



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Citrinų rūgšties gamybos optimizavimas**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Tadas Budginas**

Projekto autorius

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Citrinų rūgšties gamybos optimizavimas**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Tadas Budginas**

Projekto autorius

**Doc. dr. Ilona Jonuškienė**

Vadovė

**Lekt. dr. Kazimieras  
Anusevičius**

Recenzentas

---

**Kaunas, 2020**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Tadas Budginas

## **Citrinų rūgšties gamybos optimizavimas**

### Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Tado Budgino, baigiamasis projektas tema „Citrinų rūgšties gamybos optimizavimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Tadas Budginas

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

Budginas, Tadas. Citrinų rūgšties gamybos optimizavimas. Magistro baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: citrinų rūgštis, fermentacija, optimizavimas, *Aspergillus niger*.

2020. 55 p.

### **Santrauka**

Šiame darbe aprašomas citrinų rūgšties gavimas fermentacijos būdu iš įvairių fermentacijos terpių. Fermentavimui naudojamas *Aspergillus niger* DSM 821 filamentinis grybas. Siekiant gauti didžiausią citrinų rūgšties koncentraciją fermentavimo metu buvo keistos fermentavimo sąlygos ir terpės sudėtis, kuriose vykdyta fermentacija. Pasirinktos terpės sudėtis buvo keičiama siekiant nustatyti tinkamiausias sąlygas fermentacijai ir mikroorganizmo augimui. Gauti rezultatai buvo įvertinti ir nustatyta, kurie veiksniai turėjo didžiausią įtaką citrinų rūgšties pagaminimui, kuomet naudojama *Aspergillus niger* DSM 821 mikroorganizmų kultūra.

Budginas, Tadas. Citric Acid Fermentation Optimization. Master's Final Degree Project / supervisor assoc. prof. dr. Ilona Jonuškienė; Faculty of Chemical technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological Sciences.

Keywords: citric acid, fermentation, optimization, *Aspergillus niger*.

2020. 55 pages.

### **Summary**

In this thesis is described citric acid production by fermentation process from various fermentation media. For fermentation *Aspergillus niger* DSM 821 filamentous fungi is used. In order to produce maximum concentration of citric acid various fermentation conditions and fermentation medium itself were changed. Selected medium's composition was manipulated so that best conditions for fermentation would be met. Obtained results from experiments were evaluated and decisions were made which factors had biggest impact on citric acid production by *Aspergillus niger* DSM 821 microbial culture.

## Turinys

<b>Lentelių sąrašas .....</b>	<b>9</b>
<b>Paveikslų sąrašas .....</b>	<b>10</b>
<b>Santrumpų ir terminų sąrašas .....</b>	<b>11</b>
<b>Įvadas.....</b>	<b>12</b>
<b>1. Literatūros apžvalga .....</b>	<b>13</b>
1.1. 2-hidroksi-1,2,3-propantrikarboksirūgšties apibūdinimas .....	13
1.2. Citrinų rūgšties pritaikymas ir panaudojimas.....	13
1.2.1. Citrinų rūgštis maisto pramonėje .....	13
1.2.2. Citrinų rūgštis valikliuose .....	14
1.2.3. Citrinų rūgštis farmacijoje.....	14
1.2.4. Citrinų rūgšties dezinfekcinės savybės .....	14
1.3. Krebso ciklo biocheminio mechanizmo pakreipimas tikslių produktų gavimui.....	15
1.3.1. Kodėl <i>Asperillus niger</i> kaupia citrinų rūgštį? .....	15
1.3.2. Pramonėje naudojami būdai didelei citrinų rūgšties išeigai gauti.....	15
1.3.3. Fermentacijos išeigos priklausomybė nuo reakcijos produktų .....	16
1.3.4. Fermentai dalyvaujantys citrinų rūgšties kaupime terpėje .....	16
1.4. Mikroorganizmai naudojami citrinų rūgšties fermentacijai .....	16
1.5. Substratas citrinų rūgšties gamybai .....	17
1.6. Alternatyviosios fermentacijos žaliavos.....	17
1.7. Fermentinis žaliavos apdorojimas ir fermentacija.....	18
1.8. Celiuliozinės žaliavos apdorojimas .....	18
1.9. Inokulianto sudarymas ir micelių granulių formavimasis citrinų rūgšties gamybai .....	18
1.10. Fermentacijos būdai citrinų rūgšties gamybai.....	19

1.10.1. Paviršinė fermentacija .....	19
1.10.2. Kietos fazės fermentacija .....	20
1.10.3. Skystos terpės fermentacija .....	20
1.10.4. Vienalaikė sacharifikacijos ir fermentacijos reakcija.....	21
1.11. Faktoriai turintys įtaką citrinų rūgšties gamybai.....	22
1.11.1. Anglies šaltinis .....	22
1.11.2. Azoto ribojimas .....	22
1.11.3. Fosforo ribojimas .....	23
1.11.4. Mikroelementai .....	23
1.12. Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	24
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai .....</b>	<b>25</b>
2.1. Tiriamasis objektas.....	25
2.2 Naudotos aparatūros sąrašas: .....	25
2.3. Tyrimams naudotos medžiagos .....	26
2.4. Tyrimo metodai: .....	27
2.4.1. Tinkamo sporų kiekio į fermentavimo terpę pasėjimas .....	27
2.4.2. Citrinų rūgšties gavimas iš sacharidų:.....	28
2.4.3. Citrinų rūgšties koncentracijos nustatymas .....	29
2.4.4. Alternatyvus metodas citrinų rūgšties nustatymui .....	30
2.4.5. Cukraus kiekio nustatymas pagal P.Chellapandi .....	30
2.4.6. Alternatyvus metodas cukraus kiekiui nustatyti.....	31
2.4.7. Pramoninių atliekų tinkamumo fermentavimui nustatymas.....	32
2.4.8. Peleningumo tyrimas .....	32
2.4.9. Lignoceliuliozinės ir celiuliozinės žaliavos paruošimas fermentacijai .....	33

2.4.10. Celiuliozės fermentinis apdorojimas .....	34
2.4.11. Vienalaikė sacharifikacijos ir fermentacijos reakcija.....	34
2.4.12. Melasos paruošimas citrinų rūgšties gamybai.....	35
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....</b>	<b>36</b>
3.1. Pagaminamos citrinų rūgšties koncentracijos įvertinimas .....	36
3.1.1. Tyrimas panaudojant piridiną ir acto anhidridą .....	36
3.1.2. Tyrimas panaudojant vario (II)-amonio kompleksinį reagentą.....	36
3.1.3. Tinkamiausio būdo citrinų rūgšties koncentracijai tirti pasirinkimas .....	37
3.2. Tinkamiausio anglies šaltinio citrinų rūgšties gamybai įvertinimas .....	37
3.3. Tinkamos sąlygos micelių granulių susidarymui .....	39
3.4. Alternatyvaus gliukozės šaltinio išbandymas citrinų rūgšties fermentacijai .....	40
3.4.1. Celiuliozinės žaliavos panaudojimas citrinų rūgšties fermentacijai.....	42
3.4.2. <i>Aspergillus niger</i> išskiriamos celiuliazės kiekio nustatymas .....	43
3.4.3. Vienalaikės sacharifikacijos ir fermentacijos reakcijos atlikimas panaudojant celiuliozę kaip substratą.....	44
3.4.4. Popieriaus perdirbimo pramoninių atliekų panaudojimas citrinų rūgšties fermentacijai.....	46
<b>4. Rekomendacijų dalis .....</b>	<b>49</b>
<b>Išvados .....</b>	<b>51</b>
<b>Literatūros sąrašas .....</b>	<b>52</b>



## Lentelių sąrašas

<b>2.1 lentelė.</b> Naudotos medžiagos .....	27-28
<b>2.2 lentelė.</b> Fermentacijos skystoje fazėje mitybinė terpė.....	30
<b>2.3 lentelė.</b> Celiuliazinio aktyvumo nustatymui skirta mitybinė terpė.....	33
<b>3.1 lentelė.</b> Fermentacijos skystoje fazėje mitybinė terpė.....	39
<b>3.2 lentelė.</b> Fermentacijos skystoje fazėje mitybinė terpė.....	41
<b>3.3 lentelė.</b> Fermentacijos mitybinė terpė.....	45
<b>4.1 lentelė.</b> Prietaisų lentelė.....	49-50

## Paveikslų sąrašas

<b>2.1 pav.</b> Citrinų rūgšties fermentacinės gamybos schema .....	26
<b>2.2 pav.</b> Ant standžios terpės užaugintos <i>Aspergillus niger</i> mikroorganizmas.....	29
<b>2.3 pav.</b> Citrinų rūgšties koncentracijos nustatymo reakcija su skirtingos koncentracijos fermentacinės terpės tirpalais. ....	31
<b>2.4 pav.</b> Cukraus koncentracijos nustatymas fermentavimo terpėse .....	32
<b>3.1 pav.</b> Šviesos sugerties priklausomybė nuo citrinų rūgšties koncentracijos kalibracinė kreivė.....	37
<b>3.2 pav.</b> Šviesos sugerties verčių sumos priklausomybė nuo citrinų rūgšties koncentracijos kalibracinė kreivė .....	38
<b>3.3 pav.</b> Citrinų rūgšties koncentracijos išeigos priklausomybė nuo skirtingų anglies šaltinių.....	40
<b>3.4 pav.</b> Susiformavusios sferinės micelių granulės fermentavimo terpėje su gliukoze.....	41
<b>3.5 pav.</b> Nesusiformavusios micelės indikuojančios prastą terpės sudėtį.....	41
<b>3.6 pav.</b> Citrinų rūgšties fermentacijos išeiga, kuomet panaudojama melasa kaip žalia .....	42
<b>3.7 pav.</b> Šviesos sugerties priklausomybė nuo cukraus koncentracijos kalibracinė kreivė.....	44
<b>3.8 pav.</b> Cukraus koncentracijos terpėje priklausomybė nuo fermentacijos trukmės .....	46
<b>3.9 pav.</b> Citrinų rūgšties koncentracijos priklausomybė nuo fermentavimo trukmės.....	46
<b>3.10 pav.</b> Fermentacijos terpėje su celiuliozine žaliava susidariusios micelinės granulės.....	47
<b>3.11 pav.</b> Susidariusios citrinų rūgšties koncentracijos palyginimas fermentavimo terpėse.....	48
<b>3.12 pav.</b> Susidariusios citrinų rūgšties koncentracijos išeigos palyginimas skirtingose fermentavimo terpėse .....	48
<b>4.1 pav.</b> Automatizuota technologinė schema citrinų rūgšties gamybai.....	49

## Santrumpų ir terminų sąrašas

**r.** – rūgštis

**A.niger-** *Aspergillus niger*

**ATP-** Adenozin 5' trifosfatas

**NADH-** Nikotinamido adenino dinukleotidas

**DNSA-** 3,5-Dinitrosalicilo rūgštis

**vvm-** oro tūris tenkantis litrai terpės per minutę

**SSF-** vienalaikė sacharifikacijos ir fermentacijos reakcija

## Įvadas

Citrinų rūgštis yra vienas iš pagrindinių rūgštingumą reguliuojančių priedų maisto ir gėrimų pramonėje. Šios natūraliai gamtoje susidarancios organinės rūgšties suvartojimas kiekvienais metais išauga keliais procentais. Dėl savo bioskaidumo citrinų rūgštis yra laikoma nekenksmingu maisto priedu, o jos skoninės savybės yra priimtinos ir praturtinančios maistą ir gėrimus. Sutrumpintai kaip priedas dažnai citrinų rūgštis yra žymima E330. Pastaruoju metu citrinų rūgštis pritaikoma vis plačiau. Be maisto pramonės šiuo metu sparčiausiai auganti citrinų rūgšties panaudojimo rinka yra valikliams gaminti. Citrinų rūgštis pasižymi buferinėmis savybėmis, todėl, taip pat, panaudojama ir farmacijoje kaip rūgštingumą palaikanti medžiaga, o kraujo saugojimui ji naudojama kaip antikoaguliacinė medžiaga.

