

**СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА
НЕКОТОРЫХ ПИЩЕВЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ****С.М. Петров^а, С.Л. Филатов^б, М.С. Михайличенко^б, Н.М. Подгорнова^б**^а *Московский государственный университет технологий и управления им. К.Г. Разумовского, Москва, Россия*^б *ООО «НТ-Пром», Москва, Россия*

Практическое значение органических кислот велико, поскольку они широко используются в различных отраслях промышленности и рынок сбыта их ежегодно увеличивается. Органические кислоты могут быть получены из ископаемых источников с помощью процессов нефтехимической переработки, но большинство из них являются естественными метаболитами, вырабатываемыми различными клетками живых организмов. Эти молекулы являются продуктами, субпродуктами или сопутствующими продуктами первичных метаболических процессов в микробных клетках. Благодаря развитию промышленной биотехнологии за последние десятилетия производство этих органических кислот из микробных источников значительно выросло. Это стало возможным благодаря совместным усилиям микробиологов-биотехнологов, биохимиков и инженеров-технологов. В последнее время появилась возможность использовать возобновляемые ресурсы, что позволяет применять более устойчивый подход к производству органических кислот. Отходы промышленности в виде биомассы используются в качестве сырья не только для производства биотоплива, но и для производства органических кислот, что еще больше повышает устойчивость этого процесса в рамках кругового подхода к биоэкономике. Так в [1] представлены последние и перспективные разработки в области производства лимонной и молочной органических кислот, обсуждаются текущие проблемы для их успешного производства.

Органические кислоты считаются одними из наиболее важных химических компонентов и заменителей в различной продукции, занимая третье место среди других химических соединений. Доказано, что эти кислоты находят множество применений, в том числе в качестве добавок в производстве пищевых продуктов и в качестве сырья для химической промышленности. Они также используются при производстве силоса. Органические кислоты могут быть получены как химическими, так и микробиологическими методами. Однако ферментация считается наиболее эффективным методом для промышленного производства. Генетически модифицированные штаммы могут давать высокий выход органических кислот из альтернативного сырья, такого как сельскохозяйственные отходы. Выбор сырья и микробиологических источников считается важным фактором повышения производительности и выхода продукции, особенно при крупномасштабном производстве. Твердофазная ферментация (SSF, solid-state fermentation) с использованием возобновляемых источников в качестве сырья является предпочтительной из-за ее экономических преимуществ, связанных с низкой стоимостью и доступностью. Среди различных органических кислот в наибольших количествах производится лимонная кислота – 1,6 млн т в год, в то время как уксусная и молочная кислоты занимают второе и третье места соответственно. Эти кислоты широко используются в пищевой, молочной, фармацевтической и других отраслях промышленности, а также в производстве красок, пластмасс и лаков. Они играют важную роль в качестве хелатообразователей при удалении металлических загрязнителей из почв. Вызывает большой интерес использование побочных продуктов сельского хозяйства в качестве основного сырья для производства различных органических кислот. Эти побочные продукты являются одновременно возобновляемыми и экономически недорогими материалами, которые могут быть легко использованы микроорганизмами при промышленном и крупномасштабном производстве органических кислот [6].

Органические кислоты могут быть получены в результате микробиологического метаболизма либо естественным путем, либо после перенаправления потока углерода к желаемой мишени. Тем не менее, этот процесс предполагает нетривиальные допущения. Биокатализатор должен быть способен преобразовать заданную биомассу в определенный продукт с максимальным титром, выходом и производительностью. При производстве сырья эти параметры должны соответствовать конечной цене продажи, которая составляет приблизительно или, в идеале, ниже 200 руб. за кг. Воплощение этой концепции в промышленном процессе означает, что биокатализатор будет вынужден производить ненатуральный продукт или накапливать натуральный продукт до нефизиологических титров в

неприродной среде, начиная с непредпочтительного субстрата. Как правило, для решения основных проблем, связанных с определением эффективности ферментации, предлагаются специальные клеточные фабрики. В целом, в процессе расширения производства одной из основных проблем является возможность получения штаммов, которые могут поддерживать те же показатели, что и при производстве в лабораторных условиях. В частности, подчеркиваются существенные различия в окружающей среде, характерные для биореакторов коммерческого масштаба, по сравнению с системами культивирования в лабораторных условиях. Колебания и неоднородность химических и физических параметров в больших биореакторах, а также нестабильность генома и дрейф, наблюдаемые при длительном культивировании, являются яркими примерами проблем, которые часто упускаются из виду или которые трудно воспроизвести в лабораторных условиях. Этот разрыв чрезвычайно затрудняет прогнозирование физиолого-биохимических свойств штаммов и, следовательно, оптимальное инженерное проектирование [1].

