

ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ

МРНТИ 65.55.35

**К. К. Кудасов, С. В. Берстенёв, Д. В. Волков,
К. Ж. Жамбакин**

Институт биологии и биотехнологии растений,
г. Алматы, Казахстан

ЛИМОННАЯ КИСЛОТА. ОБЗОР

Аннотация. Выполнен краткий обзор последних событий по производству лимонной кислоты. Дано описание микроорганизмов, важнейших методов производства, субстратов. Лимонная кислота (ЛК, citric acid, E330) – один из наиболее важных, коммерчески ценных продуктов современной биотехнологии. ЛК производится с помощью ферментации крахмала или сахарозы на основе питательной среды (мелассы) с использованием мицелиальных грибов *Aspergillus niger*. Необходимо развитие лучших методов и решений для повышения эффективности производства и извлечения продукта. Для производства ЛК используются доступные и недорогие побочные продукты агропромышленности. Важнейшие требования к сырью – экологическая чистота и технологичность способа его переработки. Для получения ЛК многие страны ведут исследования и внедряют в производство технологии с использованием местных отходов сельского хозяйства. Казахстан обладает большими возможностями по созданию, развитию производства и экспорту ЛК на базе зернового сырья.

Ключевые слова: лимонная кислота, *Aspergillus niger*, ферментация, брожение, субстрат.



Түйіндемe. Мақала лимон қышқылының өндірісі, микроорганизмдердің сипаттамасы, өндірістің маңызды әдістері және субстраттары бойынша соңғы жаңалықтардың қысқаша шолуын ұсынады. Лимон қышқылы (citric acid, ЛҚ, E330) – қазіргі заманғы биотехнологияның коммерциялық бағалы ең маңызды өнімдерінің бірі. Лимон қышқылы *Aspergillus niger* жіпшумақты саңырауқұлағын пайдалануда қоректік орта (меласса) негізіндегі крахмал немесе сахароза ферментациясы көмегімен өндіріледі. Өнімді өндіру және бөліп алу тиімділігін арттыру үшін сапалы әдістер мен шешімдерді дамыту қажет. ЛҚ өндіруде агроөндірістің қолжетімді және қым-

бат емес жанама өнімдері пайдаланылады. Шикізатқа қойылатын маңызды талап – экологиялық таза және оны қайта өңдеудегі технологиялық. ЛҚ өндіру үшін көптеген елдер зерттеулер жүргізуде және жергілікті ауыл шаруашылық қалдықтарын пайдалану арқылы технологияларды өнеркәсіпке енгізуде. Дәндер шикізаты негізінде ЛҚ өндірісін жасау, дамыту және экспорттау бойынша Қазақстан көптеген мүмкіншіліктерге ие.

Түйінді сөздер: лимон қышқылы, *Aspergillus niger*, ферменттеу, ашыту субстрат.



Abstract. The article presents an overview of recent developments for the production of citric acid, a description of the microorganisms, the most important methods of production substrates. Citric acid (CA, E330) is one of the most important commercially valuable products of modern biotechnology. Most of the citric acid is produced using submerged fermentation of starch or sucrose based culture medium (molasses) using filamentous fungi *Aspergillus niger*. Growth of the market requires the development of best practices and solutions to improve production efficiency and product recovery. For the production of citric acid used available and inexpensive agro-products. The most important requirements for raw materials – environmental friendliness and adaptability of the method of processing. Therefore, to obtain the citric acid in many countries under investigation and applied in production technology using local agricultural waste. Kazakhstan has great potential for the creation, development of production and export of citric acid on the basis of grain.

Key words: citric acid, *Aspergillus niger*, fermentation, fermentation, substrate.

Введение. Лимонная кислота (ЛК, citric acid, E330) – кристаллическое вещество белого цвета, натуральный или синтетический антиоксидант. Химическая формула $C_6H_8O_7$. Соли и эфиры ЛК называются цитратами. При нагревании выше 175 °C разлагается на углекислый газ и воду. ЛК – важный продукт обмена веществ в живых организмах, участвует в цикле трикарбоновых кислот и глиоксилатном цикле. Растения способны накапливать ЛК в пределах до 14 % [1]. В последние годы на рынке органических кислот объем потребления ЛК растет высокими темпами. На сегодняшний день, по оценке экспертов, мировой рынок ЛК это один из самых емких и быстрорастущих рынков в индустрии пищевых добавок [2] (www.bfi-online.ru/ana2011/index.html?msg=2232). Мировое производство ЛК увеличилось с >1,5 млн. т в 2009 г. [3] до >1,8 млн. т в 2014 г. [4]. Рост производства ЛК с помощью ферментации в связи с большим спросом прогнозируется на 5 % в год [5, 6]. Переработка побочных продуктов, отходов сельского

хозяйства в ценные химические вещества и материалы – актуальная проблема для Казахстана. Запуск производства ЛК – одна из целей программы Казахстана «Агробизнес – 2020» на создание и развитие производства по глубокой переработке зерна, программы FAO по сохранению и переработке пищевых продуктов. Полученная ЛК найдет широкое применение в местной промышленности, заменив импорт, обеспечив социальные и экономические выгоды.

Историческая справка. Впервые ЛК была выделена в 1784 г. из сока незрелых лимонов шведским аптекарем Карлом Шееле и до середины 20-х гг. XX в. вырабатывалась из цитрусовых в основном в Италии. Химический синтез ЛК впервые был проведен в 1880 г. С тех пор проводилось много различных исследований по синтезу ЛК, однако ни один из них не был коммерчески выгодным [7]. Работы Вемера [8] и Кэрри [9], многих других исследователей вызвали большой интерес к изучению грибов, которые выделяют органические кислоты [10]. В связи с этим в различных странах развернулись широкие исследования. Производственный процесс, открытый Кэрри в 1916 г., показал способность *A. niger* аккумулировать значительные количества ЛК в основном в сахарной среде [11]. Кроме того, высокие концентрации сахара положительно влияют на производство кислоты и увеличивает ее выход.

В России, а затем и в Советском Союзе работы по изучению физиологии и биохимии грибов и продукции ими органических кислот проводились в лабораториях В. С. Буткевича [12-16] г. Москва и С. П. Костычева [17, 18] (г. Ленинград). Буткевичем было сделано принципиально важное открытие. Он показал, что, меняя условия культивирования грибов, можно изменить их биохимическую активность и получить разные продукты. Так, при культивировании *A. niger* в присутствии CaCO_3 при рН среды, близком к 7,0, происходило преимущественное накопление глюконовой и щавелевой кислот, а в условиях высокой кислотности среды без CaCO_3 образуется практически одна ЛК. Этот факт, впоследствии подтвержденный С. П. Костычевым, оказался принципиально важным для организации промышленного производства лимонной и

глюконовой кислот не только в России, но и в других странах. Заслуга В. С. Буткевича состоит также в том, что он первый дал бесспорное доказательство образования ЛК из сахара [19].

В 1919 г. бельгийским микробиологом А. Carpuyns на предприятии «s.a. Les Produits Organiques de Tirlemont», (Бельгия) началось промышленное производство ЛК [20, 21]. В 1923 г. открыт завод компании «Pfizer» [22, 23]. Химик компании «Pfizer» Джеймс Кэрри и его ассистент Джаспер Кейн успешно наладили массовое производство ЛК, получаемой посредством ферментации сахара. Благодаря этому достижению, «Pfizer» получил полную независимость от европейских поставщиков цитрусовых. Вслед за этим изобретением Кейн разрабатывает новый способ глубокой ферментации. В качестве сырья начали использовать кормовую патоку, а не рафинированный сахар, как прежде. В 1933 г. открыт завод в Чехословакии. В 1935 г., благодаря работам Буткевича и Костычева, начал работу первый в СССР завод, производящий ЛК методом биохимического синтеза с помощью плесневых грибов *A. niger* из сахара [24].

На практике выбор технологии производства ЛК в подавляющем большинстве случаев обусловлен экономическими факторами. Наилучший из них на сегодняшний день – глубокая ферментация крахмала или сахарозы на основе питательной среды с использованием мицелиальных грибов *A. niger* [25-28], в связи с его высокой производительностью, при низком рН, без секреции токсичных побочных продуктов. Во многих странах широко исследуются и другие грибы, дрожжи, ведутся работы по улучшению микробных штаммов. Кроме того, исследуются различные сельскохозяйственные отходы, как потенциал для использования в качестве субстрата для производства ЛК за счет ферментации на твердом субстрате [29-31].