Beveik visa citrinų rūgštis pagaminama pramoniniu būdu yra gaunama mikrobiologinės fermentacijos metodu panaudojant *Aspergillus niger* mikroorganizmą. Kaip žaliava fermentacijai dažniausiai yra naudojama didelius kiekius sacharidų turintis substratas. Šitoks substratas yra žemės ūkio pramonės arba maisto pramonės atliekos, todėl jas panaudojant fermentacijoje sukuriama pridėtinę vertę turintis produktas ir sumažinamas į aplinką išmetamų atliekų kiekis. Citrinų rūgšties fermentacija gali vykti įvairiais fermentavimo metodais, tačiau dėl proceso lengvesnės kontrolės ir geros tikslinio produkto išeigos pramonėje dažniausiai panaudojama skystos terpės fermentacija. Šiai fermentacijai kaip substratas naudojama melasa ar kita cukringa maisto pramonės atlieka.

Dėl tobulėjančių cukraus rafinavimo technologijų susidarantis melasos kiekis mažėja, o tai didina jos kainą, todėl ieškoma alternatyvių anglies šaltinių citrinų rūgšties fermentacijai. Ieškant ekonomiškai patrauklių cukraus šaltinių buvo atkreiptas dėmesys į lignoceliuliozinę žaliavą. Ši žaliava apdorota fermentais tinka citrinų rūgšties fermentacijai, o gaunamos citrinų rūgšties savikaina yra konkurencinga rinkos atžvilgiu. Taikant skirtingus substratus fermentacijai vykdyti skiriasi ir optimalūs fermentacijos parametrai ir sąlygos, todėl tai yra aktuali tyrimų sritis. Į tai plačiau ir gilinamasi šiame darbe, siekiant išgauti didžiausią citrinų rūgšties išeigą panaudojant skirtingus substratus.

**Darbo tikslas:** *Aspergillus niger* fermentacijos metu gauti citrinų rūgštį panaudojant skirtingus anglies šaltinius ir optimizuoti fermentacijos sąlygas.

### Darbo uždaviniai:

- nustatyti tinkamiausią anglies šaltinį *Aspergillus niger* auginimui;
- nustatyti optimalias sąlygas citrinų rūgšties gamybai;
- nustatyti citrinų rūgšties koncentraciją fermentacijos terpėje realiu laiku;
- nustatyti substrato koncentraciją fermentacijos terpėje realiu laiku;
- pateikti siūlomą aparatūrinę schemą citrinų rūgščiai gauti.

## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. 2-hidroksi-1,2,3-propantrikarboksirūgštis apibūdinimas

Viena plačiausiai naudojamų karboksirūgščių yra pagal IUPAC (Tarptautinė bendrosios ir taikomosios chemijos sąjunga) žinoma kaip 2-hidroksi-1,2,3-propantrikarboksirūgštis, kuri plačiau žinoma citrinų rūgštis pavadinimu [1, 4]. Ši organinė rūgštis yra priskiriama prie silpnų rūgščių. Ji pirmą kartą buvo išskirta ir išgryninta iš citrusinių vaisių, tokių kaip citrinos arba anansai, kuriuose jos koncentracija gali siekti iki 8% sausos masės [2]. Tai atliko vokiečių chemikas Carl Wilhelm Sheele 1784 metais iškristalizuodamas gryną citrinų rūgštį iš citrinų sulčių. Tačiau po šio atradimo dar ilgai nebuvo suprastas pilnas citrinų rūgštis panaudojimo spektro potencialas, kur ji dabar naudojama, kaip maisto priedas, konservantas skonio stipriklis, ploviklio sudedamoji dalis ir daugelio kitų [42].

Citrinų rūgštis, kaip ir daugelis kitų karboksirūgščių, yra labai gerai tirpi vandenyje, kuriame jos tirpumas siekia 592g/L [1]. Dėl šios savybės ji plačiai naudojama maisto ir gėrimų pramonėje. Taip pat ji turi tris karboksilo grupes su skirtingomis pKa vertėmis, o tai ypač padidina medžiagos buferines savybes [22]. Gebėjimas išlaikyti tinkamą pH dėl buferinių savybių, geras bioskaidumas ir mažas kenksmingumas sudarė sąlygas šią rūgštį naudoti vaistų sudėtyje, kaip surišančią ir tinkamą rūgštingumą palaikančią medžiagą.

XIX amžiaus pabaigoje išaugus citrinų rūgštis poreikiui pradėta masinė gamyba, žaliavai panaudojant citrusinius vaisius, iš kurių daugiausia naudotos buvo citrinos. Atsiradus citrinų rūgštis paklausai imta labiau domėtis ir tyrinėti galimus kitus šios naudingos medžiagos gavimo būdus. Ilgainiui buvo pastebėta, kad *Penicillium* genties mikroskopiniai grybai sugeba gaminti nedidelius kiekius citrinų rūgštis augimo terpėje. Tačiau šis atradimas neįgavo didesnės reikšmės iki pirmojo pasaulinio karo, kai buvo apriboti citrinų rūgštis gamybos pajėgumai dėl gamybinės žaliavos, tai yra, citrinų trūkumo. Tačiau perėjimas nuo citrinų žaliavos gamybai iki mikrobiologinio citrinų rūgštis gavimo būdo užtruko dar ne vieną dešimtmetį. Tai yra, kol 1917m. James Currie atliko svarbų atradimą. Jo daromų tyrimų rezultatai parodė, kad *Aspergillus niger* kaupia gana didelius citrinų rūgštis kiekius augimo terpėje, kai yra substrato perteklius [38]. Šį atradimą gana greitai pritaikė viena iš didžiausių to laiko farmacijos gamyklų „Pfizer“ ir taip prasidėjo biotechnologinės kilmės citrinų rūgštis gamybos era. Šiuo metu absoliuti dauguma gamyklų, gaminančių citrinų rūgštį, naudoja biotechnologinius metodus ir mikroskopinius pelėsinis grybus, tokius kaip *Aspergillus niger*.

### 1.2. Citrinų rūgštis pritaikymas ir panaudojimas

#### 1.2.1. Citrinų rūgštis maisto pramonėje

Citrinų rūgštis yra plačiausiai naudojama maisto pramonėje. Dėl gero tirpumo vandenyje maždaug 50% pagaminamos citrinų rūgštis yra sunaudojama kaip skonio stipriklis gėrimų skoniui pagerinti. Citrinų rūgštis gėrimams suteikia rūgštumo ir šiek tiek kartumo ir taip kartu su gėrimuose esančiais saldikliais sukuria priimtina atgaivinantį skonį [1].

Citrinų rūgštis maiste dažniausiai naudojama ne tik kaip skonio stipriklis, tačiau ir kaip konservantas. Dėl savo rūgštinių savybių šis maisto priedas mažina mikroorganizmų augimą, kurie neturi gebėjimo augti rūgščioje terpėje. Todėl citrinų rūgštis dažnai naudojama šaldyto maisto gamyboje arba jūros gėrybių produktuose. Dažniausiai ant pakuočių naudojamas E330

žymėjimas parodantis, kad produktas savo sudėtyje turi citrinų rūgštis [43]. Šis konservantas yra laikomas natūraliu maisto priedu, nes citrinų rūgštis susidaro kiekviename gyvame organizme, kuriame vyksta metabolizmo procesai. Citrinų rūgštis susidaro Krebso ciklo metu ir vėliau yra sunaudojama. Todėl citrinų rūgštis kiekis maiste, kai ji yra naudojama gryna, nėra ribojamas. Ribojamos yra tik priemaišos pačioje citrinų rūgštyje. Dėl šių priežasčių citrinų rūgštis kiekį gaminiuose ribojantis faktorius nėra jos kiekis, tačiau gaminio skonis ir jo rūgštumas.

### **1.2.2. Citrinų rūgštis valikliuose**

Valikliuose naudojami fosfatai nuotekų valymo įrenginiuose nėra iki galo išvalomi, o grąžinamas valytas vanduo sukelia vandens telkinių eutrofikaciją ir užpelkėjimą. Eutrofikaciją yra kenksminga vandens faunai. Dėl šių priežasčių vis didesnis kiekis citrinų rūgštis yra sunaudojamas valikliams ir skalbikliams gaminti. Pagal Europos Sąjungos Parlamento reglamentuotus sprendimus pradėjus riboti fosfatų ir fosforo rūgštis naudojimą valikliuose buvo nuspręsta kaip pakaitalą naudoti citrinų rūgštį ir jos druskas. Dėl savo mažo kenksmingumo tokie valikliai dažnai naudojami vamzdynamics valyti gėrimų ir maisto pramonėje, tačiau reikia paminėti, kad pastaruoju metu sparčiai daugėja ir buityje naudojamų valiklių, kurių sudėtyje yra citrinų rūgštis. Citrinų rūgštis daugiausiai veikia kaip vandens kietumą mažinantis agentas, kuris suriša kalcio ir magnio jonus, taip leisdamas veikti valikliuose esančioms paviršiaus aktyviosioms medžiagoms.

### **1.2.3. Citrinų rūgštis farmacijoje**

Nors pagal sunaudojamus citrinų rūgštis kiekius farmacijos pramonė užima ne aukščiausią vietą, tačiau dėl savo puikaus bioskaidumo citrinų rūgštis yra nepakeičiamas vaistų priedas. Farmacijoje naudojama citrinų rūgštis turi būti aukšto grynumo, nes dažnai ji naudojama kaip vaistų priedas, suteikiantis stabilumo ir pagerinantis vaistų tinkamumo naudojimui laikotarpi. Ypač dideli kiekiai farmacijoje sunaudojamos citrinų rūgštis yra sunaudojami kraujui saugoti. Čia ji naudojama kaip nuo koaguliacijos apsauganti medžiaga, kuri išlaiko kraują nesukrešėjusį. Citrinų rūgštis taip pat yra naudojama terpės rūgštingumui palaikyti nuo kurios priklauso vaistų stabilumas ir veiksmingumas. Vaistuose, savo sudėtyje turinčiuose geležies, vario ar mangano jonų, citrinų rūgštis suformuoja kompleksinius junginius ir taip išlaiko aktyviasias medžiagas nepakitusias ir nepraradusias savo aktyvumo.

### **1.2.4. Citrinų rūgštis dezinfekcinės savybės**

Citrinų rūgštis pasižymi dezinfekcinėmis savybėmis, ypač prieš virusinės kilmės patogenus, todėl gali būti naudojama dezinfekantų sudėtyje. Ji veiksminga prieš tokius virusus kaip rinovirusas ar noravirusas, kurie į organizmą patenka oraliniu būdu. Tai virusai, kurių didžiausias plitimas stebimas žiemos šaltuoju laikotarpiu ir vien nuo noroviruso kasmet pasaulyje miršta apie 200 tūkstančių žmonių, iš kurių 50 tūkstančių yra jaunesni nei 5 metų vaikai. Citrinų rūgštis apsaugo nuo virusų plitimo pakeisdama terpės rūgštingumą iki lygio, kurio virusai netoleruoja, tačiau noroviruso atveju citrato jonai prisijungia prie histidinui pritaikytų viruso grupių taip užkirsdama kelią prisijungti prie žmogaus organizmo ląstelių. Individams užsikrėtusiems noravirusu, vartojant citrinų rūgštį, sumažėja ligos simptomai ir pagerėja savijauta. Taip pat atliekant sergančiųjų tyrimus buvo iširta, kad citratas taip pat prisijungia prie trefoil-P-tipo srities, o tai, galimai, indikuoja, kad citrinų rūgštis būtų veiksmingas dezinfekantas ir ligos simptomus mažinantis preparatas prieš visas noroviruso atmainas. Citrinų rūgštis tirpalas su natrio laurilo sulfato priedu

gali būti sėkmingai naudojamas kaip paviršių dezinfekavimo priemonė nuo noraviruso, rinoviruso, peršalimo ir gripo virusų.