Несмотря на то, что вышеуказанное наводит на мысль о недостижимости цели, благодаря новым технологическим разработкам все большее число микробиологических процессов удовлетворяет требованиям масштабирования и становится жизнеспособной альтернативой химическому синтезу в промышленных масштабах. Среди множества органических кислот, вырабатываемых микроорганизмами, некоторые играют важную роль в промышленности благодаря их конкурентоспособности по сравнению с традиционными методами производства. С разной степенью успеха на рынке появились микробиологические лимонная, янтарная, молочная, итаконовая, лактобионовая, глюконовая, фумаровая и пропионовая кислоты. С исторической точки зрения, лимонная кислота была первой органической кислотой, произведенной микробными клетками промышленным путем, за ней последовали молочная, фумаровая, янтарная и итаконовая кислоты.

При твердофазной ферментации, также известной как процесс Коджи, используется твердый нерастворимый материал, который действует как субстрат и носитель в среде с низкой активностью воды. Могут использоваться различные конфигурации реакторов, такие как колбы, тарелки, горизонтальные барабаны и стеклянные колонны. Трехфазная ферментация SSF для производства лимонной кислоты (CA, Citric Acid) имеет ряд преимуществ перед глубинной и поверхностной ферментацией, поскольку позволяет использовать агропищевые отходы и неразрывно коррелирует с более низким потреблением энергии и воды. И наоборот, во время SSF трудно полностью контролировать параметры процесса; поэтому его трудно масштабировать и стандартизировать, он требует больше времени на процесс и более высоких общих затрат на восстановление продукта по сравнению с другими способами. По этим причинам способ производства SSF еще далек от промышленного применения.

В настоящее время большая часть лимонной кислоты во всем мире производится методом погружной ферментации (SmF, submerged fermentation) с использованием реакторов с мешалкой или барботажных колонн. Этот процесс применяется в больших масштабах и требует более сложного оборудования и точного контроля. Однако он имеет ряд преимуществ, таких как более высокая производительность, более низкие трудозатраты и снижение риска загрязнения. Ферментация под водой может проводиться в трех различных режимах: периодическом, полунепрерывном и непрерывном. Для производства лимонной кислоты чаще всего используется периодическая система. Лимонную кислоту получают при температуре от 28 до 30 °C с использованием питательной среды, содержащей 100–150 граммов на литр источников углерода, таких как сахароза и глюкоза. Обычно этот процесс занимает 5–14 дней, в зависимости от конкретных условий. Как правило, выход лимонной кислоты из углеводов (полезных источников углерода) колеблется в пределах 50–60 % при использовании конидий в качестве начальной инокуляции в условиях интенсивного роста и 80–90 % при использовании предварительно выращенного мицелия в качестве семенной культуры в условиях ограниченного роста. В процессе глубинной ферментации, а также культивирования во встряхиваемой колбе вязкость культурального бульона со временем увеличивается из-за образования *A. niger* амилозоподобных полисахаридов. Чтобы снизить выработку этих полисахаридов, эффективно добавлять вязкие вещества в среду для культивирования в самом начале и / или снижать физическую нагрузку на мицелий. По сравнению с поверхностной ферментацией, глубинная ферментация требует более сложного оборудования, но, в свою очередь, характеризуется более высокими выходами, меньшим временем ферментации, простотой стандартизации и автоматизации процесса и меньшим риском загрязнения.

Решающим шагом в производстве СА является последующий после ферментации процесс, на который, по оценкам, приходится 30–40 % себестоимости. Необходимо учитывать, что на сложность процесса выделения кислоты может сильно влиять тип ферментации (SSF, SF или SmF) и субстрат ферментации; например, использование агропищевых отходов может потребовать дополнительных шагов для получения продукта высокой чистоты. По окончании ферментации микробную биомассу удаляют фильтрованием, после чего бульон можно подвергать различным обработкам для получения очищенной лимонной кислоты. Классический метод выделения СА, который остается наиболее используемым, основан на осаждении соли трицитрата кальция, вызванном добавлением оксида кальция при 90 °С и рН 7 с последующей обработкой серной кислотой, в результате которой образуются растворимая лимонная кислота и сульфат кальция. Сульфат кальция отфильтровывают, а лимонную кислоту подвергают дальнейшей очистке. Альтернативный метод извлечения СА основан на жидкостно-жидкостной экстракции различными растворителями (такими как алифатические спирты, кетоны и третичные амины). В последнее время предложены другие методы, такие как сверхкритическая CO₂-экстракция, адсорбция на катионных смолах и электродиализ [2].