Применение лимонной кислоты. Большие объемы ЛК используются в производстве продуктов питания (70 %), фармацевтической и других отраслях промышленности. ЛК – самый используемый регулятор кислотности для пищевой промышленности, обладает более мягким вкусом по сравнению с другими пищевыми кислотами и не оказывает раздражающего действия

на слизистые оболочки дыхательного и пищеварительного тракта. Поэтому больше всего ЛК поступает на производство различных напитков – газированных, негазированных безалкогольных, тонизирующих, сухих напитков, холодных чаев. ЛК широко применяется в кондитерской и хлебопекарной отраслях, консервной промышленности, а также при производстве соусов, кетчупов, майонезов, плавленых сыров и замороженных продуктов. Как консервант, ЛК применяется для увеличения сроков хранения мяса, желе и пресервов [32]. Приблизительно 15-17 % производимой в мире ЛК используется при производстве моющих средств, в качестве замены полифосфатов и ее доля в этом секторе будет только возрастать. В косметической и фармацевтической промышленности – 7-9 % и еще 6-8 % поступает в другие отрасли: добыча нефти, животноводство, металлургия, строительство, производство красок, текстиля, фотографических реагентов, бетона, гипса, огнеупорных и форм, адгезивов, бумаги, полимеров, табака, утилизация отходов, активация минеральных удобрений и т. д. В животноводстве при заготовке сена и силоса использование органических кислот в качестве консерванта позволяет снизить потери питательных веществ в 3-5 раз и сохранить до 92-95 % исходной кормовой массы. Например, по сравнению с обычным силосом в 1 т корма, консервированного органическими кислотами, дополнительно сохраняется 30-40 кг корм. ед., 5-8 кг протеина, 10-15 кг сахара. На фермах и птицефабриках с помощью ЛК можно обеззараживать питьевую воду. При этом у животных и птицы улучшается усвояемость питательных веществ. Наблюдается комплексобразующий эффект (минералы держатся в растворе с кислотами и повышается резорбция Ca, Fe, Mg, Zn в организм [33, 34], способствуют повышению выхода яичной массы, снижаются затраты на корма [35]. После запрещения кормовых антибиотиков в Европе уделяется большое внимание альтернативным средствам, в частности органическим кислотам, которые наиболее эффективны для борьбы с микроорганизмами и грибами. ЛК принята во всем мире как GRAS (признана безопасной), утверждена Объединенным комитетом экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам [12, 13].

Исследования показывают потенциальное использование ЛК в биополимерах, для доставки лекарств, препаратах диализа крови, в тканевой инженерии для культивирования различных клеток, и для многих других перспективных биомедицинских работ [36-38]. ЛК производится путем ферментации в течение многих десятилетий. Все технологии отработаны. Тем не менее имеются возможности по их совершенствованию и улучшению.

Продуценты, используемые для получения лимонной кислоты.

Большое количество бактерий, грибов и дрожжей можно использовать для производства ЛК. Однако для коммерческого использования подходят не все из них. Это обусловлено предъявляемыми требованиями к микроорганизмам-продуцентам (табл. 1). Важнейшими из них должны быть:

- высокая скорость роста биомассы и высокий выход целевого продукта;
- максимальное усвоение питательных веществ из дешевых и доступных питательных сред;
- устойчивость к посторонней микрофлоре;
- безвредность для людей и окружающей среды [39].

Таблица 1

Микроорганизмы, используемые для производства лимонной кислоты [40-42].

Грибы	Дрожжи	Бактерии
<i>Aspergillus niger</i> .	<i>Saccharomicopsis lipolytica</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>A. aculeatus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Arthrobacter paraffinens</i>
<i>A. awamori</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>
<i>A. carbonarius</i>	<i>Candida lipolytica</i>	
<i>A. wentii</i>	<i>C. oleophila</i>	
<i>A. foetidus</i>	<i>C. guilliermondii</i>	
<i>Penicillium janthinelum</i>	<i>C. parapsilosis</i>	
	<i>C. citroformans</i>	
	<i>Hansenula anamola</i>	

На сегодня *A. niger* остается самым распространенным вы­бором для коммерческого производства ЛК, но используются и некоторые дрожжи, как *Saccharomycopsis SP.*

Селекция штаммов микроорганизмов. Один из спосо­бов увеличения производства ЛК – селекция штаммов-про­дукторов ЛК [43, 44]. Модифицированные микроорганизмы, об­ладая более высокой начальной скоростью роста и более ко­ротким циклом развития, при той же производительности спо­собны увеличить производство ЛК при тех же мощностях и со­кратить расходы на борьбу с заражением микрофлорой.

Самая используемая технология для повышения производ­ства ЛК – получение и использование мутагенов из родитель­ских штаммов-продуцентов ЛК. Среди мутантных штаммов, по­лученных физическими методами, часто используются штаммы, полученные с помощью УФ-облучения и радиации. УФ-облуче­ние вызывает димеризацию пиримидинов и является мутагеном широкого спектра действия. Использование этого мутагена при­водит к образованию мутантов с транзициями, трансверсиями и делециями. Эффективность УФ-облучения довольно высока, однако высокая частота мутаций достигается за счет низкой выживаемости клеток. Кроме того, такие мутанты хорошо вос­станавливаются репарационными механизмами клеток. 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 [45-54].

Перспективным является микробиологический способ на основе иммобилизованных ферментов. В качестве носителя ис­пользуют различные гели. Иммобилизованные клетки имеют в 2,4 раза более высокую скорость синтеза ЛК по сравнению с обычными клетками [44, 55-60].

Имеются и другие аспекты улучшения работы штаммов [61] – снижение сопротивления вредных составляющих сырья ферментации, возможность использования разного сырья (крах­мал, целлюлоза, пектин, отходы сельхозпереработки). В насто­ящее время нет эффективных методов для получения гиперму-

тантов для производства ЛК. В этой области многое сделано [62] и многое еще предстоит сделать.

Сырье для производства лимонной кислоты. В настоящее время для биосинтеза ЛК определены научные критерии выбора сырья:

- содержание необходимого количества углеводов в доступной для штаммов-продуцентов форме;

- определенное количество минеральных компонентов, необходимых для биосинтеза ЛК.

- дешевизна, доступность, принадлежность к категории возобновляемых.

- простота технологии подготовки к ферментации и утилизации отходов [63].

Основное сырье

Свекловичная меласса – один из самых распространенных и хорошо изученных видов сырья для получения ЛК [64, 65]. Однако ее применение связано со сложностью подготовки к ферментации из-за непостоянного состава, большого количества примесей и большой экологической нагрузкой на окружающую среду. Актуальной задачей является разработка новых методов подготовки свекловичных меласс к ферментации, улучшению ее качества и снижению отрицательного влияния на экологию [66].

Ценность мелассы в том, что с высоким содержанием сахара в ней содержатся все вещества, необходимые для нормальной жизнедеятельности продуцентов ЛК. Наибольший выход лимонной кислоты наблюдается при ее использовании. Меласса, используемая для производства ЛК, должна отвечать требованиям по физико-химическим и бактериологическим параметрам [67]. Кроме того, на сахарных заводах мелассу заготавливают в строго определенное время – с конца сентября по ноябрь. При заготовке в более поздние сроки меласса характеризуется пониженным выходом ЛК. Запас мелассы закладывается на срок до 15 мес. Данные параметры значительно влияют на экономику процесса получения ЛК.

Тростниковая меласса. Мелассы из различного сырья [68] давно и широко применяются для получения ЛК во многих странах [69]. Основная масса мелассы производится из сахарного тростника. Приблизительно 60 стран производят сахарный тростник. В зависимости от видов тростника, климата и различных технологий процесса состав мелассы может существенно изменяться [70]. Качество мелассы существенно варьируется, и не все типы подходят для производства ЛК [71]. В мелассе из сахарного тростника значительная доля ферментируемых углеводов приходится на свободноредуцирующие сахара, избыток которых в среде приводит не только к ускоренному развитию продуцента ЛК, но и к образованию ингибиторов процесса в результате взаимодействия их с другими компонентами мелассы, при термообработке.