### **1.3. Krebso ciklo biocheminio mechanizmo pakreipimas tikslių produktų gavimui**

#### **1.3.1. Kodėl *Aspergillus niger* kaupia citrinų rūgštį?**

Bendruoju atveju citrinų rūgštis susidaro visuose organizmuose, tačiau kai kurie organizmai kaupia didesnius jos kiekius. Didelius kiekius kaupia *Aspergillus* genties pelėsiniai grybai. Citrinų rūgštis naudojama kaip apsaugos priemonė konkuruojant dėl maistinių medžiagų. Susidarant dideliame aplinkinės terpės rūgštingumui bakterijoms ir kitiems mikroorganizmams sudaromos suboptimalios sąlygos ir dėl to nuslopinamas jų augimas ir jie sunaudoja mažesnę dalį ribojančių maistinių medžiagų. *Aspergillus* mikroskopiniai grybai gerai toleruodami žemą terpės pH naudojasi tuo ir taip gali sunaudoti didesnius kiekius maistinių medžiagų ir sukaupti didelius kiekius citrinų rūgšties. Tačiau, paprastai gamtoje nėra tikslinga kaupti didesnius kiekius rūgšties, nei būtina patenkinti minimalius terpės pH palaikymo poreikius, todėl didelė dalis pagaminamos citrinų rūgšties sunaudojama vėlesniuose Krebso ciklo etapuose [32]. Norint gaminti citrinų rūgštį pramoniniu būdu reikia nuslopinti citrinų rūgšties sunaudojimą Krebso cikle. Mangano, fosforo ir azoto ribojimas slopina anabolinius procesus *A.niger* viduje ir todėl ima nykti baltymai ir mažėja citrinų rūgšties suvartojimas Krebso cikle [7]. Tokiu būdu mikroorganizmas pradeda terpėje kaupti perteklinius kiekius citrinų rūgšties.

*Aspergillus niger* gaminama citrinų rūgštis (2-hidroksi-1,2,3-propantrikarboksirūgštis) yra pirmasis tarpinis produktas trikarboksirūgščių cikle, kitaip dar vadinamame Krebso cikle. Šis produktas pasigamina kondensacijos reakcijos metu, kai reaguoja acetilkoalinas ir oksalo acetatas. Reakcijos metu vienas molis gliukozės yra paverčiamas vienu moliu ATP ir trimis moliais NADH ir moliu citrinų rūgšties, todėl galima maksimali teorinė citrinų rūgšties išeiga yra 1,067g iš vieno gramo gliukozės.

#### **1.3.2. Pramonėje naudojami būdai didelei citrinų rūgšties išeigai gauti**

Pagrindinis pramonėje taikomas būdas padidinti citrinų rūgšties kaupimą terpėje yra sumažinti cisono rūgšties ir izocitrato rūgšties gamybą. Šių rūgščių substratas Krebso ciklo metu yra citrinų rūgštis, todėl terpėje didėjant akonito ir izocitrato rūgščių kiekiui, mažėja tikslinio produkto kiekis. Nepageidaujamų rūgščių gamyba yra sustabdoma mažinant fermentams veikti reikalingų kofaktorių koncentraciją terpėje. Akonito rūgštis susidaro akonitazei dalyvaujant sintezėje, kai prisijungiamas kofermentas, kurio sudėtyje yra geležies. Dėl to terpėje mažinant geležies jonų kiekį, mažėja ir susidaranti akonito rūgštis. Geležies jonai įeina ir į akonitazės dehidrogenazės kofermentų sudėtį, todėl atitinkamai sumažėja ir izocitrato rūgštis. Mangano, fosforo ir azoto ribojimas slopina anabolinius procesus *A.niger* viduje ir todėl ima nykti baltymai. Baltymų nykimas sukelia amonio jonų mikroorganizme padidėjimą. Šitas pokytis atsveria citrinų rūgšties inhibavimą fosfofruktokinazei (PFK-1) [25]. Fosfofruktokinazė tai vienas iš tarpinių fermentų mikroorganizme atsakingų už gliukozės ir fruktozės skaidymą į piruvatą [35]. Didelės  $\text{NH}_4^+$  ir gliukozės koncentracijos sulėtina  $\alpha$ -ketoglutarato dehidrogenazės susidarymą ir veikimą dėl ko yra sustabdomas citrinų rūgšties katabolizmas Krebso cikle. Kadangi mitybinėje terpėje nėra  $\text{Ca}^{2+}$  jonų, tai yra sustabdoma ir izocitrato dehidrogenazės veikla. Todėl citratas ir izocitratas pradeda kauptis [23]. Šitoks fermentacijos terpėje esančių medžiagų ribojimas kontroliuoja fermentų veiklą ir veda prie didesnės citrinų rūgšties išeigos.

### 1.3.3. Fermentacijos išėigos priklausomybė nuo reakcijos produktų

Fermentacijoje, kaip ir bet kurioje kitoje cheminėje reakcijoje, produktai lėtina reakcijos greitį ir mažina jos išėigą. Todėl ir citrinų rūgštis biosintezėje yra reakcijos inhibitorius. Iširta, kad citrinų rūgštis slopina reakciją mažindama fosfofruktokinazės aktyvumą. Mažėjant šio glikolizės fermento aktyvumui, mažėja susintetinamas piruvato kiekis, taip pat ir citrinų rūgšties kiekis. Tam, kad fosfofruktokinazės aktyvumas nemažėtų, terpės sudėtyje yra ribojamas mangano jonų kiekis. Patys mangano jonai neįeina į fosfofruktokinazės kofaktorių sudėtį, tačiau, esant mangano jonų trūkumui, baltymai nustoja gamintis ir viduląstelinėje ertmėje padidėja amonio jonų kiekis, kuris geba anuliuoti citrato inhibavimo mechanizmą fosfofruktokinazei [34]. Šitas mangano jonų ribojimas fermentacijos terpėje veikia keleriopai ir visos galimos poveikio priežastys dar nėra žinomos, tačiau, faktas išlieka, kad sumažėjus mangano jonų, padidėja citrinų rūgšties išėiga.

### 1.3.4. Fermentai dalyvaujantys citrinų rūgšties kaupime terpėje

Citrinų rūgšties biosintezėje daugelis faktorių veikia sinergetiškai ir, todėl nustatyti vieno parametro poveikį yra gana sudėtinga. Norint labiau suprasti citrinų rūgšties sintezės mechanizmą buvo atkreiptas dėmesys į patį *Aspergillus niger* genomą. Buvo nustatyta, kad už didelį citrinų rūgšties kaupimą atsakingi keletas genų. Tai patvirtina genominiai tyrimai *Aspergillus niger* kultūrų, kuriose buvo rasta papildomų mitochondrinę oksidoreduktazę ir citrato sintetazę koduojančių genų, o citrato liazės, cis-akonitazės ir izocitrato dehidrogenazės genai buvo mažiau išreikšti. Tolimesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad, į genomą įterpus papildomą fosfofruktokinazės geną citrinų rūgšties išėiga padidėjo 70 % palyginus su kontroline kultūra. Pakeitus mitochondrinę oksidoreduktazę *Aspergillus niger* genome citrinų rūgšties išėiga padidėjo net iki 169,1g/l .

Jau gana ilgą laiką yra žinoma kad susidarantis citratas ir atskylančios ATP molekulės stabdo biosinezę. Dėl šių priežasčių buvo pabandyta nuslopinti polifosfato hidrolizės genus ir tai teigiamai paveikė citrinų rūgšties išėigą, tačiau, šitas metabolinis būdas ir jo įtaka dar nėra iki galo suprasti, todėl tai gali būti potencialus būdas padidinti citrinų rūgšties išėigą ateityje. Ateityje tikimasi citrinų rūgšties gamybos mechanizmą pakreipti taip, kad produktas būtų gaminamas citoplazmoje ir sekretuojamas į terpę. Tai pagerintų proceso išėigą, taip pat palengvintų fermentacijos terpės sudėties kontrolę ir atpigintų patį procesą, nes nebebūtų reikalingas brangus nepageidaujamų jonų pašalinimas iš fermentacijos terpės.

## 1.4. Mikroorganizmai naudojami citrinų rūgšties fermentacijai

Didelis skaičius skirtingų mikroorganizmų gamina citrinų rūgštį. Į šių mikroorganizmų gretas įskaičiuojamos bakterijos, mielės ir, žinoma, mikroskopiniai grybai. Tačiau, iš visų žinomų mikroorganizmų ekonomiškai naudinga išėiga pasižymi tik keletas mikroskopinių grybų iš *Aspergillus* genties ir keletas mielių rūšių [17]. Tik mažas kiekis mikroorganizmų geba kaupti pramoninei fermentacijai tinkamus kiekius, nes citrinų rūgštis yra gaminama energijos metabolizmo metu esant drastiškam maistinių medžiagų imbalansui, kurio kiti organizmai paprasčiausiai netoleruoja. *Penicillium luterum*, *P. purpurogenum*, *P. restrictum*, *P. janthinellum*, *P. citrinum*, *Paecilomyces divaricatum*, *Mucor piriformis*, *Trichoderma viride*, *Sacharomycopsis lipolitica*, *Arthrobacter paraffineus*, *Corynebacterium sp*, *Candida lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. fibriae*, *C. subtropicalix*, *C. oleophila*, *Aspergillus niger*, *A. wentii*, *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. fenicis*, *A. fonsecalus*, *A.*



*fumaricus*, *A. luchensis*, *A. saitoi*, *A. usumii*, šie mikroorganizmai buvo plačiau tyrinėjami ir buvo nustatyta, kad jie kaupia didesnius ar mažesnius citrinų rūgšties kiekius, tačiau, populiariausias mikroorganizmas citrinų rūgšties gamybai išlieka *A. niger* dėl gebėjimo fermentuoti įvairias pigias žaliavas, didelių citrinų rūgšties išeių ir sąlyginai lengvo auginimo proceso [14; 40].

### **1.5. Substratas citrinų rūgšties gamybai**

Paprastai skystos fazės fermentacijai naudojama žaliava turi didelius kiekius monosacharidų arba disacharidų. Tokie substratai dėl savo didelės energetinės vertės paprastai pramonėje atranda ir daugiau panaudojimo sričių nei vien citrinų rūgšties gamybai. Lengvas monosacharidų ir disacharidų bioskaidumas ir panaudojimas metabolizme lemia platų jų panaudojimą ir dėl to padidėja žaliavos kaina. Citrinų rūgštis yra didmeninės gamybos produktas, kurio pridėtinė vertė nėra aukšta, todėl siekiama fermentacijai naudoti kuo pigesnę žaliavą. Mažą žaliavos kainą dažnai diktuoja jos kokybė arba populiarumas kaip fermentacinės žaliavos. Dėl šių priežasčių dažnai fermentacijai naudojami tokie cukrūs, kurie nėra rafinuoti ir savo sudėtyje turi didelį kiekį priemaišų. Viena iš plačiausiai naudojamų žaliavų citrinų rūgšties skystos fazės fermentacijai yra melasa, tačiau, naudojamos ir kitos žaliavos [8]. Melasa yra pašalinis produktas cukraus rafinavimo procese, kuriame susikaupia visi mineraliniai elementai ir druskos. Dėl šių mikroelementų citrinų rūgšties fermentacija tampa sudėtinga panaudojant melasą [5;6].

*Aspergillus niger* yra ypač jautrus kai kurių mikroelementų pertekliui, todėl prieš fermentaciją būtina juos pašalinti [30]. Tai paprastai gali būti atliekama dviem strategijomis. Pirmoji iš jų yra dažniau taikoma. Pagal ją iš melasos yra pašalinami visi fermentacijos procesą stabdantys katijonai jonų mainų kolonomis arba kompleksiniais junginiais surišančiais nepageidaujamus metalų katijonus. Gauta išvalyta melasa naudojama fermentacijai pridėdant reikiamus kiekius būtinų mikroelementų [18]. Toks būdas reikalauja papildomų kaštų jonų mainų kolonų naudojimui, bet užtikrina optimalią fermentacijos sudėtį ir sąlyginai lengvą fermentacijos kontrolę. Kitas galimas žaliavos paruošimo būdas yra terpės sudėties pakoregavimas pagal labiausiai perteklinį komponentą. Tai paprastai būna vienas iš mikroelementų tokių kaip geležis arba manganas. Taikant šių mikroelementų jonų koncentraciją kaip atskaitos ribą yra pridėjama kitų gryntų terpės komponentų ir taip pasiekiami optimali terpės sudėtis. Šis būdas reikalauja didesnės proceso kontrolės ir tikslesnių žaliavos tyrimų, tačiau, yra sąlyginai pigesnis.