В работе [4] изучен процесс восстановления лимонной кислоты из ферментированной жидкости методом биполярного мембранного электродиализа (BMED). Две биполярные мембраны и одна катионообменная мембрана были сложены для формирования двухкамерной конфигурации BMED. Исследовано влияние плотности тока, начальной концентрации цитрата натрия и структуры кислотного отсека (АС) и основного отсека (ВС) на производительность процесса BMED. Заполнение смешанных ионообменных смол в ВС может снизить сопротивление отсека и привести к чистому основному раствору для повторного использования. Наибольшее восстановление кислоты 97,1 % было достигнуто с 3,3 % исходного цитрата натрия при плотности тока 40 мА·см⁻². Кроме того, снижение напряжения на АС путем заполнения катионообменных смол ограничило миграцию ионов Н⁺ из АС в ВС. Более высокая начальная концентрация цитрата натрия оказывает неблагоприятное влияние на восстановление лимонной кислоты. Процесс в ВС с биполярной мембраной (BPM) показал более низкое потребление энергии и более высокую скорость извлечения лимонной кислоты. BMED представляется перспективной технологией для извлечения лимонной кислоты из ферментированной жидкости.

Проведенный технико-экономический и экологический анализ производства СА, сравнивающий извлечение путем осаждения, ионного обмена и экстракции растворителем, показал, что метод ионного обмена является наиболее экологически чистым, тогда как экстракция растворителем с последующим осаждением является наиболее экономически удобной. Другими факторами, оказавшими большое влияние на конечную себестоимость, были расход электроэнергии, стоимость сырья, ферментера и очистки сточных вод.

Производство молочной кислоты (LA) осуществляется путем химического синтеза или ферментации. Микробная ферментация весьма привлекательна для производства молочной кислоты, поскольку позволяет получать чистые изомеры – правовращающуюся (L(+)) или левовращающуюся D(-) вместо рацемической смеси (DA-LA), причем последняя характерна для химического синтеза. Кроме того, при химическом синтезе используются загрязняющие вещества (например, лактонитрил и высокотоксичный цианистый водород), производство которых также имеет высокую себестоимость. В настоящее время более 90 % молочной кислоты производится в результате процессов брожения. LA в основном используется в качестве мономера биоразлагаемой полимолочной кислоты (PLA) для биоразлагаемых пластиков. PLA сегодня считается одним из наиболее перспективных полимеров для производства биопластиков. PLA находит применение в упаковке, сельском хозяйстве, транспорте, электронной, текстильной и других отраслях промышленности.

При традиционной ферментации LA из полисахаридов как ферментативный гидролиз, так и ферментация происходят в отдельных реакторах. Однако твердофазная экстракция (SSF) – это процесс, при котором осахаривание углеводов и микробная ферментация происходят за один этап. SSF является эффективной стратегией улучшения производства LA, поскольку позволяет избежать ингибирования субстрата и сократить время обработки. В процессе SSF скорость потребления глюкозы является решающим фактором, определяющим продуктивность LA в ферментационном бульоне. Если скорость потребления глюкозы меньше скорости ее продуцирования, то это приводит к накоплению глюкозы в ферментационном бульоне, что нежелательно и приводит к ингибированию субстрата. Кроме того,

накопление глюкозы может снизить потребление микроорганизмами других сахаров, таких как ксилоза. Следовательно, для повышения производительности LA количество потребления глюкозы должно быть больше, чем количество ее продуцирования [3].

Хотя и другие микроорганизмы были идентифицированы как продуценты молочной кислоты, как описано выше. В настоящее время молочнокислые бактерии по-прежнему представляют собой лучшие продуценты в промышленном масштабе. Они производят LA путем гликолиза в анаэробных условиях при температуре в диапазоне 25–45 °С (в зависимости от микроорганизма) и pH от 5,5 до 6,5, хотя они также являются микроаэрофильными или аэротолерантными.