Эти мелассы имеют в 2,2-3 раза по сравнению со свекловичной мелассой повышенную зольность, а по содержанию солей кремния, железа, магния, кальция, цинка, которые негативно влияют на синтез лимонной кислоты, они отличаются от свекловичной мелассы в 6-10 раз. Также в тростниковой мелассе меньше азотистых соединений, чем в свекловичной, а усвояемых фосфорных соединений в 3-8 раз больше, что создает неблагоприятные условия для биосинтеза ЛК. Технологические качества и химические параметры мелассы из сахарного тростника заметно изменяются в процессе хранения в худшую сторону. В целом технологические качества тростниковой мелассы ниже, чем у свекловичной [72].

Гидролизаты крахмала – данный вид сырья используется с древнейших времен для получения самых различных продуктов. Сведения о технологии, включающей плесневую ферментацию крахмалосодержащих продуктов – Коджи (Koji), известны в Китае и Японии несколько тысяч лет [73]. В Японии в процессе Коджи получают 20 % выпускаемой в стране ЛК. В мировой практике гидролизаты крахмала являются промышленно освоенным и экологически чистым углеводсодержащим сырьем для микробиологического синтеза. Картофельный, кукурузный, пшеничный, рисовый и другие виды крахмала, полученного в процессе ос-

новной переработки этих видов продуктов – дешевое, доступное, возобновляемое сырье [74]. Данный вид крахмала получают из побочных продуктов обработки зерна – например, из рисовых и пшеничных, ячменных отрубей [75]. Отруби – это вторичный продукт, образующийся при помоле зерна. Они состоят из частей зерна, удаляемых по специальной технологии для получения муки надлежащего качества. К ним относятся оболочка (семенная кожура), алейроновый слой (остаток живых клеток зерна), частицы зернового зародыша и эндосперма. Зерновая оболочка может использоваться как источник азота и культуральный сырьевой материал. Отруби могут использоваться в комбинации с другими источниками азота [76, 77]. Твердофазная ферментация, гидролизатов крахмала – самый простой способ для производства ЛК с использованием агропромышленных остатков [78-80]. К началу 2000-х гг. основные мощности по производству ЛК в мире были сосредоточены в крупнейших зерновых компаниях: Archer Daniels Midland Company (USA), Cargill, Inc. (USA), Jungbunzlauer AG (Switzerland), Tate & Lyle PLC (UK) [81], а также в фарминдустрии: Roche Zhongya (Wuxi) Citric Acid Co., Ltd. (Switzerland – China) [82].

За последние 15 лет в различных странах построено и модернизировано несколько заводов по производству ЛК: Gansu Xuejing's модернизирует производственные мощности; Tate & Lyle построен завод ЛК; BILT Chemicals построен завод ЛК (Вадодар); Jungbunzlauer построен завод ЛК (Канада); Shanxi Fenhe строит завод ЛК; Hoffmann and Wuxi построен завод ЛК; Shanxi построен завод ЛК; Cargill устанавливает производственный объект (Бразилия) [83].

Различные агропромышленные отходы, например, яблочные и виноградные выжимки, жом маниоки, лузга кофе, солома зерновых культур и т. д. исследованы на твердотельное брожение и способность быть использованными в качестве подложек для производства ЛК [84-95]. Эти отходы очень хорошо подходят для технологии твердотельной ферментации из-за высокого содержания в них целлюлозы и крахмала. Во всем мире активно продолжают исследования по разработке коммерчес-

ких процессов получения ЛК с использованием побочных про­дуктов и отходов аграрной промышленности [96, 97].

Способы производства лимонной кислоты

Глубинная ферментация. Процесс глубинной фермента­ции выбирают для промышленных операций из-за известных инженерных аспектов, таких, как моделирование ферментации, проектирование биореактора и управления технологическими процессами. Это процесс, в котором рост и анаэробные / час­тично анаэробное разложение углеводов микроорганизмами в жидкой среде происходит с большим количеством свободной воды [98, 99]. На сегодня около 90 % мирового производства ЛК получают путем глубинной ферментации (SMF) [100, 101]. Глубинная ферментация имеет ряд преимуществ по сравне­нию с твердофазной ферментацией: более высокая продуктив­ность, снижение затрат ручного труда, повышение контроля качества, ферментеры имеют систему перемешивания, осу­ществляется контроль и управление аэрацией, температурой сре­ды, снижается риск загрязнения. Глубинная ферментация мо­жет проводиться в разных вариантах: периодическом, с под­питкой и непрерывном [102-104].

При периодической ферментации с подпиткой увеличива­ется среднесуточный съем ЛК с 1 м³ ферментера за счет умень­шения частоты его зарядок при том же выходе кислоты по массе сахара. В процессе непрерывной ферментации *A. niger* изменя­ет морфологию и проявляет большую кислотообразующую спо­собность, чем в периодическом. Проведение ферментации в системе, состоящей из батареи ферментеров (пакетный режим) еще больше повышает выход ЛК, способствует меньшим поте­рям сырья. Пакетный режим чаще используется в мировой прак­тике производства ЛК.

Твердофазная ферментация (Коджи) предусматривает ис­пользование пропитанного средой пористого твердого матери­ала, такого, как отруби, багасса, картофель, пульпа сахарной свеклы и другие агропромышленные отходы [105]. Материал сте­рилизуют и вводят суспензию спор. Инкубирование проводится в лотках при 25-3 °С в течение 6-7 дней. После инкубирования

содержимое экстрагируют водой, концентрируют, цитрат осаждают и очищают. При соблюдении технологии крахмал отрубей осахаривается ферментами гриба, но добавление готовых амилаз к субстрату увеличивает выход ЛК. Загрязнение субстрата следовыми металлами является проблемой в процессе Коджи, так как их труднее удалять, чем в других вариантах процесса. Поэтому проводят селекцию и используют штаммы, устойчивые к следовым металлам. Часто к субстрату добавляют гексацаноферрат (HCF) или Cu^{+2} для нейтрализации и удаления ингибиторов ферментации [106].

Поверхностная ферментация (SSF) – метод для получения ЛК из агропромышленных отходов [84, 85, 107-109]. Производство ЛК с помощью SSF – простейший способ производства. Наиболее распространенным организмом, используемым в этом виде ферментации, является *A. niger*. Однако имеются отчеты о дрожжах [110, 111]. Одно из важных преимуществ процесса SSF – это то, что наличие микроэлементов не влияет на производство ЛК так вредно, как в SMF. Следовательно, предварительной обработки подложки не требуется. Основная ферментация осуществляется в специальных камерах, представляющих собой закрытые помещения, в которых на стеллажах расположены кюветы. Ферментационные камеры снабжены системой для подачи нагретого стерильного воздуха с эффективной циркуляцией, который проходит по поверхности, чтобы контролировать влажность и температуру с помощью испарительного охлаждения. Этот воздух фильтруется через бактериологический фильтр и камеры, которые всегда должны быть в асептических условиях, в основном в течение первых двух дней, когда споры прорастают. Во время ферментации, которая проходит 8-12 дней [112], производится большое количество тепла, поэтому необходимо проводить хорошую аэрацию для того, чтобы контролировать температуру и подачу воздуха к микроорганизмам. После ферментации содержимое лотка разделяется на жидкость и ковер мицелия, который промывают, чтобы удалить впитавшуюся ЛК [113].

Кюветы изготавливают из алюминия высокой чистоты, специальных классов стали или полиэтилена. Однако стальные лотки дают лучший выход ЛК [113, 114]. Заполнение кювет питательной средой и слив из них культуральной жидкости осуществляются через штуцеры в дне кювет. Перед началом нового цикла ферментации камеры и кюветы тщательно моют и стерилизуют. После стерилизации и охлаждения камер в кюветы наливают питательную среду слоем 12-18 см. С помощью специального устройства для распыления в питательную среду вносят посевной материал – конидии гриба *A. niger*. Через сутки после засева образуется тонкая серовато-белая пленка мицелия, которая по истечении 3-х суток сильно утолщается и приобретает складчатую структуру. Температура и аэрация поддерживаются по технологическим нормам. По мере снижения интенсивности кислотообразования и уменьшения количества выделяемой теплоты подачу воздуха в камеру постепенно уменьшают. Процесс ферментации прекращают, когда в растворе остается 1-2 % сахаров, а содержание кислот в культуральной жидкости достигает 12-20 %. Культуральная жидкость поступает в химический цех для выделения ЛК. Мицелий отмывают от кислоты горячей водой и используют как корм для скота. Способ называется бессменным.