### **1.6. Alternatyviosios fermentacijos žaliavos**

Nors melasa ir išlieka labiausiai naudojama žaliava yra ir kitokių žaliavų. Cukraus rafinavimo procesams tampant vis labiau optimizuotais mažėja pašalinio produkto, kuris yra citrinų rūgšties fermentacijos žaliava [24]. Todėl stengiamasi ieškoti vis naujų ekonomiškai prieinamų ir gerai bioskaidžių žaliavų. Viena iš tokių plačiau nagrinėjamų žaliavų yra celiuliozė [14]. Šio polisacharido randama kiekvienoje pasaulio šalyje, nes jis yra pagrindinė augalų struktūrinė dalis. Dėl to biožaliavos auginimo ir transportavimo kaštai stipriai sumažėja. *Aspergillus niger* pasižymi celulaziniu aktyvumu ir todėl gali dalinai suskaidyti celiuliozę turinčią žaliavą iki monosacharidų, kurie gali būti fermentuojami ir sunaudojami citrinų rūgšties gamybai [19]. Nors ir šie filamentiniai grybai pasižymi fermentiniu aktyvumu celiuliozės skaidymui, tačiau, šis aktyvumas yra gana menkas ir neišreikštas. Dėl to iki šiol fermentuojant celiuliozinę žaliavą buvo taikoma kietos fazės fermentacija, kuri trunka ilgiau nei skystos fazės fermentacija ir turi prastesnę citrinų rūgšties išeią.

## 1.7. Fermentinis žaliavos apdorojimas ir fermentacija

Kaip ir buvo minėta dažnu atveju *Aspergillus niger* išskiriami fermentai yra mažo aktyvumo ir dėl to fermentacija gali trukti ilgesnį laiką nei priimtina. Siekiant paskatinti celiuliozės suskaidymą kartais naudojami papildomi fermentai, kurie dar labiau suskaido celiuliozę iki gliukozės molekulių. Dažniausiai naudojama celiulazės, celobiozės, ksilanazės ir kitų didelio aktyvumo fermentų mišinys. Šiais fermentais žaliavą galima suskaidyti prieš fermentaciją arba retesniais atvejais naudoti fermentus fermentavimo metu kartu su filamentiniu grybu. Toks fermentacijos tipas vadinamas vienalaikė cukrinimo ir fermentacijos reakcija. Kai citrinų rūgšties fermentacijai kartu su grybu naudojami fermentai proceso parametrų kontrolei turi būti skiriamas ypač didelis dėmesys, nes net ir menkai pakitus terpės parametrams tokiems kaip rūgštingumas fermentai praranda dalį arba net visą savo aktyvumą. Tačiau, toks procesas gali būti atliekamas nepertraukiamos fermentacijos būdu, kai žaliava yra nuolat tiekiamas, o produktas pašalinamas iš fermentacijos terpės.

## 1.8. Celiuliozinės žaliavos apdorojimas

Apdorojant celiuliozinę žaliavą pirma būtina ją apdoroti fizikiniais procesais, vėliau chemiškai arba fermentais. Dėl to dažniausiai žaliavos apdorojimas prieš fermentaciją atliekamas dviem arba trimis stadijomis. Pirmosios stadijos metu augalo plaušai yra susmulkinami norint padidinti medžiagos paviršiaus plotą. Tai atliekama malimu, sprogdinimu vandens garais, ekstruzija ir kitais fizikiniais žaliavos apdorojimo būdais. Po fizikinio apdorojimo žaliavos cheminė sandara būna nepakitusi ir žaliavoje vis dar yra celiuliozės, hemiceliuliozės ir lignino, kurie yra tinklinės struktūros. Siekiant suskaidyti mikroorganizmui neprieinamas tinklines molekules yra naudojamas cheminis žaliavos apdorojimas. Šio apdorojimo metu didelio paviršiaus ploto žaliava yra veikama temperatūra ir rūgštinės arba šarminės kilmės tirpalais siekiant suardyti celiuliozėje esančius skersinius ryšius [18]. Kartais cheminis ir fizikinis apdorojimai taikomi toje pačioje stadijoje. Suskaidžius skersinius celiuliozės ryšius molekulė iš tinklinės tampa linijine, o šitokią struktūrą geba suskaidyti filamentinio grybo *Aspergillus niger* sekretuojami fermentai [28;33].

## 1.9. Inokulianto sudarymas ir micelių granuliu formavimasis citrinų rūgšties gamybai

Citrinų rūgšties gamybai ypač svarbi *Aspergillus niger* filamentinio grybo tinkama struktūra. Šią struktūrą apsprendžia daugelis veiksnių ir jie, sporas terpėje, veikia sinergetiškai, nors ir vieni parametrai turi didesnę įtaką, nei kiti. Ar fermentacijos metu bus pagaminamas didelis kiekis citrinų rūgšties paprastai galima nuspėti jau pirmosiomis fermentacijos dienomis. Grybų sporoms sudarius filamentines padrikas struktūras arba mažas ne vienodo dydžio granules galima teigti, kad citrinų rūgšties gamybos išeiga bus bloga [11]. Sporoms sudygus ir sudarius 1-2 milimetrų diametro micelių sferines granules, galima tikėtis geros citrinų rūgšties išeigos. Tinkamos micelės granulės turi susidaryti iš tankios hifų struktūros, kurių galuose yra konidijos.

Vienas iš pagrindinių veiksnių tinkamoms micelių granulėms susidaryti yra terpės rūgštingumas [39]. Tinkami rūgštingumo parametrai granuliu susidarymui skiriasi tarp įvairių *Aspergillus niger* mikroorganizmo modifikacijų, tačiau, bendruoju atveju tinkamas terpės pH micelių granulėms susidaryti iš sporų yra tarp 5-6 [31]. Kitas svarbus faktorius yra mikroelementų kiekis, kuris labai priklauso nuo pradinės žaliavos kokybės ir tos žaliavos gryninimo būdų. Mikroelementai įeina į fermentų kofaktorių sudėtį, kurie tiesiogiai atsakingi už reikiamų struktūrų grybo micelėse susidarymą citrinų rūgščiai gaminti. Dėl to esant netinkamai terpės sudėčiai *Aspergillus niger*

struktūros morfologiniai pokyčiai tampa negrįžtami ir fermentacija nevyksta tinkamai [20]. Yra pastebėjimų, kad kartu su mikroelementais svarbūs ir tokie jonai kaip amonio, fosfato ir ciano. Ciano jonai nėra pageidaujamas pašalinis priedas fermentacijos produkte, tačiau, sudarant inokuliatą ir siekiant užauginti tinkamos struktūros filamentinio grybo micelines granules skystoje terpėje yra tikslinga į terpės sudėtį įtraukti ir tokius junginius kaip kalio ferocianatą. Šis kompleksinis junginys kartais tikslingai pridedamas ir į fermentavimo terpę, kai naudojama prastesnės kokybės žaliava, nes jis pasižymi chelatinimu ir gebėjimu surišti perteklinius geležies ir mangano divalenčius jonus. Taip pat svarbus veiksnys tinkamoms micelinių granulėms susidaryti yra terpės aeravimas. Nesant pakankamai aeracijai *Aspergillus niger* neauga, nes šis mikroorganizmas priklauso aerobinių mikroorganizmų grupei. Tačiau, esant per dideliame terpės aeravimui sumažėja anglies fiksacija ir dėl to žymiai sumažėja augimo greitis, todėl aeravimas turi būti optimalus. Su aeravimu susijęs veiksnys yra terpės maišymas. Kada naudojami fermentatoriai, kuriuose maišymo funkciją atlieka oras ši problema retai pasitaiko, tačiau, maišant maišyklė ji gana dažna. Esant per dideliame maišymo greičiui micelių granulės nespėja susidaryti ir padirki filamentiniai hifai yra disperguojami terpėje. Todėl pramonėje dažnai pasirenkami airliftiniai fermentatoriai. Sporų amžius taip pat turi įtakos tinkamam inokuliatui susidaryti. Kartais nėra tikslinga kiekvieno inokulianto sudarymo metu naudoti naujai pasėtas grybo kultūras ir nuo jų nuplautas sporas, todėl sporų suspensija yra saugoma paviršiaus aktyviosios medžiagos vandeniniame tirpale. Taip saugant sporas jų aktyvumas mažėja, tačiau, tai ekonomiškai efektyvesnis būdas, kai fermentacijai reikalingas dažnas inokulianto sudarymas. Atlikus tyrimus buvo nustatyta, kad sporų aktyvumas pradeda mažėti po 2 saugojimo dienų ir per pirmąsias 15 dienų sumažėja 24 %, laikant suspensiją 4 °C temperatūroje. Tiesa, aktyvumas nuo 15 iki 30 mažėja ne taip žymiai. Sporų aktyvumas priklauso ir nuo to kada yra paimamas mėginys nuo *Petri* lėkštelių. Optimalus laikas sporų suspensijai suformuoti yra 3-4 dienos. Sporoms augant lėkštelėse trumpesnį laikotarpį jos nespėja iki galo susiformuoti ir subręsti, o laikant lėkšteles dar ilgiau nei 4 dienas sporų aktyvumas ima mažėti ir jos degraduoja.

## **1.10. Fermentacijos būdai citrinų rūgšties gamybai**

### **1.10.1. Paviršinė fermentacija**

Paviršinė fermentacija yra vienas iš paprasčiausių ir pigiausių fermentacijos būdų, kai yra gaminama citrinų rūgštis. Šis gamybos būdas yra seniausias iš visų citrinų rūgšties fermentavimo būdų, bet dėl mažo efektyvumo, ilgo fermentavimo laiko ir didelės priežiūros reikalavimų yra mažai naudojamas. Šio proceso metu yra naudojami žemam terpės pH atsparūs negilūs lovėliai. Lovėliai turi būti pagaminti iš plastikų arba legiruoto plieno tam, kad į terpę neišskirtu metalų jonų dėl rūgščios terpės poveikio. Lovėliuose terpės yra iki 10 centimetrų gylio, o ant šios terpės paviršiaus susiformuoja 2-3 centimetrų micelinis *Aspergillus niger* biomasės sluoksnis. Lovėliuose yra apie 50-100 litrų fermentavimo terpės, o iš vieno kvadratinio metro terpės kasdien galima išgauti 1,2-1,5 kg citrinų rūgšties monohidrato. Fermentavimo metu lovėliai yra patalpinami į specialią talpą kurioje palaikoma tinkama fermentacijai temperatūra, tiekiamas sterilus oro srautas ir palaikoma optimali aplinkos drėgmė. Kadangi *Aspergillus niger* grybas yra priskiriamas prie aerobinių mikroorganizmų jam būtinas tinkamas terpės aeravimas, o esant didesnei nei 10% anglies dioksido koncentracijai terpėje fermentacija gali visiškai sustoti. Tiekiamo oro srauto debitas yra gana didelis ir visas patenkantis oras turi būti išvalytas, todėl tai technologiškai apsunkina procesą ir padidina gamybos kaštus. Biologiškai švarus oras ypač svarbus pradinėse fermentavimo stadijose, nes šios stadijos metu terpės pH yra nustatoma tarp

6,0-6,5, o tai lemia didelę užkrato galimybę kitais mikroorganizmais, dėl kurių substratas būtų sunaudojamas ne tikslingai ir sumažėtų fermentavimo efektyvumas. Sporoms sudyigus ir prasidėjus fermentacijai terpės pH drastiškai sumažėja, šioje fermentavimo etapo dalyje pašalinis užkratas mažai tikėtinas. Gamybos procesas yra atliekamas partijomis (batch), o tai padidina sterilinimo reikalavimus prieš kiekvieną fermentaciją [13]. Gautas produktas yra ištirpęs terpėje, tačiau, nemaža dalis citrinų rūgšties pasilieka viduląstelinėje erdmėje, todėl siekiant didesnės išieigos biomasė yra filtruojama presuojant.

Paviršinės fermentacijos procesas reikalauja mažesnės terpės sudėties kontrolės, o įdiegimo kaštai gana maži, tačiau, šis būdas reikalauja daug darbo jėgos dėl ko išauga išlaikymo kaštai. Fermentacijos trukmė siekia 8-14 dienų priklausomai nuo terpės sudėties ir fermentavimo parametru, bet gaunama citrinų rūgšties išeiga siekia tik 70-80 % teorinės citrinų rūgšties išeigos.