Чтобы оптимизировать производство молочной кислоты, следует учитывать некоторые аспекты, которые могут повлиять на процесс ферментации, включая температуру, концентрацию сахара, влияние питательных веществ, смешанных сахаров и образование побочных продуктов.

Решающую роль играет pH ферментации. Так как предпочтительной формой продукта является недиссоциированная форма молочной кислоты, то это означает, что конечный pH среды должен быть значительно ниже pK LA, что соответствует 3,78. Однако при таком pH у большинства молочнокислых бактерий наблюдается необратимое повреждение их метаболических функций. Поэтому в ферментационный бульон добавляют несколько нейтрализующих агентов для поддержания pH и защиты микробных клеток. К сожалению, использование Ca(OH)₂ или CaCO₃ вызывает образование лактата кальция, который необходимо удалить кислотной обработкой (серная кислота), с образованием сульфата кальция (гипс), отхода, вызывающего серьезные проблемы с утилизацией.

Для успешного производства LA рассматриваются разные модификации технологии. Например, Тиан и др. описали применение мутагенеза, адаптивной эволюции и метаболической инженерии на молочнокислых бактериях. Наряду с LAB были оценены как потенциальные продуценты молочной кислоты другие микроорганизмы. Одними из наиболее интересных являются штаммы бактерий *Bacillus*, способные расти при высоких температурах (до 55 °С), избегая дальнейшей стерилизации питательных сред и допуская эксплуатацию биомасс второго поколения, поскольку они устойчивы к некоторым побочным продуктам, образующимся в результате предварительной обработки.

Производство молочной кислоты также можно улучшить путем совместного культивирования штаммов со схожими характеристиками роста, что позволяет получать гомоферментативные штаммы, которые могут воспользоваться преимуществами гетероферментативных штаммов, которые обычно производят низкие количества молочной кислоты из-за накопления других продуктов. Совместные культуры представляют собой интересную перспективу также для стратегии одновременного осахаривания и ферментации (SSF), а также для использования смешанных сахаров; оба являются типичными условиями, когда сырье рассматривается как субстрат ферментации [5].

Из вышеприведенного следует, что производство органических кислот на основе микробов может, по крайней мере, конкурировать, если не заменить, химическое их производство на основе ископаемого топливного сырья.

Основными ограничениями являются производительность и надежность микробиологической отрасли. Что касается повышения производительности микробиологических заводов, необходимо принять во внимание несколько аспектов, часто взаимосвязанных. Одним из них является сбалансированная поставка необходимого сырья, что позволяет рассчитать теоретический выход и дисбаланс или доступность (микро) питательных веществ, чтобы избежать образования побочных продуктов и/или перерасхода энергии. Другим важным аспектом является оценка образования окисленных продуктов или свободных радикалов как следствие энергетического дисбаланса или условий ферментации.

В заключение можно отметить, что благодаря опыту микробной биотехнологии, накопленному за последние десятилетия, теперь совершенно ясно, что получение подтверждения концепции процесса производства органических кислот больше не является ограничивающим этапом. Основным препятствием на пути разработки прибыльных и конкурентоспособных микробиологических и биологических процессов являются параметры масштабирования, которые очень часто трудно воспроизвести в лабораторных условиях. Последние достижения в области технологий и количественного анализа, а также в области синтетической биологии будут иметь решающее значение для стимулирования исследований, а также передачи микробиологических технологий в производство органических кислот в ближайшее время.

Литература

1. Di Lorenzo R.D. et al. State of the art on the microbial production of industrially relevant organic acids // *Catalysts*. – 2022. – Т. 12. – №. 2. – С. 234.
2. Sheikh H., Anand G.G., Shivanna G.B. Fermentation: A Potential Strategy for Microbial Metabolite Production. – 2024.
3. Singh S. et al. Fermentation Strategies for Organic Acid Production // *Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2022. С. 379.
4. Sun X., Lu H., Wang J. Recovery of citric acid from fermented liquid by bipolar membrane electro dialysis // *Journal of Cleaner Production*. – 2017. – Т. 143. – С. 250–256.
5. Tran V.G., Zhao H. Engineering robust microorganisms for organic acid production // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – Т. 49. – №. 2. – С. kuab067.
6. Vishnu D., et al. Recent advances in organic acid production from microbial sources by utilizing agricultural by-products as substrates for industrial applications // *Bioprocess Engineering for Bioremediation: Valorization and Management Techniques*. – 2020. – С. 67–87.