По сменному способу после сливания культуральной жидкости под пленку *A. niger* вводят немного воды температурой 30-32 °С, выдерживают 0,5 ч, промывную жидкость сливают, вводят свежую мелассную среду и ферментируют. Способ промышленного получения ЛК путем сбраживания сахаристых веществ при помощи гриба *A. niger* на сменных растворах разработал С. П. Костычев с сотрудниками [115].

По доливному способу ферментации на 4-5 сут. под пленку *A. niger* доливают свежую питательную среду в количестве, компенсирующем уменьшение объема из-за испарения влаги. При работе этими способами экономится расход конидий, реже перезаряжаются камеры и появляется возможность ферментировать низкокачественные мелассы, непригодные для выращивания грибной пленки.

Периодические способы имеют ряд недостатков: ферментация происходит с небольшой скоростью; мицелий по окончании цикла выбрасывают, хотя он еще активен, а получение нового мицелия связано с затратой конидий, мелассы и времени на его выращивание; во всех кюветах трудно поддерживать заданную температуру, поэтому ферментация происходит неравномерно.

Непрерывный способ предусматривает протекание меласной среды по каскаду кювет под предварительно выращенной пленкой мицелия *A. niger* или под его секциями, движущимися на транспортере в одном направлении со средой в плоском ферментере туннельного типа.

Первоначально поверхностная ферментация применялась для крупномасштабного микробиологического производства ЛК с использованием в основном гифомицетов. Поверхностная ферментация используется в производстве малого и среднего масштаба, при существенно меньших затратах в работе, установке оборудования и потребления энергии.

Сравнение глубинного и поверхностного способа ферментации

Сравнение между ТФФ и ЖФФ [116].

Преимущества ТФФ перед ЖФФ

1. Стоимость оборудования в 1,3-1,5 раза меньше и большая часть его изготавливается на месте.
2. Оборудование изнашивается меньше.
3. Низкое содержание воды уменьшает возможности контаминации бактериями и дрожжами.
4. Условия подобны естественной среде обитания для грибов, которые составляют основную группу микроорганизмов, используемых для ТФФ.
5. Более высокий уровень аэрации, особенно необходимый в процессах с интенсивным окислительным метаболизмом.
6. Инокуляция вместе со спорами облегчает однородное рассеивание в среде.
7. Твердые субстраты обычно дают все питательные вещества, необходимые для роста колонии.

8. Обогащенные субстраты позволяют использовать более простые и дешевые конструкции биореакторов.

9. Затраты на электроэнергию в несколько раз ниже – в некоторых случаях отсутствует потребность в автоклавировании, обработке паром, механическом перемешивании и аэрации.

10. В силу высокой концентрации продукта необходимость в специальных растворителях снижена.

11. Низкий уровень влажности может положительно сказаться на производстве определенных продуктов, которые не могут быть культивированы в условиях ЖФФ.

12. Себестоимость лимонной кислоты несколько ниже.

13. Выше концентрация лимонной кислоты в культуральной жидкости.

14. Значительно меньше образуется побочных кислот, вследствие чего затрачивается меньше сырья при ферментации и меньше потери при химической переработке культуральных жидкостей.

15. Процесс менее чувствителен к перерывам в аэрации.

16. Обслуживание и контроль процесса ферментации просты.

Недостатки ТФФ при сравнении с ЖФФ:

1. При одинаковой мощности заводов капитальные затраты на строительство зданий ферментационных цехов примерно в 2 раза больше.

2. Общие единовременные затраты на здания и оборудование на 20-30 % выше.

3. Могут использоваться только микроорганизмы, которые способны расти при низком уровне влажности.

4. Субстраты требуют дополнительной обработки (гомогенизация, химический или ферментативный гидролиз).

5. Затруднен анализ параметров биомассы (влажность, рН, массообмен, теплообмен).

6. Возникают трудности в контроле параметров процесса (рН фактор, влагосодержания и концентрация субстрата, кислоты и биомассы).

7. Много важных научных и технических аспектов очень слабо изучены. Информация о проектировании и работе реакторов в крупном масштабе недостаточна.

8. Возможность контаминации нежелательными грибами.

9. Затруднения в отводе метаболической температуры, произведенной во время роста.

10. Экстракты, содержащие продукты, полученные ТФФ, часто являются вязкими.

11. Массопередача ограничена распространением колонии.

12. В некоторых ТФФ аэрация может быть затруднена из-за высокой концентрации твердых частиц.

13. Время культивирования увеличено в связи с потребностью спор в прорастании.

14. Время культивирования более длительно, чем в ЖФФ.

15. В условиях жаркого климата необходимо охлаждение воздуха для подачи в камеру.

Значительная часть выявленных недостатков ТФФ по сравнению с ЖФФ может быть снята при использовании результатов глубокого изучения твердофазной ферментации. Некоторые исследователи утверждают, что ТФФ эффективнее и экономичнее, чем ЖФФ в производстве широкого спектра биопродуктов (корма, ферменты, органические кислоты, биопульпа, ароматизаторы, антибиотики, компост, биопестициды и т. д.). Результаты проведенных экспериментов убедительно показывают, что качество продуктов, полученных ТФФ, в ряде случаев значительно выше, чем качество продуктов, полученных жидкофазным способом [116, 117]. Выбор технологии связан с доступностью сырья, требованием к качеству лимонной кислоты, инфраструктурными, климатическими условиями реализации производства и определяется экономической целесообразностью.

Факторы, влияющие на производство лимонной кислоты

По нашему мнению, на сегодняшний день наиболее полно, факторы, влияющие на производство ЛК, рассмотрены в труде А. Апельблата «Лимонная кислота» [118]. Укажем наиболее значимые из них.

- Температура определяет возможность существования и интенсивность развития микроорганизмов. Наилучший выход при биосинтезе ЛК наблюдается в пределах температурного диапазона от 28-32 °С. Более низкая температура приводит к торможению роста продуцента, снижается выход ЛК, а более высокая – к торможению активности фермента, его денатурации [5, 120].

- рН – важный фактор, определяющий возможность существования продуцентов. Влияние ионов водорода на микроорганизмы может быть как прямым, так и косвенным. Последнее связано с воздействием ионов водорода не на бактерии, а на определенные компоненты среды, доступность многих неорганических ионов и метаболитов, стабильность макромолекул, равновесие электрических зарядов на поверхности клетки. Реакция среды оказывает влияние на образование и активность микробных ферментов. В ходе биосинтеза ЛК реакция среды меняется в сторону подкисления. Поддержание значения рН от 1,7-8 среды на нужном уровне в зависимости от сырья и технологии получения может повысить выход ЛК, улучшить ее качество [22, 121, 122].

Сырье для биотехнологического производства обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие биообъекта, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемыми составляющими питательной среды являются вода, питательные вещества, которые образуют истинные растворы (минеральные соли, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и т. д.) и коллоидные растворы (белки, липиды, неорганические соединения – гидроксид железа). Вода должна отвечать требованиям ГОСТа (чистая, бесцветная, без привкуса, запаха и осадка). Отдельные компоненты могут находиться в твердом агрегатном состоянии, могут всплывать, равномерно распределяться по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный слой.

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, т. е. включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки – мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т. д. В состав любой питательной среды входят такие компо-

ненты, как вода, соединения углерода, азота, фосфора и других минеральных веществ, витамины.