### **1.10.2. Kietos fazės fermentacija**

Kietos fazės fermentacijos metu, kitaip žinomos kaip Koji fermentacija, substratui naudojamos kietos žemės ūkio kilmės atliekos, kurios savo sudėtyje turi didelį drėgmės kiekį [10]. Dažniausiai pasirenkamos tokios žaliavos, kurios savo sudėtyje turi monosacharidų tai, dažniausiai, yra vaisių ir daržovių žievelės ir išspaudos. Retesniais atvejais panaudojami ir polisacharidai esantys žaliavoje, tokiu atveju yra naudojami fermentai  $\alpha$ -amilazės, kurie skaido krakmolingą žaliavą. Fermentacijos metu mikroorganizmo sporos ant kietos fermentavimo žaliavos pasėjamas aerolio pavidalu [15].

Koji fermentacijos svarbiausias privalumas yra platus fermentuojamos žaliavos spektras iš kurio nėra būtinumo pašalinti mikroelementus. Nors toks fermentacijos būdas turi mažesnę įtaką *Aspergillus niger* augimui dėl mikroelementų kiekio, tačiau, kiti parametrai turi būti palaikomi, o tai reikalauja fermentatorių ir proceso geros kontrolės [3]. Dėl didelio paviršiaus ploto padidėja reakcijos greitis, bet padidėja ir drėgmės praradimas, todėl būtina užtikrinti pastovų aplinkos drėgnumą tam, kad substratas neprarastų drėgmės. Substrato drėgnis turi būti palaikomas 65-70 % . Nors ir drėgmės reikalavimai fermentacijai yra gana dideli šitoks fermentacijos būdas sunaudoja mažiau vandens nei skystos fazės fermentavimo būdas. Fermentacija paprastai trunka 5-8 dienas, o jos metu terpės pH sumažėja iki 2. Šis procesas patrauklus savo įrangos paprastumu ir įvairių žaliavų prieinamumu, tačiau, maistinės medžiagos esančios žaliavoje nėra iki galo sunaudojamos fermentacijos mikroorganizmo, o tai žymiai sumažina reakcijos išeigą ir atsiperkamumą. Tikslinis produktas išgaunamas filtruojant ir presuojant fermentacinę terpę.

### **1.10.3. Skystos terpės fermentacija**

Fermentacija skystoje terpėje yra pats populiariausias būdas citrinų rūgščiai gaminti. Skystos fazės fermentacijos būdu pagaminama daugiau kaip 80 % visos pasaulyje suvartojamos citrinų rūgšties. Fermentacija vykdoma fermentatoriuose kurių tūris priklauso nuo fermentatoriaus tipo. Mechaninio maišymo fermentatoriai paprastai būna mažesnio tūrio, tai yra, 120–250 m<sup>3</sup>, o airliftiniuose fermentatoriuose tūris gali siekti 900 m<sup>3</sup> [9]. Airliftiniai fermentatoriai yra efektyvesni dėl geresnio deguonies ištirpimo, todėl galima fermentuoti didesnę tūrį žaliavos. Visa citrinų rūgšties fermentacijai naudojama įranga turi būti pagaminta iš legiruoto plieno ar kitos rūgščioje terpėje nedegraduojančios medžiagos. Svarbu kad aparatūros struktūrinei elementai netirptų rūgščioje fermentavimo terpėje ir taip nepakeistų terpės sudėties pertekliniais mikroelementais, nes tai galimai pablogintų citrinų rūgšties išeigą [41]. Fermentacinė terpė turi

būti gerai aeruojama, nes *A. niger* yra aerobinis mikroorganizmas kuriam būtinas deguonis. Fermentatoriuje deguonies koncentracijai sumažėjus žemiau 20 % citrinų rūgšties gamyba sustoja. Siekiant to išvengti turi būti palaikomas pastovus terpės aeravimo greitis kuris yra 0,2-1,0 vvm [5].

Vienas iš antrinių požymių indikuojantis tinkamą citrinų rūgšties gamybos greitį yra susiformavusių micelių granulių dydis. Tinkamo dydžio laikomos 0,5-1,0 mm diametro sferinės micelės su didelio tankio viduriniu hifų sluoksniu ir išsišakojusiu išorinio. Šių granulių dydis gali būti kontroliuojamas Fe/Cu jonais, tačiau, šių jonų net ir nedidelis perteklius gali stabdyti citrinų rūgšties išskyrimą į terpę, todėl pramonėje dažnai naudojama dviejų fermentatorių taktika. Pirmajame fermentatoriuje suformuojamas inokuliatas, kurį sudaro 0,5-1,0 mm micelinės granulės, tam mikroorganizmas paveikiamas Fe/Cu jonais ir fermentacija vykdoma kol susiformuoja tinkamas biomasės kiekis. Šiame fermentatoriuje terpėje taip pat yra cianido jonų ir nustatytas mažesnis aeravimo greitis, bei maišymas, tam kad nebūtų suardytos besiformuojančios micelių granulės. Į antrąjį fermentatorių yra perkeliamas inokuliatas ir pradedama citrinų rūgšties fermentacija. Citrinų rūgšties gamybos fermentatoriuje yra ribojama mikroelementų koncentracija kuri skatintų biomasės augimą. Inokulianto fermentatorius yra žymiai mažesnis lyginant su citrinų rūgšties fermentatoriumi ir sudaro tik 1/10 jo tūrio dalį.

Fermentavimui naudojamos anglies šaltiniai savo sudėtyje turi mikroelementų priemaišų, kurios stabdo fermentaciją, todėl naudojamos jonų mainų kolonos arba kalio ferocianidas šiems mikroelementams pašalinti. Prasidėjus citrinų rūgšties gamybai substrato suvartojimas tampa žymus ir lengvai nustatomas fotometrinėmis kiekybinėmis reakcijomis. Išskiriama citrinų rūgštis taip pat gana drastiškai sumažina terpės pH. Visą likusį fermentavimo laikotarpį terpės rūgštingumas dažniausia išlieka žemesnis nei pH 2 vertė. Tokioje terpėje gali išgyventi nedaugelis mikroorganizmų, todėl užkrato tikimybė pašalinėmis kultūromis priartėja prie nulio. Dėl didelio fermentacijos tūrio gamybos procesas labiau atsparus terpės pokyčiams, todėl gali būti panaudojama įvairesnė žaliava. Tačiau, kartais susidaro putos kurias būtina pašalinti mechaninėmis putų šalinimo priemonėmis arba priedais tokiais kaip augalinės kilmės riebalai, kurie pakeistų paviršiaus įtempį. Dėl sudėtingesnės fermentavimo įrangos reikia didesnių intelektinių išteklių valdyti procesą, bet gaunama citrinų rūgšties išeiga po 7-10 dienų fermentavimo siekia 70-90 %.

#### **1.10.4. Vienalaikė sacharifikacijos ir fermentacijos reakcija**

Ši reakcija yra efektyviausias būdas citrinų rūgščiai gaminti iš lignoceliuliozinės žaliavos. Šiame fermentacijos metode vienu metu vyksta du procesai, tai yra lignoceliuliozinės žaliavos skaidymas fermentais ir citrinų rūgšties gamyba iš suskaidytos žaliavos. Fermentacinė žaliava prieš fermentaciją yra apdorojama sieros rūgšties tirpalu ir šios rūgštinės hidrolizės metu lignoceliuliozėje nutrūksta skersiniai ryšiai, tai leidžia fermentams efektyviai vykdyti skaidymą fermentacijos metu, kai yra naudojami tik fermentai, kaip ir bet kurioje kitoje reakcijoje, ribojantis veiksnys stabdantis fermentų veiklą yra reakcijos produktai, kurių didžiąją dalį šiuo atveju sudaro gliukozė [27]. *A. niger* gliukozę pasisavina ir taip įgalina fermentus toliau skaidyti pradinį substratą [16]. Kadangi gliukozės suvartojimas citrinų rūgšties gamybai mažesnis nei fermentų pagaminamas gliukozės kiekis filamentinis grybas nepritrūksta substrato citrinų rūgšties gamybai. Reakciją lėtina tik temperatūriniai parametrai. Fermentų optimali veikimo temperatūra yra maždaug 50 °C, o optimali *Aspergillus niger* augimo temperatūra yra 25-30 °C dėl to SSF vykdoma 35 °C temperatūroje [11]. Dėl didesnių žaliavos dalelių esminis parametras turintis įtaką

reakcijos kokybei yra aeravimo režimas. Tinkamas aeravimo režimas reikalingas ir tam, kad užtikrinti pakankamą deguonies kiekį aerobiniam *A. niger* mikroorganizmui. Deguonies pasisavinimą visame fermentacinės terpės tūryje stabdo tarp substrato dalelių susidarantys filamentinio grybo hifai, nors ir hidrolizuojamos lignoceliuliozės klampa mažėja. Tačiau, užtikrinus tinkamą aeravimo režimą, kai fermentacijos terpėje yra iki 30 % celiuliozinės žaliavos gaunama 136,3 g/l citrinų rūgšties. Ekonomiškai efektyvesnis metodas sudaromas tada kai į fermentacijos terpėje yra iki 25 % lignoceliuliozinės žaliavos, tokiu atveju fermentacija trunka tik 168 h, o gaunama citrinų rūgšties išeiga siekia 120 g/l. Taikant atskirus skaidymo fermentais ir citrinų rūgšties procesus gaunama reakcijos išeiga yra mažesnė, o suvartojamo vandens ir energijos kiekiai didesni nei SSF. Preliminariais skaičiavimais iš lignoceliuliozinės žaliavos gaunamos citrinų rūgšties kilogramo kaina yra \$0,603 [37]. Šitoks fermentavimo efektyvumas kartais pranoksta net ir tradicinius fermentavimo būdus, kuriuose panaudojamos monosacharidinės arba disacharidinės žaliavos ir todėl suformuoja konkurencingą produkto kainą [26].

## **1.11. Faktoriai turintys įtaką citrinų rūgšties gamybai**

### **1.11.1. Anglies šaltinis**

Citrinų rūgšties fermentacijai kaip substratą *Aspergillus niger* panaudoja mono arba disacharidus [2]. Gebėjimo pasisavinti polisacharidus filamentinis grybas neturi, tačiau, yra keletas modifikuotų mikroorganizmo variacijų kurios turi gerai išreikštus fermentus įgalinančius suskaidyti polisacharidines žaliavas už ląstelės ribų fermentacinėje terpėje. Dažniausiai fermentacijai pasirenkama naudoti yra gliukozė kuri gaunama iš krakmolo jį prieš tai hidrolizavus fermentais, tačiau, gliukozė gali būti ir kitokios kilmės. Fermentacijai tinka ir sacharozė arba fruktozė, tačiau šios naudojamos rečiau dėl žaliavose esančių priemaišų. Paprastai citrinų rūgšties gamybai pasirenkamos žaliavos nėra labai grynos, dėl gryninimui reikalingų papildomų išteklių, tačiau, krakmolo hidrolizės metu susidaranti gliukozė savo sudėtyje turi mažai fermentaciją stabdančių priemaišų todėl yra labiausiai priimtina žaliava. Kaip alternatyvus anglies šaltinis naudojama ir melasa, tačiau, dėl joje esančių priemaišų fermentacija vykdoma sunkiau ir reikalauja papildomų gryninimo žingsnių. Melasoje paprastai yra susikaupęs didelis kiekis katijonų kurie turi būti pašalinami jonų mainų kolonomis arba surišami kalio ferocianatu [13]. Citrinų rūgšties gamybai reikalinga didelė anglies šaltinio koncentracija terpėje. Esant didelei cukraus koncentracijai terpėje sustabdoma  $\alpha$ -ketogliutarato dehidrogenazės veikla Krebso cikle, o tai leidžia prasidėti citrinų rūgšties gamybai, nes citratas nebėra sunaudojama medžiaga, o yra sekretuojama į fermentacijos terpę. Dėl šios priežasties substrato koncentracija fermentacijos terpėje turi būti 14–22%. Cukraus koncentracijai sumažėjus iki 2,5% citrinų rūgšties gamyba sustoja. Dėl didėjančių žaliavos kainų pramonėje ieškoma alternatyvių žaliavų šaltinių citrinų rūgšties gamybai ir viena iš tokių žaliavų yra lignoceliuliozės hidrolizatas. Iš lignoceliuliozės gaunamas cukrus ją suskaidant celulaze, o jį lengvai pasisavina *A.niger* [12].

