносно недорогий і цим самим робить виробничий процес економічно вигідним. Проте необхідно взяти до уваги, що до *A. niger* належать багато штамів, що відрізняються один від одного за своєю морфологією та біохімічними характеристиками: кольору спор та міцелію, розміру та кількості спор, розміру міцелію, утилізації субстрату, ферментаційному часу, здатності продукувати лимонну кислоту на різних субстратах. Продукцент лимонної кислоти має мати певні характеристики, а саме:

- високу швидкість кислотоутворення;
- високий ступінь трансформації джерела вуглецю у лимонну кислоту;
- генетичну однорідність та стабільність;
- толерантність до зміни температури та контамінантів середовища, зокрема до високих концентрацій вуглеводів.

Оптимальні умови культивування наступні: температура для утворення ЛК 30-32°C, для росту і розвитку гриба - 32-37°C; $\text{pH} = 3,0 \div 7,0$. При відносно високих значеннях pH (вище 6,5) поряд з лимонною кислотою інтенсивно синтезується і щавлева кислота, а при $\text{pH} = 5,0 \div 5,5$ спостерігається тенденція до утворення глюконової кислоти.

ІНСТРУКЦІЯ

1. Готують 200 мл повного живильного середовища без мікроелементів, %: сахароза - 10,0; NH_4NO_3 - 0,3; KH_2PO_4 - 0,2; MgSO_4 - 0,05; FeSO_4 - 0,01. Визначають вихідну кислотність розчину за допомогою pH -метра. Живильне середовище ретельно перемішують і розливають по 50 мл у чотири конічні колбочки, кожна ємність 150 мл. Закривають ватними пробками. У всі колбочки вносять рівну кількість спор гриба. Колби підписують і ставлять в термостат при 28-30°C.

2. На шостий день, коли плівка гриба досягне великої щільності, проводять наступний дослід. З колби № 1 виймають міцелій гриба, ретельно промивають з нижньої сторони водою. Плівку гриба висушують при 105°C в сушильній шафі до постійної ваги. За допомогою рН-метра визначають кислотність фільтрату. З колби № 4 акуратно зливають фільтрат і під міцелій підводять 50 мл свіжого середовища, після чого колбу поміщають в термостат.

3. На сьомий день визначають кислотність фільтрату і суху вагу міцелію з колби № 2 описаним вище способом.

4. На восьмий день визначають кислотність фільтрату і сухої ваги міцелію з колб № 3 і 4 описаним вище способом.

В результаті цієї роботи можуть бути отримані наступні дані.

На початку росту мікроміцети інтенсивно накопичують кислоти до тих пір, поки в середовищі досить цукру (колби № 1 і 2), з якого він може синтезувати кислоту. Однак як тільки середовище виснажується, міцелій гриба продовжує збільшуватися у вазі, починається переробка кислоти, та харчування за її рахунок (колба № 3). Культура ж, що отримала додатково цукор (колба № 4), дає значний стрибок у бік більшого накопичення кислоти і збільшення сухої ваги міцелію.

Завдання. Результати дослідів записати в таблицю і замалювати. Зробити висновки про утворення лимонної кислоти грибом *Aspergillus niger* в різних умовах.

Контрольні питання:

1. На якій фазі розвитку мікроміцетів починається активне накопичення лимонної кислоти?

2. При яких умовах культивування гриб *Aspergillus niger* продукує лимонну кислоту?

3. Які характеристики повинні мати продуценти лимонної кислоти?

4. Опишіть основні етапи утворення лимонної кислоти та основні способи промислового отримання