Легкодоступными считаются сахара: глюкоза, сахароза, лактоза, затем многоатомные спирты: глицерин, маннит и др. Далее следуют полисахариды: целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, которые могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно- и низкомолекулярные олигосахариды, либо микроорганизмы должны иметь набор ферментов, гидролизующих эти вещества. Такими микроорганизмами являются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus* и др. На практике встречается большое количество микроорганизмов, которые успешно утилизируют органические кислоты, особенно в анаэробных условиях. Низкомолекулярные спирты: метанол и этанол относятся к числу перспективных видов сырья. Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula* и др. способны ассимилировать этанол. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida* и др., бактерии рода *Flavobacterium* используют в качестве единственного источника углерода метанол. Отдельные виды микроорганизмов (незначительная часть) используют в качестве источника углерода и энергии углеводороды: n-алканы и некоторые фракции нефти.

Азот может содержаться в форме неорганических солей или кислот. Большинство дрожжей хорошо усваивают аммиачные соли, а также аммиак из водного раствора. Потребность в нитратах испытывают только некоторые виды дрожжей. Источником азота могут служить и органические соединения: аминокислоты, мочевины и т. д., которые легко усваиваются микроорганизмами. Известно, что бактерии более требовательны к источникам азота, чем другие микроорганизмы (грибы, актиномицеты и дрожжи).

Фосфор является важнейшим компонентом клетки. Он входит в состав АТФ (аденозинтрифосфат), АДФ (аденозиндифосфат), АМФ (аденозинмонофосфат) обеспечивая нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также синтез белков, нуклеиновых кислот и другие процессы биосинтеза. Фосфор вносят в среду в виде солей фосфорной кислоты.

Потребность микроорганизмов в витаминах и микроэлементах различна, тем не менее практически все микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов. Эффективной добавкой к питательным средам оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легкоассимилируемых формах.

В рецептуры сред включают также дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, сок картофеля, молочную сыворотку, экстракт солодовых ростков и другие продукты [123, 124], микроэлементы (сера, калий, кальций). Определенное влияние оказывают ионы меди, цинка, железа и марганца. Последний в концентрации 3 мг/л сильно снижает выход ЛК. При недостатке цинка и марганца пленка гриба становится гладкой, слизистой и погружается в раствор. Добавление цинка приводит к увеличению плавучести пленки, ее утолщению и появлению характерной морщинистости. Мицелий выросший в среде с цинком, продуцирует больше ЛК, чем в среде, лишенной его. Содержание цинка поддерживают на уровне $1,5 \cdot 10^{-4}$ % (в расчете на $ZnSO_4$). Железо входит в состав каталазы, пероксидазы, цитохрома, цитохромоксидазы, цитохромпероксидазы, флавопротеидов, активирует ряд других ферментов. При высоком содержании железа в среде тормозится биосинтез ЛК и возрастает интенсивность образования щавелевой кислоты.

При составлении питательной среды для конкретного вида микроорганизма подбираются наиболее подходящие источники углерода, азота, фосфора и других веществ [125].

Аэрация имеет критическое значение для глубинной ферментации [126]. Пропускание чистого O_2 увеличивает образование лимонной кислоты, но это дорого; газовая фаза может циркулировать, если при этом поглощается CO_2 . Прерывание аэрации на короткое время может иметь губительное действие на продукцию ЛК, но если при этом повысить рН с 3,0 до 4,0, то ферментация может начаться снова.

У грибов различают трофофазу, которая характеризуется ростом мицелия и активным дыханием с выделением CO_2 , и идиофазу (продукционную фазу), когда рост завершен, дыхание по-

давлено, а оставшаяся глюкоза перерабатывается во вторичные метаболиты: в данном случае в лимонную или другие кислоты.

Выделение и очистка лимонной кислоты.

Получение товарного продукта включает следующие операции: получение цитрата кальция; разложение цитрата кальция; очистка и выпаривание раствора ЛК; кристаллизация ЛК; сушка и упаковка продукта. Все эти производственные процессы хорошо и давно изучены и широко применяются на производстве. Тем не менее они постоянно совершенствуются с целью снижения затрат и увеличения извлечения ЛК [127-134].

Перспективы получения лимонной кислоты в Казахстане

Объем казахстанского рынка ЛК достигает 3-3,5 тыс. т в год. Производство ЛК отсутствует в Казахстане и вся она импортируется. Казахстан обладает богатым потенциалом сырья для производства ЛК [135]. В частности, отрубями, получаемыми в процессе переработки зерна на муку [136, 137], а также 5 природными изолятами *A. niger*, которые проявили высокую активность на продукцию ЛК [138]. В республике производится до 1,5 млн. т отрубей. Крахмала, содержащегося в 1 % этих отрубей, достаточно для производства и полного обеспечения Казахстана ЛК [139, 140]. Кроме того, учитывая спрос в республиках Средней Азии и Закавказья, которые также не производят ЛК, Россию, импортирующую порядка 30 тыс. т ЛК в год, можно утверждать, что ЛК при конкурентной цене будет иметь хороший сбыт и в этих регионах. Перспективно производство солей ЛК [133].

Главная и наиболее важная сельхозкультура Казахстана – пшеница. Из трех направлений увеличения рынка зерна: питание и корма, экспорт, переработка зерна – переработка имеет наибольшую перспективу роста. Глубокая переработка зерна позволяет получить более высокую добавочную стоимость, это инновационный путь, который способствует развитию биотехнологического производства и агропромышленного комплекса Казахстана, расширяет диапазон получаемых ценных продуктов из зерновых, одновременно ведет к росту производства в некоторых смежных отраслях промышленности: пищевой, фарма-

цветической, машиностроении, металлургии, строительстве, нефтехимии и др.

Список литературы

- 1 Kirk-Othmer Encyclopedia, 3 ed., Vol. 6, N.Y., 1979. – P. 79-150.
- 2 Sanchez-Riera F. Encyclopedia of Life Support Systems. BIOTECHNOLOGY – Vol. 5. – Production of Organic Acids. – 189 p.
- 3 Шульце Т. Промышленные биотехнологии // Возможности для промышленности переработки зерна. – М.: Graintek, 2011. – 26 с.
- 4 Roger G. Harrison, Paul W. Todd, Scott R. Rudge, and Demetri P. Petrides. Bioseparations science and engineering. Oxford University Press, 2015. – 472 p.
- 5 Finogenova, T.V., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., & Chernyavskaya O.G. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2005. – 41. – P. 418-425.
- 6 Franciello V., Patricia M., & Fernanda S.A. Apple pomace: A versatile substrate for biotechnological applications // Critical Reviews in Biotechnology. – 2008. – 28. – P. 1-12.
- 7 Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology // th Edition. Vol 6, N. Y., 2001. – 185 p.
- 8 Wehmer C. Beitr. zur Kenntnis einheimischer Pilze. – Hannover. – 1893. – No. 1.
- 9 James N. Currie. The citric acid fermentation of *aspergillus niger* // J. Biol. Chem. – 1917. – 31. – P. 15-37.
- 10 Doelger W.P., Prescott S.C. Citric acid fermentation. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass. Industrial and engineering chemistry. – 1934. – Vol. 26, No. 11. – 1142 p.
- 11 Bob Corrigan. *Aspergillus niger*. Encyclopedia of Life.
- 12 Буткович В.С. Umwandlung der Eiweißstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung // Jahrb. f. wiss. Botanik. – 1902. – 38 p.

13 *Буткевич В.С.* Das Ammoniak als Umwandlungsprodukt stickstoffhaltiger Stoffe in höheren Pflanzen // *Biochemische Zeitschrift*. – 1909. – № 12. – P. 12.

14 *Буткевич В.С.* Современное положение вопроса об использовании азота воздуха в сельскохозяйственных целях. – М., 1909. – 12 с.

15 *Буткевич В.С.* Кислоты как промежуточный член окислительного превращения сахара грибами // *Научно-агрономический журнал*. – 1925. – № 9.

16 *Буткевич В.С.* К вопросу о биохимическом происхождении растительных кислот // *Микробиология*. – 1932. – Т. 1, вып. 1-2.

17 *Костычев С.П.* Über Atmungsenzyme der Schimmelpilze // *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. – 1904. – Vol. 22, Iss. 4. – P. 207-215.

18 *Костычев С.П.* Zur Frage der Wasserstoffbildung bei der Atmung der Pilze // *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. – 1907. – Vol. 25, Issue 4. – P. 178-188.

19 *Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Блохина И.Н.* и др. Промышленная микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. – 499 с.

20 *Grégoire L.* Hennebert. The 100 years of the fungus collection. mucl. 1894-1994. Catholic University of Louvain, Belgium, 2010. – 22 p.