### **1.11.2. Azoto ribojimas**

Azotas yra viena iš esminių struktūrinių elementų *Aspergillus niger* micelių susiformavimui. Azotas įeina į struktūrinių baltymų sudėtį, todėl esant jo trūkumui nesusiformuos tinkamos micelių granulės, o esant jo pertekliui susiformuos per didelė biomasė ir nesusiformuos micelių granulės

tinkamos citrinų rūgšties gamybai. Tai pat terpėje esant azoto pertekliui susidaro oksalo rūgštis kuri yra nepageidautinas produktas citrinų rūgšties gamyboje. Azoto koncentracijai fermentacijos terpėje viršijus 0,25% sudėties ima formuotis nepageidaujama oksalo rūgštis. Oksalo rūgšties koncentracija yra ribojamas galutiniame produkte, nes didesnė šios rūgšties koncentracija gali sukelti virškinimo susirgimus vartojant maistą.

Tinkamiausia forma *Aspergillus niger* azoto pasisavinimui yra laikomas azotas esantis amonio jonų sudėtyje. Todėl terpės sudėties tinkamiems parametrams nustatyti yra naudojamas amonio sulfatas. Retesniais atvejais naudojamas ir amonio nitratas, tačiau, jis dažniau siejamas su per dideliu biomasės formavimusi fermentacijos metu. Naudojant ne grynus reagentus, o fermentacines žaliavas papildomas azoto šaltinis retai kada naudojamas, nes pakankamas amonio jonų kiekis randamas žaliavoje.

### 1.11.3. Fosforo ribojimas

Fosforas ir azotas *Aspergillus niger* biomasės augimą veikia sinergetiškai. Fosforo kiekis fermentacijos terpėje kaip ir azoto kiekis turi būti ribojamas. Esant fosforo pertekliui prasideda perteklinis biomasės augimas ir susidaro nepageidautinų organinių rūgščių sintezė, nes fosforas svarbus Krebso ciklo fermentų veiklai. Tinkamiausias fosforo šaltinis *A.niger* yra pasisavinamas fosfato jonų pavidalu. Dažniausiai naudojamas priedas tinkamam fosforo kiekiui fermentavimo terpėje palaikyti yra kalio dihidrofosfatas. Priklausomai nuo to koks fermentacijos būdas pasirenkamas reikiamo fosforo kiekiai svyruoja, tačiau, jo koncentracija terpėje turi būti 0,5 ir 5,0 g/l. Kietos fazės fermentacijoje reikalingas didesnis kiekis fosforo, nei skystos fazės fermentacijoje. Didelis poreikis siejamas su lėtesne medžiagų apykaita fermentuojamoje terpėje ir lėtesniu medžiagų pasisavinimu.

### 1.11.4. Mikroelementai

Citrinų rūgšties fermentacijai labai svarbi terpėje esančių mikroelementų koncentracija, nes šie veikia kaip fermentų dalyvaujančių Krebso cikle kofaktoriai. *Aspergillus niger* ypač jautrus divalenčių metalo jonų koncentracijai [1]. Labiausiai neigiamai citrinų rūgšties išėigą veikia geležies ir mangano jonai, tačiau, svarbūs ir vario, magnio bei cinko jonai. Jautrumas mikroelementų kiekiui priklauso nuo fermentavimo tūrio ir medžiagų prieinamumo, todėl skystos fazės fermentacija yra jautresnė terpės pokyčiams lyginant su kietos terpės fermentacija. Optimaliomis sąlygomis *Aspergillus niger* fermentacijos terpėje turi būti 0,3 ppm cinko, 1,3 ppm geležies ir 0,256 ppm vario. Esant tokiems parametrams susiformuoja ir yra palaikoma tinkama micelių granulių struktūra ir dydis, o fermentacijos išėiga maksimizuojama ir palengvėja produkto atskyrimas nuo filamentinio grybo. Padidėjus bent vienam mikroelemento kiekiui nebepasiekiamas maksimali fermentacijos išėiga [21].

Manganas reikalingas ląstelių sienelių, antrinių metabolitų ir sporų susidarymui tinkamam susidarymui, jo koncentracijai viršijus 3 ppm koncentracijos ribą pradeda formuotis per didelis biomasės kiekis, o koncentracijai padidėjus 10 mg/l citrinų rūgšties išėiga sumažėja 50%. Padidėjus geležies divalenčių jonų koncentracijai terpėje įaktyvuojama akonitazė. Šis Krebso ciklo fermentas susidaranti citratą verčia į akonito rūgštį kuri yra nepageidaujamas produktas citrinų rūgšties gamybos metu, o taip pat ženkliai sumažėja citrinų rūgšties išėiga. Fermentacijos metu susidaranti rūgšti terpė geba iš metalinių paviršių išplauti šiuos mikroelementus, todėl būtina

fermentacijos talpas parinkti iš rūgštims atsparios medžiagos ir kontroliuoti fermentacijos terpės sudėtį.

### **1.12. Literatūros apžvalgos apibendrinimas**

Citrinų rūgštis- tai trikarboksilinė rūgštis, kuri yra plačiai naudojama įvairiose pramonės srityse. Taip pat ši rūgštis susidaro kiekviename organizme Krebso ciklo metu, citrato sintetazei veikiant acetic-CoA ir oksalo acetatą. Jos paklausa kiekvienais metais auga. Vidutiniškai kasmet pagaminamas citrinų rūgšties kiekis išauga 3-4%, o rinkos vertė jau 2016 m. siekė 2,89 milijardo JAV dolerių. Didėjant paklausai atsiranda vis daugiau gamyklų, kurios gamina citrinų rūgštį todėl būdai leidžiantys optimizuoti citrinų rūgšties fermentacijos procesą yra ypač svarbūs. Daugiausia citrinų rūgštis gaminama fermentavimo būdu. Daugelio mokslininkų tyrimais nustatyta, kad daugiausiai citrinų rūgšties produkuoja *Aspergillus niger* grybas, kuomet terpėje yra didelis substrato kiekis. Todėl būtent šis filamentinis grybas naudojamas citrinų rūgšties fermentavime. Siekiant gauti geriausiai kauptų ir citrinų rūgšties kiekio santykį kaip žaliava naudojamos ramoninės atliekos, kurios savo sudėtyje turi didelį kiekį anglies junginių, kuriuos galima panaudoti citrinų rūgšties gamybai. Dėl atrandamų naujų galimų žaliavų, panaudojant papildomus fermentus, fermentacijai, tokių kaip popieriaus atliekos ar šiaudai atsiranda galimybė citrinų rūgšties gamybai ir šalyse kuriose plačiai vystoma žemdirbystė, tokiose kaip Lietuva.





## 2.3. Tyrimams naudotos medžiagos

### 2.1 lentelė. Naudotos medžiagos.

Reagento pavadinimas	Cheminė formulė	Gamintojas
Sacharozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Eurochemicals, Lietuva
Natrio nitratas	$NaNO_3$	Eurochemicals, Lietuva
Gliukozė	$C_6H_{12}O_6$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Natrio šarmas	$NaOH$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Fruktozė	$C_6H_{12}O_6$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Maltozė	$C_{12}H_{22}O_{11}$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Sieros rūgštis	$H_2SO_4$	Lach-Ner, Čekija
Acto anhidridas	$C_4H_6O_3$	Eurochemicals, Lietuva
Agaras	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Piridinas	$C_5H_5N$	Eurochemicals, Lietuva
Magnio sulfatas	$MgSO_4$	Eurochemicals, Lietuva
Mangano sulfatas	$MnSO_4$	Lach-Ner, Čekija
Amonio sulfatas	$(NH_4)_2SO_4$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Geležies sulfatas	$FeSO_4$	Eurochemicals, Lietuva
Kalio divandenilio fosfatas	$KH_2PO_4$	Eurochemicals, Lietuva
Dikalio vandenilio fosfatas	$K_2HPO_4$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Sojos peptonas		Liofilchem, Italija
Tween-80		SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Kalio ferocianatas	$K_3Fe(CN)_6$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Kalcio oksidas	$CaO$	Eurochemicals, Lietuva
DNS	$C_7H_4N_2O_7$	SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Kalio Natrio tartratas	$KNaC_4H_4O_6$	Eurochemicals, Lietuva
Natrio šarmas	$NaOH$	Eurochemicals, Lietuva
Celiuliazė		SIGMA-ALDRICH, Vokietija
CeluStar XL		Dyadic Internationa, JAV

Natrio citratas	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	Lach-Ner, Čekija
Citrinų rūgštis	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Eurochemicals, Lietuva
Bulvių dekstrozės agaras		SIGMA-ALDRICH, Vokietija
Kalcio hidroksidas	$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Eurochemicals, Lietuva
Natrio karbonatas	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Labochema, Lietuva
Etilacetatas	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	Eurochemicals, Lietuva
Vario sulfatas	$\text{CuSO}_4$	Eurochemicals, Lietuva

## 2.4. Tyrimo metodai:

### 2.4.1. Tinkamo sporų kiekio į fermentavimo terpę pasėjimas

Sporos fermentavimo terpės pasėjimui naudojamos iš užaugintų *Petri* lėkštelėse *Aspergillus niger* kolonijų. Įprastai sporos į fermentacijos terpę pasėjamos sporų suspensijos formoje. Norint sporas suspenduoti tirpale reikalinga naudoti paviršiaus aktyvias medžiagas, nes naujai užaugintos grybų kultūros paviršius pasižymi hidrofobinėmis savybėmis. Kultūros paviršiaus hidrofobiškumas sumažinamas panaudojant 0,01 % Tween-80 tirpalą. Šio tirpalo ant vienos *Petri* lėkštelės užpilama 10-15 ml. *Petri* lėkštelės paviršius lengvai pajudintas sėjimo kilpele norint nuo konidijų nupurtyti prikibusias sporas. Susidariusi sporų suspensija prafiltruojama pro stambios frakcijos filtrą, taip pašalinamos pašalines priemaišos ir terpės likučiai. Ištiriama sporų suspensijos šviesos sugertis 550nm šviesos bangos ilgyje. Šviesos sugertis ištiriama spektrofotometru "Shimadzu UV-1280". Šviesos sugertis tiesiogiai priklauso nuo sporų kiekio suspensijoje. Optimalia sporų suspensijos sugertimi priimta laikyti 1,150 A. Toks suspensijos šviesos sugėrimas artimiausiai atitinka rekomenduojamą  $10^6$  sporų/ml sporų suspensijos koncentraciją. Esant didesnei sporų koncentracijai suspensija praskiedžiama distiliuotu vandeniu iki tinkamos šviesos sugerties. Fermentacijos pradinių parametrų atsikartojamumui užtikrinti į 50 fermentavimo terpės tūrio dalių pasėjama 1 gautos sporų suspensijos tūrio dalis.



**2.2 pav.** Ant standžios terpės užaugintos *Aspergillus niger* mikroorganizmas.

#### **2.4.2. Citrinų rūgšties gavimas iš sacharidų:**

*Aspergillus niger* fermentacija atliekama termostatuojamame kratytuve „BIOSAN ES-20“ esant 28-30°C laipsnių temperatūrai ir vykstant maišymui 190 apsisukimų per minutę greičiu. Fermentacija vykdoma rūgštims atspariose talpose, tai yra, stiklinėse kolbose. Kadangi fermentuojamas mažas terpės tūris, deguonis papildomai netiekiamas į terpę, nes paviršiaus ploto ir tūrio yra pakankamas dujų mainams vykti.