21 *Richard K. Robinson.* Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press; 2 edition, 2014.

22 *Anastassiadis S.G., Morgunov I.G., Kamzolova S., Finogenova T.V.* Citric acid production patent review. Recent patents on biotechnology 02/2008; 2(2):107-23.

23 *Gopal K. Chotani, Timothy C. Dodge, Alfred L. Gaertner and Michael V. Arbige.* Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology, Volumes 1 & 2 (11th Edition) Edited by: Kent, James A. 2007. Springer – Verlag. – 1311 p.

24 *Аркадьева З.А., Безбородов А.М., Блохина И.Н.* и др. Промышленная микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. – 500 с.

25 *Jianlong W.* Enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* using n-dodecane as an oxygen-vector // *Process Biochemistry*. – 2000. – № 35. – P. 1079-1083.

26 *Vandenbergh L.P.S.* Development of process for citric acid production by solid-state fermentation using cassava agro-industrial residues. PhD thesis, Universite de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 2000. – 205 p.

27 *Lesniak W., Pietkiewicz J., & Podgorski W.* Citric acid fermentation from starch and dextrose syrups by a trace metal resistant mutant of *Aspergillus niger* // *Biotechnological Letters*. – 2002. – № 24. – P. 1065-1067.

28 *Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., & Van Dijck P.W.M.* On the safety of *Aspergillus niger* – A review // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – № 59. – P. 426-435.

29 *Medeiros A.B.P., Pandey A., Renato J.S.F., Christen P. & Socol C.R.* Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveomyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology // *Biochemical Engineering Journal*. – 2000. – № 6. – P. 33-39.

30 *Singhania R.R., Patel A.K., Socol C.R. & Pandey A.* Recent advances in solid-state fermentation // *Biochemical Engineering Journal*. – 2009. – № 44. – P. 13-18.

31 *Kuforiji O.O., Kuboye A.O. & Odunfa S.A.* Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production // *International Journal of Plant Biology*. – 2010. – № 7. – 4 p.

32 *Смирнов В.А.* Пищевые кислоты (Лимонная, молочная, винная) // *Лёгкая пищевая промышленность*. – М., 1983. – 264 с.

33 *Jongbloed A.W., Jongbloed R.* The Effect of Organic Acids in Diets for Growing Pigs on Enhancement of Microbial Phytase Efficacy. ID-DLO Report no. 96009. Lelystad, 1996. The Netherlands: Insitute for Animal Science and Health.

34 *Kirchgessner & Roth.* Digestibility and balance of protein, energy and some minerals in diets for piglets supplemented with fumaric acid. // *Z. Tierphysiol. Tierernaehr und Futtermittelkd.* – 1980. – 44 – 239 p.

35 Тюркина О.В. Влияние разных антиоксидантов на обмен веществ и продуктивность кур-несушек: автореф. дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. – М., 2009. – 145 с.

36 Robin N., Larry M., John F., Jim S., Jerry M. An investigation of the chemistry of citric acid in military soldering applications // Naval Air Warfare-Center Weapons Div China Lake CA, 1995. – Report no. A240592.

37 Ashkan T.N., Adeli M., Vossoughi M. Poly(citric acid)-blockpoly(ethylene glycol) copolymers – New candidates for nanomedicine. Nanomedicine: Nanotechnology // Biology, and Medicine. – 2010. – Vol 6. – I.4. – P. 556-562.

38 Guillermo A., Jian Y. and Ryan H. New biodegradable biocompatible citric acid nano polymers for cell culture growth & implantation engineered by Northwestern University Scientists. Nano patents and innovations / US Patent Application 20090325859. – 2010.

39 Гореликова Г.А. Основы современной пищевой биотехнологии: учеб. пособие. – Кемерово, 2004. – 102 с.

40 Luciana P.S. Vandenberghe, Carlos R. Soccol, Ashok Pandey and Jean-Michel Lebeault. Microbial Production of Citric Acid. REVIEW // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 1999. – Vol. 42, no. 3.

41 Арзуманов Е.Н., Арзуманов Т.Е., Агаджанян А.Е., Камзолова С.В., Мельников В.А., Мовсесян Р.А., Сальникова И.В., Самойленко В.А., Финогенова Т.В., Шишканова Н.В., Хачанов Д.Г. Штамм дрожжей *yarrowia lipolytica* – продуцент лимонной кислоты, способ получения лимонной кислоты и способ выделения цитрата натрия. Патент RU № 2090611, 1997.

42 Фатыхова А.Р. Биосинтез лимонной кислоты дрожжами *Yarrowia lipolytica* из глицерин-содержащих отходов производства биодизельного топлива: автореф. дис. канд. биолог. наук. – Пушино, 2011. – 22 с.

43 Masayuki Machida and Katsuya Gomi. *Aspergillus* // Molecular Biology and Genomics. Caister Academic Press, 2010. – P. 6-7.

44 Храмцова Е.А., Максимова Н.П. Селекция продуцентов: курс лекций. – Минск: БГУ, 2011. – 132 с.

45 Имшенецкий А.А., Щербакова Е.Я. О корреляции, существующей между морфологическими и физиологическими изменениями у мутантов *Aspergillus niger* // Микробиология. – 1964. – 31. – вып. 2. – С. 252-256.

46 *T Suzuki, H Fukuda, Y Sumino, S Akiyama*. Способ получения лимонной кислоты. Патент US3801455 A, 1974.

47 Федосеев В.Ф., Луриньш А.А., Берзиня В.Я., Азанда В.К., Карклиньш Р.Я., Румба А.А. А.с. SU 568677, 1977.

48 *Bonatelli Jr.R. and Azevedo J.L.* (1983) Improved reproducibility of citric acid production in *Aspergillus niger* // *Biotechnol. Lett.*, 4. – P. 761-766.

49 *Gunde-Cimerman N., Cimerman A., Perdhi A.* *Aspergillus niger* mutants for bioconversion of apple distillery wastes // *Enzyme Microb. Technol.* – 1986. – 8.– P. 166-170.

50 *Islam M.S., Begum R. and Choudhury N.* Semipilot scale production of citric acid in cane molasses by gamma ray induced mutant of *Aspergillus niger* // *Enzyme Microb. Technol.* – 1986. – 8. – P. 461-471.

51 *Pelechova J., Petrova L., Ujцова E. and Martinkova L.* Selection of a hyperproducing strain of *Aspergillus niger* for biosynthesis of citric acid on unusual carbon substrates // *Folia Microbiol.* – 1990. – 35. – P. 138-142.

52 Щербакова Е.Я., Никифорова Т.А., Галкин А.В., Жданова В.Н., Мушникова Л.Н. Штамм гриба *aspergillus niger* – продуцент лимонной кислоты. патент RU 2089615, 1997.

53 Щербакова Е.Я., Никифорова Т.А., Львова Е.Б., Степанова А.М. Способ отбора штамма гриба *aspergillus niger*. Патент RU 2198926, 2000.

54 *Abdullah-Al-Mahin, A.B.M. Sharifuzzaman M.O. Faruk M.A. Kader J. Alam R. Begum and Ha-run-Or-Rashid.* Improved Citric Acid Production by Radiation Mutant *Aspergillus niger* Using Sugarcane Bagasse Extract // *Biotechnology.* – 2012. – Vol. 11, Iss.: 1. – P. 44-49.

55 Егоров Н.С. Промышленная микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. – 688 с.

56 Bayraktar E., Mehmetoglu U. Production of citric acid using immobilized conidia of *Aspergillus niger* // Appl Biochem Biotechnol. – 2000. May; 87(2). – P. 117-25.

57 Pramod T. and Lingappa K. Immobilization of *Aspergillus niger* in Hen Egg White for the production of Citric acid using carob pod extract. Journal of Microbiology and Biotechnology Research. – 2012. – 2 (2). – P. 265-269.

58 Marzena Blumhoff. Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades an der Universität für Bodenkultur // Genetic engineering of *Aspergillus niger* for organic acid production. Wien, 2013.

59 Никифорова Т.А., Комов В.П., Выборнова Т.В., Пиотровский Л.Б., Думпис М.А., Литасова Е.В. Способ получения лимонной кислоты. Патент № 2428481, 2011.