Fermentacijai naudojama skysta sintetinė terpė rekomenduojama citrinų rūgšties gamybai P.Chellapandi knygoje [ Laboratory Manual in Industrial Biotechnology ]. Šios terpės rūgštingumas pradžioje fermentacijos nustatomas 5-6 naudojant sieros rūgšties tirpalą ir pH-metrą „WinLab“. Toks terpės rūgštingumas nustatomas siekiant paskatinti sporų sudygimą ir biomasės augimą. Terpės komponentinė sudėtis pateikta 2.2 lentelėje. Siekiant nustatyti tinkamiausią anglies šaltinį naudota sacharozė, maltozė, celiuliozės hidrolizatas, fruktozė. Papildomų terpės komponentų koncentracija ir sudėtis visiems tinkamų anglies šaltinių bandymas naudoti tokie patys. Anglies šaltinių koncentracija nekeista ir išlaikyta tokia kaip rekomenduojama „Laboratory Manual in Industrial Biotechnology“ knygoje, tai yra 12 g, kai fermentacijos terpės tūris lygus 100 ml. Fermentacijos metu susidariusios citrinų rūgšties kiekis, likęs substrato kiekis ir terpės pH nuolat stebimi aprašytais metodais ir duomenys fiksuojami pasikartojančiais laiko intervalais. Tyrimais nustatė, kad citrinų rūgšties koncentracija terpėje ima mažėti, fermentacija yra nutraukiama ir užfiksuojamas fermentacijos laikas reikalingas didžiausiai citrinų rūgšties išeigai gauti. Pasirinkus tinkamiausią anglies šaltinį fermentacija toliau vykdoma naudojant pramonines atliekas, kuriose yra tikslinio anglies šaltinio.

## 2.2 lentelė. Fermentacijos skystoje fazėje mitybinė terpė

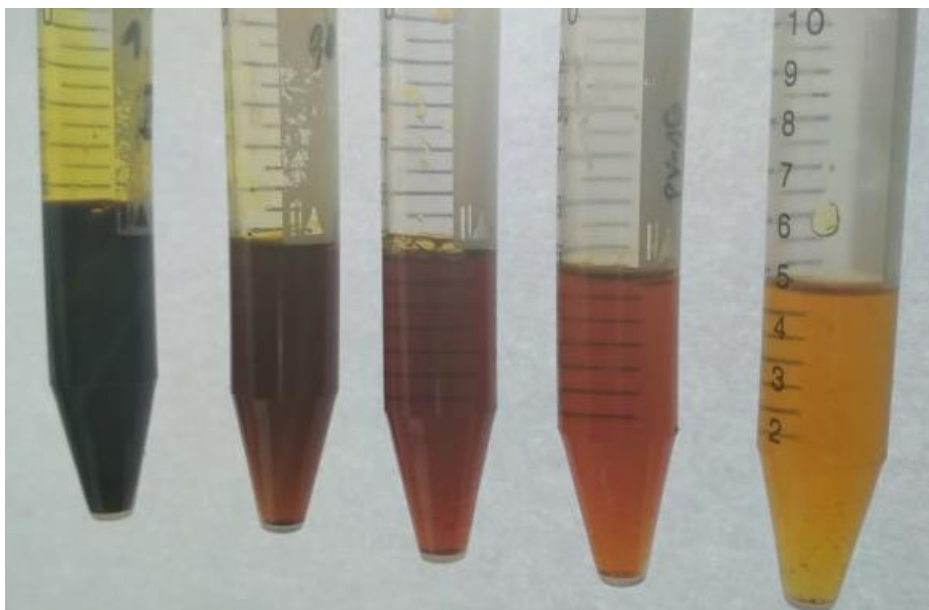
Medžiaga	Kiekis
gliukozė	12 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
MgSO <sub>4</sub>	10 mg
FeSO <sub>4</sub>	1 mg
MgSO <sub>4</sub>	1 mg
H <sub>2</sub> O	100 ml

### 2.4.3. Citrinų rūgšties koncentracijos nustatymas

Citrinų rūgšties koncentracija terpėje buvo tiriama spektrofotometriniais metodais panudojant spalvines reakcijas, kurių intensyvumas tiesiogiai koreliavosi su citrinų rūgšties koncentracija. Rusva spalva tiriamame mėginyje susidaro sumaišius su acto anhidridą, piridiną ir bandinį kuriame yra citrinų rūgšties. Priklausomai nuo to kiek stiprus spalvos intensyvumas pradinis mėginys praskiedžiamas atitinkamai ir reakcija pakartojama, o gautas spalvotas tirpalas ištiriamas spektrofotometru “Shimadzu UV-1280” 420nm bangos ilgyje.

Tyrimui naudojamas 1 ml filtruotos skystos terpės, kuri sumaišoma su 1ml piridino, o po poros minučių įpilama ir 5 ml acto anhidrido. Visas mėgintuvėlio turinys sumaišomas ir kaitinamas vandens vonelėje „BIOSAN BWT-U” 32 °C temperatūroje. Praėjus skirtingam laiko tarpui visa mėginyje esanti citrinų rūgštis sureaguoja sudarydama rusvos spalvos tirpalą. Tiriama mėginiai paliekami kelioms minutėms atvėsti ir išmatuojami spektrofotometru naudojant kvarcines kiuvetes. Gautas rezultatas prilyginamas iš anksto sudarytai kalibracinei kreivei ir pagal tai apskaičiuojamas fermentavimo terpėje esantis citrinų rūgšties kiekis.

Kalibracinė kreivė sudaroma ištiriant žinomos koncentracijos citrinų rūgšties vandeninius tirpalus. Šie tirpalai ištiriami aprašytu būdu ir pagal tai kaip kinta šviesos sugertis braižoma sugerties priklausomybė nuo citrinų rūgšties koncentracijos tirpaluose.



**2.3 pav.** Citrinų rūgšties koncentracijos nustatymo reakcija su skirtingos koncentracijos fermentacinės terpės tirpalais.

#### **2.4.4. Alternatyvus metodas citrinų rūgšties nustatymui**

Citrinų rūgštis reaguoja su vario (II)- amonio jonų spalvotu kompleksiniu junginiu sudarydamas skaidrius junginius. Šie junginiai mažina šviesos sugertį ir skaidrina tiriamą tirpalą, pagal tai galima nustatyti citrinų rūgšties kiekį terpėje. Reaguojant vario- amonio kompleksui su citrinų rūgštimi susidaro vario- citrato kompleksas, kurio spalva yra šviesesnė ir skiriasi nuo pradinio reagento spalvos. Siekiant ištirti sureagavusio reagento kiekį ir susidariusio vario-citrato komplekso kiekį tirpalų šviesos sugertis matuojama prie skirtingų šviesos bangos ilgių. Tokiu būdu sumažinama galimybė, kad kitos terpės sudėtinės medžiagos iškreips bandymų duomenis.

Tyrimui paruošiamas vario komplekso tirpalas sumaišant 2,4968 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 4,28 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 6 ml koncentruoto amoniako ir ištirpinant medžiagas 50 ml distiliuoto vandens. Reagento pH nustatomas su 1 M NaOH iki 9 reikšmės, o visas tirpalo tūris papildomas iki 100ml distiliuotu vandeniu. Iš fermentavimo terpės paimamas 2 ml mėginys ir sumaišomas su vario kompleksu, bendras mėgintuvėlio tūris papildomas distiliuotu vandeniu iki 10 ml žymos. Reakcija vykdoma 5 minutes kambario temperatūroje. Reakcijai įvykus bandinys išmatuojamas spektrofotometru “Shimadzu UV-1280” dviems skirtingais bangos ilgiais, tai yra nustatius sugertį 600 nm bangos ilgyje ir 750 nm bangos ilgyje. Gauti rezultatai palyginami su sudarytomis kalibracinėmis kreivėmis iš žinomų koncentracijų citrinų rūgšties tirpalų, ištirtų šiuo metodu.

#### **2.4.5. Cukraus kiekio nustatymas pagal P.Chellapandi**

Tiriant cukraus kiekį terpėje naudojamas šviežiai paruoštas reagentas reaguojantis su terpėje esančiais monosacharidais. Šis reagentas paruošiamas sumaišant du tirpalus A) ir B). Tirpalas A) paruošiamas sumaišant vieną gramą 3,5-dinitrosalicilo rūgšties (DNSA) su 40 ml 1 N NaOH tirpalu. Tirpinant DNSA būtina tirpalą palengva šildyti ir nuolat maišyti, tol kol ištirpsta visos nuosėdos ir tirpalas tampa skaidrus. Jei tirpalo temperatūrai pasiekus 70 °C tirpalas nenuskaidrėjo patartina į jį pripilti dar papildomus 20 ml distiliuoto vandens. Tirpalas B) paruošiamas ištirpinant 30 g kalio natrio tartrato 30 mililitrų karšto distiliuoto vandens. Paruošti A) ir B) tirpalai sumaišomi ir bendras reagento tūris papildomas iki 100 ml distiliuotu vandeniu. Gautas reagentas yra jautrus šviesai, todėl saugomas šviesai nepralaidžioje taroje.

Šviežiai paruošto reagento vienas mililitras sumaišomas su 1 ml tiriamojo fermentacijos terpės mėginio ir pakaitinamas 85 °C vandens vonioje 15 minučių. Praėjus reakcijai skirtam laikui mėgintuvėliai atvėsunami iki kambario temperatūros ir praskiedžiami iki 5 mililitrų žymos. Pasibaigus reakcijai tirpale susidaro spalviniai junginiai, kurių intensyvumas priklauso nuo cukraus koncentracijos fermentavimo terpėje. Esant mažesnei cukraus kiekio koncentracijai tirpalas yra skaidresnis. Norint žinoti tikslią monosacharidų koncentraciją terpėje, gautas reakcijos tirpalas analizuojamas spektrofotometru “Shimadzu UV-1280” 540 nm šviesos bangos ilgyje. Gautas šviesos sugerties rezultatas prilyginamas kalibracinės kreivės duomenims. Ši kalibracinė kreivė sudaroma iš žinomos cukraus koncentracijos tirpalų, ištiriant juos aprašytu metodu.



**2.4 pav.** Cukraus koncentracijos nustatymas fermentavimo terpėse

#### **2.4.6. Alternatyvus metodas cukraus kiekiui nustatyti**

Cukraus kiekis fermentavimo terpėje gali būti nustatomas Benedikto reagentu. Benedikto reagentas sudarytas iš vario kompleksinio junginio. Šis kompleksinis junginys gaunamas sumaišant distiliuotame vandenyje ištirpintus 10 g  $\text{NaCO}_3$  su natrio citrato vandeniu tirpalu kuriame ištirpę 17,3 g natrio citrato. Gerai sumaišius pradinius du tirpalus pridedama ir vario sulfato tirpalo kuriame ištirpę 1,73 g vario sulfato. Gautas reagento bendras tirpalo tūris papildomas distiliuotu vandeniu iki 100 ml žymos. Reakcija vykdoma 5 minutes 90 °C temperatūroje vandens vonioje “BIOSAN BWT-U”. Gautas tirpalas nufiltruojamas arba nucentrifuguojamas siekiant tirpalą atskirti nuo vario nuosėdų. Filtratas ištiriamas spektrofotometru “Shimadzu UV-1280” 680nm bangos ilgyje. Gautas šviesos sugerties rodiklis palyginamas su kalibracine kreive sudaryta iš ištirtų žinomų cukraus koncentracijos tirpalų. Gautos vario nuosėdos pasveriamos analitinėmis svarstyklėmis.

Šis reagentas aptinka redukuojančius cukrus, tačiau kadangi esant rūgščiai terpei sacharozė hidrolizuojasi galima aptikti ir tokioje terpėje likusių disacharidų kiekį. Benedikto reagentu cukraus kiekis gali būti nustatomas dvejopai: tiriant redukuoto reagento šviesos sugertį 680nm šviesos bangos ilgyje arba išmatuojant išsiskyrusio vario svorį. Siekiant išmatuoti išsiskyrusio elementinio vario svorį reikalingos didelio tikslumo svarstyklės arba didesnis bandinio kiekis, todėl vario išsiskyrimo reakcija yra labiau kokybinė nei kiekybinė. Norint nustatyti mėginyje esančio redukuojančio cukraus kiekį reikia sudaryti kalibracinę kreivę su žinomos koncentracijos cukrų tirpalais.