60 Yasser S. Mostafa, Saad A. Alamri. Optimization of date syrup for enhancement of the production of citric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger* // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2012. – Vol. 19, Iss. 2. – P. 241-246.

61 Авчиева П.Б., Винаров А.Ю., Козлова И.А., Яшина В.Н., Первушина М.С. Способ получения посевного материала для производства лимонной кислоты: А.с. РФ № 2092557, 1997.

62 Bauweleers Hugo Marc Karel, Groeseneken Dominique Robert, Peij Van Noël Nicolaas Maria Elisabeth. Genes useful for the industrial production of citric acid. EP 1 954 712 B1.

63 Никифорова Т.А. Теоретические и практические аспекты микробиологического производства лимонной кислоты: автореф. дис. уч. ст. док. техн. наук. – СПб., 1999.

64 Philipp Gerhardt, W.W. Dorrell, and I.L. Baldwin. Citric Acid Fermentation of Beet Molasses // J Bacteriol. – 1946. – Nov. 52(5). – P. 555-564.

65 A.Philip Draycott. Sugar Beet. Blackwell Publishing, 2006. – 515 p.

66 Осипов М.Ф., Дерканосов Н.И. Способ подготовки мелассы. Патент SU № 185820, 1966.

67 Авчиева П.Б., Винаров А.Ю., Пономарева Т.А., Козлова И.А. Способ подготовки мелассы к ферментации при производстве лимонной кислоты. Патент RU № 2084529. 1997.

68 *Leo V. Curtin*. MOLASSES – GENERAL CONSIDERATIONS. National Feed Ingredients Association. West Des Moines, Iowa. 1983.

69 *Masoud Yadegary, Adel Hamidi, Seyed Abolhasan Alavi, Ebrahim Khodaverdi, Hamid Yahaghi, Sara Sattari, Ghasem Bagherpour, and Emad Yahaghi*. Citric Acid Production From Sugarcane Bagasse through Solid State Fermentation Method Using *Aspergillus niger* Mold and Optimization of Citric Acid Production by Taguchi Method // *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2013.

70 *Rena Perez*. Molasses. Habana, Cuba. First FAO electronic conference on tropical feeds and feeding systems, 1995. – P. 233-239.

71 *Carlos R. Soccol, Luciana P.S. Vandenberghe, Cristine Rodrigues and Ashok Pandey*. New Perspectives for Citric Acid Production and Application // *Food Technol. Biotechnol.* 2006. – 44 (2). – P. 141-149.

72 *Никифорова Т.А., Мушникова Л.Н., Галкин А.В.* Тростниковая меласса – сырье для производства пищевой лимонной кислоты // *Хранение и переработка сельхозсырья*. – 1996. – № 2. – С. 30-31.

73 History of Koji – Grains And/or Soybeans Enrobed with a Mold Culture. William Shurtleff & Akiko Aoyagi. Soyinfo Center, 2012.

74 *Трезубов Н.Н., Жарова Е.Я., Жушман А.И., Сидорова Е.К.* Технология крахмала и крахмалопродуктов. – М.: «Легкая и пищевая промышленность», 1981. – С. 323-327.

75 *Гулюка Н.Г.* Крахмал и крахмалопродукты. – М.: Агропромиздат, 1985. – 178 с.

76 *Сугимото Тосиказу (JP), Содзи Хиросу (JP)*. Способ получения жидкого коджи. Патент RU 2409659. 2009.

77 *Marie-Helene Saniez*. Method for producing citric acid. Patent US 5928911 A, 1999.

78 *Medeiros A.B.P., Pandey A., Renato J.S.F., Christen P. & Soccol C.R.* Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveomyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology // *Biochemical Engineering Journal*. – 2000. – № 6. – P. 33-39.

79 *Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R. & Pandey A.* Recent advances in solid-state fermentation // *Biochemical Engineering Journal*. – 2009. – № 44. – P. 13-18.

80 *Kuforiji, O.O., Kuboye, A.O., & Odunfa, S.A.* Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production // *International Journal of Plant Biology.* – 2010. – № 7. – P. 4.

81 *Magnuson, J.K. and Lasure, L.L.:* Organic acid production by filamentous fungi. In *Tkacz, J.S. and Lange, L. (eds.) Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine.* Kluwer Academic. Plenum Publishers, 2004. 30. – P. 307-340 .

82 *Asia Pacific Biotech News.* – 2002. – Vol. 6, No. 11.

83 *Chemicals & Petrochemicals. Citric Acid. Market report.* Report information, 2006.

84 *Pandey A. and Soccol C.R.,* Bioconversion of biomass: A case study of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation // *Brazilian Arch. Biol. Technol.* – 1998. – 41. – P. 379-390.

85 *Pandey A., Soccol C.R., Nigam P. and Soccol V.T.,* Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse // *Bioresource Technology.* – 2000. – 74. – P. 69-80.

86 *Vandenbergh L.P.S., Soccol C.R., Pandey A. and Lebeault J.-M.* Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido com *Aspergillus niger* LPB 21 à partir do bagaço de mandioca. VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, May 13-15, Rafaela, Santa Fé, Argentina. 1999.

87 *Vandenbergh L.P.S., Pandey A., Soccol C.R., and Lebeault J.-M.* Citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation on coffee husk. III Internatl Sem Biotechnol Coffee Agroindustry, May 26-29, Londrina, Brazil. 1999.

88 *Vandenbergh L.P.S., Soccol C.R. Pandey A. and Lebeault J.-M.* Solid-state fermentation for synthesis of citric acid by *Aspergillus niger* // *Bioresource Technology.* – 2000. – Vol. 74, Iss. 2. – P. 175-178.

89 *Hang Y.D., Woodams E.E.* Solid state fermentation of apple pomace for citric acid production // *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology.* – 1986. – Vol. 2. – Iss. 2. – P. 283-287.

90 Angumeenal A.R., Venkappayya D. An overview of citric acid production // *Food Science and Technology*. – 2013. – 50. – P. 367-370.

91 Prado F.C., Vandenberghe L.P.S., Woiciechowski A.L., Rodrigues-León J.A. and Soccol C.R. Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. – 2005. – Vol. 22, No. 04. – P. 547-555.

92 Joshi V.K., Attri Devender . Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products // *Natural Product Radiance*. – 2006. – Vol. 5(4). – P. 289-296.

93 Hailemariam feleke. small-scale citric acid production on solid-state fermentation using *aspergillus niger*. Addis ababa university, 2010.

94 Dhillon G.S., Brar S.K., Verma M. and Tyagi R.D. Enhanced solid-state citric acid bio-production using apple pomace waste through surface response methodology // *Journal of Applied Microbiology*. – 2011. – Vol. 110, Iss. 4. – P. 1045-1055,

95 Hossam S. Hamdy. Citric acid production by *Aspergillus niger* grown on orange peel medium fortified with cane molasses // *Ann Microbiol*. – 2013. – 63. – P. 267-278.

96 Karthikeyan A., Florida A&M University. Sivakumar N., Department of Biotechnology, Alagappa University, Karaikudi, India. Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate, 2010.

97 Varsha g shetty. production and optimization of citric acid by *aspergillus niger* using molasses and corncob // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2015. – Vol 7, Iss. 5. – P. 152-157.

98 Ray R.C. and Ward O.P. *Microbial Biotechnology in Horticulture*. Science Publishers // New Hampshire. – 2006. – Vol. 1. – 596 p.

99 Мушникова Л.Н., Никифорова Т.А., Галкин А.В., Туник Н.А., Позднякова Т.А. Способ получения лимонной кислоты. Патент РФ № 2084530, 1997.

100 Vandenberghe L.P.S. Development of process for citric acid production by solid-state fermentation using cassava agro-industrial

residues. PhD thesis // Universite de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, 2000. – 205 p.

101 *Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S.* Overview of applied solid-state fermentation in Brazil // *Bio-chem. Eng. J.* – 2003. – № 13. – P. 205-218.

102 *Авчиева П.Б., Винаров А.Ю.* Способ получения лимонной кислоты в непрерывном режиме патент РФ № 2076906. 1997.

103 *Wieczorek S., Brauer H.* Continuous production of citric acid with recirculation of the fermentation broth after product recovery // *Bioprocess Engineering.* – 1998. – 18. – P. 1-5.

104 *Винаров А.Ю., Сидоренко Т.Е., Сметанина С.Е.* Способ направленного биосинтеза лимонной кислоты. Патент РФ 2095416, 2009.

105 *Fumio Noda, Kazuya Hayashi, Keitaro Mogi, Takashi Iwaasa, Takeji Mizunuma, Toshio Sakasai.* Process for producing solid koji. Patent US 4329370 A, 1979.

106 *Belén Max, José Manuel Salgado, Noelia Rodríguez, Sandra Cortés, Attilio Converti, José Manuel Domínguez.* Biotechnological production of citric acid. REVIEW // *Braz. J. Microbiol.* – 2010. – Vol. 41, no. 4. São Paulo.

107 *Pandey A.* Aspects of fermenter design for solid-state fermentation // *Process Biochem.* – 1991. – 26. – P. 355-361.

108 *Pandey A.* Recent Process Developments in Solid State fermentation // *Process Biochemistry.* – 1992. – 27. – P. 109-117.

109 *Pandey A.* Solid state fermentation: An overview. In – *Solid State Fermentation.* Ed. A. Pandey, Wiley Eastern Publishers // New Delhi. – 1994. – P. 3-10.

110 *Maddox I.S. and P.J. Kingston.* Use of immobilized cells of yeast, *Saccharomyces lipolytica*, for the production of citric acid // *Biotechnol. Lett.* – 1983. – 5. – P. 795-798.

111 *Tisnadajaja D., Gutierrez N.A., Maddox I.S.* Citric acid production in a bubble-column reactor using cells of the yeast *Candida guilliermondii* immobilized by adsorption onto sawdust // *Enzyme Microb. Technol.* – 1996. – 19. – P. 343-347.

112 *Pandey A., Soccol C.R., Rodriguez-Leon J.A., Nigam.* Production of organic acids by solid-state fermentation. In: *Solid-State*

Fermentation in Biotechnology – Fundamentals and Applications, Asiatech Publishers Inc., New Delhi, 2001. – P. 113-126.

113 *Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C. & Pandey A.* New perspectives for citric acid production and application // Food Technology and Biotechnology. – 2006. – 44. – P. 141-149.

114 *Grewal H.S., Kalra K.L.* Fungal production of citric acid // Biotechnol. Adv. – 1995. – 13(2). – P. 209-234.

115 *Сотников Е.И.* Получение лимонной кислоты: А. с. изобретения SU 43649. 1934.

116 *Смирнов К.А., Алашкевич Ю.Д., Решетова Н.С.* Особенности твердофазной ферментации // Химия растительного сырья. – 2009. – № 3. – С. 161-164.

117 *Ehsan Darouneh, Abolhasan Alavi, Manouchehr Vosoughi, Mahdi Arjmand, Aliakbar Seifkordi and Rouhollah Rajabi* Citric acid production: Surface culture versus submerged culture // African Journal of Microbiology Research. – 2009. – Vol. 3(9). – P. 541-545.

118 *Apelblat Alexander* CITRIC ACID. Springer. 2014.

119 *Takasumi HATTORI.* Physiological Analysis of Cyanide-Insensitive Alternative Oxidase and Its Application to Metabolic Engineering of Citric Acid-Producing *Aspergillus niger*. Waseda University. Tokyo, 2008.

120 *Gopinath S.M., Puttaiah E.T., Narasimha T.P. Murthy.* citric acid production by *aspergillus niger* ETGP12, ETGP18 on solid state fermentation and effect of initial temperature on yield // International Journal of Pharma and Bio Sciences. – 2011. – Vol. 2, Iss. 4.

121 *Alexander Batti Mario.* Process for production of citric acid. US 3290227 A. 1966.

122 *Павлова О.В.* Исследование влияния рН на синтез биомассы *Aspergillus niger* при глубинном культивировании на свекловичной мелассе. Современные технологии сельскохозяйственного производства // Технология хранения и переработки сельскохозяйственной продукции: сб. науч. ст. по матер. XVII Междунар. науч.-практ. конф., г. Гродно, 16 мая 2014 г. – Гродно: ГГАУ, 2014. – С. 123-124.

123 *Авчиева П.Б., Винаров А.Ю., Козлова И.А.* Минеральный состав для питательной среды, используемой при получе-

нии лимонной кислоты. Патент РФ 2007459, 1994.

124 *Max Rohr, Christian P. Kubicek Jiri*. Kominek. Citric Acid. Wien, Austria, 2001.

125 *Angumeenala A.R., Venkappayya D.* Effect of transition metal ions on the metabolism of *Aspergillus niger* in the production of citric acid with molasses as substrate // Journal of Scientific & Industrial Research. – 2005. – Vol. 64. – P. 125-128.

126 *Masahiko Izumi*. Koji making method. Patent US 4048340 A, 1975.

127 *Santi Kulprathipanja*. Separation of citric acid from fermentation broth with a strongly basic anionic exchange resin adsorbent. Patent US No 4851574. 1989.

128 Способ получения лимонной кислоты. Патент РФ № 2050422, 1995.

129 *Морозов Л. А.* [RU], *Никифоров Ю.Н.* [UA], *Хрычев Г.А.* [RU], *Морозов А.Л.* [RU], *Штень А.А.* [UA], *Никифорова В.Н.* [UA], *Шапошник Б.А.* [UA], *Рожко А.В.* [UA], *Бозяк А.Ф.* [UA], *Ломова Г.П.* [UA], *Елькин В.Д.* [RU], *Семенюта Л.А.* [RU], *Журавлев В.С.* [RU]. Способ получения лимонной кислоты. Патент РФ № 2039085, 1995.

130 *Felman Steven W.* (Granger, US), *Patel Chetna* (Naperville, US), *Patwardhan Bhalchandra H.* (Granger, US), *Solow David J.* (Elkhart, US). Process for producing citric acid from an impure process stream. Patent US No 5,827,700. 1998.

131 *Макагонова Н.Н., Черпалова Т.М., Галкин А.В., Курочкина Ю.В.* Способ получения лимонной кислоты. Патент РФ № 2129612. 1999.

132 *Rudolf Boensch, Klaus Hohmann, Juergen Kuhn, Vaclav Cerny, Frantisek Hotek, Jiri Pendl.* Process for producing citric acid and/or citrates. Patent US 6087139 A. 2000.

133 *Сорокодумова С.В.* Оптимизация процесса кристаллизационной очистки лимонной кислоты: автореф. дис. уч. ст. канд. техн. наук. – М., 2002. – 194 с.

134 *G. Singh Dhillon, S Kaur Brar, M. Verma, R.D. Tyagi.* Recent Advances in Citric Acid Bioproduction and Recovery // Food and

Bioprocess Technology. – 2010. – 4(4). – P. 505-529.

135 *Герман Л.С.* Комплексная технология переработки некондиционного зерна как исходная стадия биотехнологических производств: автореф. дис. уч. ст. канд. техн. наук. – М., 2012. – 235 с.

136 *Vandenberghe L.P.S., Socol C.R., Prado F.C., Pandey A.* Comparison of citric acid production by solid-state fermentation in flask, column, tray and drum bioreactor, *Appl // Biochem. Biotechnol.* – 2004. – № 118. – P. 1-10.

137 *Kubicek C.P., Rohr M.* Citric acid fermentation // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 1986. – № 3. – P. 331-373.

138 *Ремеле В.В., Шаймерденова Д.А., Булашеев Б.К.* Микробное разнообразие в зерне основных культур Казахстана: матер. конф. // Перспективные вопросы мировой науки – 2013.

139 *Marie-Helene Saniez.* Method for producing citric acid. Patent US 5928911 A. 1999.

140 Method for preparing bran starter for citric acid by liquid inoculation. Patent CN 103667372 A. 2014.

Кудасов К.К. (7727) 3947267. almaservice@gmail.com

Берстенёв С.В. (7727) 3947267. sberstenyov@mail.ru

Волков Д.В. (7727) 3947267. spiritdem@mail.ru

Жамбакин К.Ж. (7727) 3947562

тел./факс: (7727) 3947562; e-mail: ipbb_kz@yahoo.com