### 2.4.7. Pramoninių atliekų tinkamumo fermentavimui nustatymas

*Aspergillus niger* geba augti ant lignoceliuliozinės žaliavos dėl išskiriamų fermentų, kurie skaido celiuliozę, tačiau suskaidomo substrato kiekis yra gana nedidelis. Citrinų rūgšties sintezei reikalingas didelis cukraus kiekis augimo terpėje, todėl įprastomis sąlygomis fermentacija vyksta lėtai ir pagaminamas mažas produkto kiekis. Norint suskaidyti celiuliozinę žaliavą iki mikroorganizmui pasisavinimui tinkamo cukraus gali prireikti žaliavos papildomo fermentinio apdorojimo. Išskiriamų fermentų kiekis skiriasi tarp *Aspergillus niger* mikroorganizmų kultūrų, todėl norint išsiaiškinti celiuliazinį kultūros aktyvumą reikia atlikti tyrimą, kurio metu grybo sporos auginamos terpėje su celiulioze ir nustatomas išskiriamos celiulazės kiekis bei jos aktyvumas.

Tyrimui naudojama sporų suspensija paruošiama anksčiau aprašytu būdu, kuomet sporos nuplaunamos nuo *Petri* lėkštelės. *Aspergillus niger* sporų suspensija pasėjama į Czapek-Dox (himedia) terpę skirtą skatinti celiuliazės išsiskyrimą. Į terpę pasėjama standartizuotas kiekis sporų suspensijos (2 ml su sugertimi 1,150 A 420nm). Siekiant užtikrinti biomasės augimą pH vertė nustatoma 6. Kaip grynos celiuliozės žaliava naudojamas „Watman“ filtro popierius. Fermentacija vykdoma 14 dienų termostatuojamame kratytuve „BIOSAN ES-20“ esant 29 °C temperatūrai ir 190 apsisukimų per minutę maišymo režimui. Periodiškai stebimi terpės rūgštingumo parametrai, ir palaikoma pastovi terpės pH 6 vertė siekiant optimalaus biomasės augimo. Po fermentacijos iš terpės pašalinami stambesni gabalėliai celiuliozinio filtro, o likusi terpės dalis atvėsinama iki 4 °C. Pašalinti celiuliozinio filtro gabalėliai išdžiovinami ir pasveriami siekiant nustatyti likutinį celiuliozės svorį. Šalta terpė nufiltruojama ir išdžiovinti filtrai pasveriami siekiant nustatyti biomasės prieaugį. Paimami terpės mėginiai cukraus kiekio ir citrinų rūgšties kiekio nustatymui aprašytais metodais. Iš filtrato išsūdomi baltymai amonio sulfato koncentruotu tirpalu. Gautas tirpalas nufiltruojamas ir pasveriamas iškritusių fermentų masė.

### 2.3 lentelė. Celiuliazinio aktyvumo nustatymui skirta mitybinė terpė

Medžiaga	Kiekis
Sacharozė	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
NaNO <sub>3</sub>	0,2 g
KCl	0,05 g
MgSO <sub>4</sub>	0,005 g
FeSO <sub>4</sub>	0,001 g
Celiuliozė	1 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

### 2.4.8. Peleningumo tyrimas

Siekiant sukurti ekonomiškai konkurencingą citrinų rūgšties kainą fermentacijos žaliava vaidina didelį vaidmenį. Kaip žaliava gali būti panaudotos tokios pramoninės atliekos kaip popieriaus perdirbimo pramonėje atliekantis celiulioziniai plaušai. Šiame pašaliname produkte yra pašalinių priemaišų, kurios gali sumažinti fermentacijos išeigą arba reikalauti kitokių fermentavimo sąlygų.



Norint sužinoti mikroorganizmui prieinamą substrato kiekį žaliavoje yra tikslinga atlikti peleningumo testą. Testas parodo kokią žaliavos dalį sudaro netirpios neorganinės priemaišos, kurios negali būti tikslingai pasisavinamos fermentacijos metu. Priemaišas dažniausiai sudaro kaolinas, kalcio druskos ir kiti netirpūs sulfatai. Testas atliekamas išgarinant visą mėginio drėgmę ir sudeginant visus organinius junginius esančius mėginyje panaudojant mufelinę krosnį.

Tyrimui paimamas 10 g drėgnas mėginys, kuris patalpinamas į džiovavimo spintą ir džiovinamas 12 valandų 70 °C temperatūroje. Vėliau temperatūra pakeliama iki 105 °C temperatūros ir mėginys džiovinamas dar parą laiko. Išdžiovintas mėginys dedamas eksikatorius ir laikomas jame iki bus panaudojamas tolesniuose tyrimo etapuose.

Tyrimui naudojamas porcelianinis tигlis. Šis tигlis dedamas į mufelinę krosnį ir kaitinamas 575-600 °C temperatūroje keturias valandas. Iškaitintas tигlis patalpinama į eksikatorių ir jame atvėsinaamas. Atvėsintas tигlis pasveriamas ir į jį įdedama 2 g išdžiovinto mėginio. Tигlis su mėginiu kaitinami ant dujinio degiklio iki kol pradeda anglėti ir rūkti dūmai. Pasirodžius dūmams mėginys iš karto uždegamas ir deginamas iki pranyksta liepsna ir dūmai. Po to tигlis atvėsinaamas ir patalpinamas į mufelinę krosnį. Mėginys pamažu įkaitinamas iki 575-600 °C temperatūros ir kaitinamas 24 valandas iki pastovaus mėginio svorio reguliariais intervalais pasveriant tигlį su mėginiu.

#### **2.4.9. Lignoceliuliozinės ir celiuliozinės žaliavos paruošimas fermentacijai**

Lignoceliuliozės molekulė yra tinklinė ir sunkiai skaidi, norint ją suskaidyti būtina apdoroti chemiškai. Priklausomai nuo žaliavos stambumo ir frakcijos dydžio gali būti reikalingas fizikinis apdorojimas susmulkinant žaliavą. Laboratoriniams tyrimams tinkamas susmulkinimas yra plaušų ir granulių sumalimas siekiant padidinti paviršiaus plotą. Padidinus paviršiaus plotą cheminis apdorojimas tampa žymiai efektyvesnis ir greičiau pasiekiamas norimas suskaidymo lygis. Cheminio apdorojimo metu gali būti atliekama rūgštinė arba šarminė hidrolizė, tačiau pramonėje dažniausiai vykdoma šarminė hidrolizė. Hidrolizė atliekama naudojant natrio šarmo tirpalą, bei visą reakcijos mišinį kaitinant. Po šitokio suskaidymo lignoceliuliozės ir celiuliozės molekulės iš tinklinių tampa linijinėmis, nes yra suskaidomi skersiniai ryšiai tarp molekulių [36].

Norint nustatyti celiuliozinės žaliavos tinkamumą ir potencialą naudojama gryna celiuliozė, kuri savo sudėtyje neturi priemaišų stabdančių reakciją. Kaip grynos celiuliozės šaltinis naudojamas „Watman“ celiuliozinis filtro popierius. Celiuliozė susmulkinama ją sukarpant ir sumalant. Susmulkintos celiuliozės paviršius žymiai padidėja, todėl cheminis apdorojimas gana lengvai įvykdomas. Cheminiam apdorojimui naudojamas 2 % natrio šarmo tirpalas, o reakcija vykdoma 70 °C temperatūroje. Žaliavos apdorojimo laikas tiesiogiai priklauso nuo jos kiekio, tačiau bendruoju atveju 100 g celiuliozinės žaliavos chemiškai apdoroti reikia 500ml natrio šarmo tirpalo. Reikiamai temperatūrai palaikyti ir užtikrinti tinkamas sąlygas, visame reakcijos tūryje, reikalinga maišymas kaitinimo metu, todėl reakcija atliekama naudojant magnetinę maišyklę „Heidolph MR Hei-Tec“. Po apdorojimo celiuliozė tampa puri ir smulki, dėl šios priežasties naudojamas stambios frakcijos metalinis legiruoto plieno sietelis, o reakcijos mišinys per jį filtruojamas pakartotinai kelis kartus kol surenkama didžioji dalis celiuliozės plaušų. Surinkti plaušai praplaunami distiliuotu vandeniu kelis kartus iki kol filtrato pH vertė tampa artima neutraliai.

Popieriaus gamybos pramoninės atliekos turi daug priemaišų, todėl fermentacijos išeiga iš tokios žaliavos yra mažesnė. Pašalinis popieriaus perdirbimo produktas turi dalį celiuliozės, kuri gali būti panaudojama fermentacijos metu, o joje esančios priemaišos, tokios kaip kaolinas ir kalcio sulfatas, yra inertiškos fermentacijos metu. Šis pašalinis popieriaus perdirbimo produktas yra sandėliuojamas sausų dribsnių ir granulių pavidalu. Tam kad padidėtų substrato paviršiaus plotas žaliava yra sumalama ir vėliau apdorojama chemiškai. Dėl galimo mikrobiologinio užteršimo ir norint suardyti skersinius ryšius yra tikslinga gamybinės atliekas naudojamas fermentacijai

apdoroti natrio šarmo tirpalu anksčiau aprašytais metodais. Celiuliozės plaušus nufiltravus ir praplovus distiliuotu vandeniu galima vykdyti tolimesnius šios žaliavos skaidymo etapus.

#### **2.4.10. Celiuliozės fermentinis apdorojimas**

Fiziškai ir chemiškai apdorota celiuliozė tampa lengvai prieinama fermentams. Apdorojimu metu padidėjęs paviršiaus plotas ir suskaidyti skersiniai ryšiai molekulėse sumažina laiką reikalingą fermentiniam žaliavos suskaidymui. Celiuliozei suskaidyti naudojama celiulazė. Celiulazės fermentas iš tikrųjų yra keleto fermentų mišinys, kuris celiuliozę skaido laipsniškai. Celiulazę sudaro endoceliuliazė, egzoceliuliazė ir celobiozė. Endoceliuliazė skaido skersinius celiuliozėje esančius ryšius, tačiau dėl ankstesnio cheminio apdorojimo didžioji dalis šių ryšių yra suskaidyti, todėl šis fermentinio skaidymo etapas trunka trumpiau. Egzoceliuliazė skaido susidariusias linijines molekules nuo jų galų atskeliant trumpų anglies grandinių junginius. Šitie trumpagrandžiai junginiai yra suskaidomi celobiozės iki gliukozės molekulių [29]. Tam, kad fermentai būtų aktyvūs būtina sudaryti tinkamas terpės rūgštingumo sąlygas. Vykstant celiuliozės hidrolizei terpės pH kinta, siekiant išvengti celiuliazės fermentų inaktyvavimo yra naudojami buferiniai tirpalai. Dėl vėlesnio žaliavos panaudojimo citrinų rūgšties fermentacijai priimtina naudoti citratinį buferį. Toks buferis susideda iš citrinų rūgšties ir natrio citrato, o rekomenduojamas buferio rūgštingumas tinkamam fermento aktyvumui palaikyti yra 5. Nors fermentas ir veiklus plačiame temperatūriniame diapazone, tačiau optimali temperatūra yra 40-50 °C. Prie šios temperatūros fermento aktyvumas yra didelis, mažinant temperatūrą mažėja ir fermento aktyvumas, o per daug padidinus temperatūrą galima denatūruoti fermentą negrįžtama.

Celiuliozės fermentiniam suskaidymui naudojamas „CeluStar XL“ fermentų mišinys, kuriame celiuliazės aktyvumas viršija 20,000 aktyvumo vienetų/g. Be celiuliazės šiame fermentų mišinyje yra didelio aktyvumo ksilanazės ir beta gliukonazės. Dėl didelio fermentinio aktyvumo šis reagentas gali būti naudojamas gana plačiuose temperatūriniuose parametruose, tai yra nuo 35 °C iki 60 °C. Tačiau tiriamuoju atveju fermentaciją pasirinkta atlikti 45 °C temperatūroje, kuomet 0,1 M citratinio buferio pH reikšmė lygi penkiems. Citratinis buferis paruošiamas sumaišant 1,697 g natrio citrato dihidrato ir 0,813 g citrinų rūgšties, bendras tirpalo tūris lygus 100 ml. Tyrimui naudojama 2g apdorotos celiuliozės, o fermentacijos reakcija atliekama termostatuojamame kratytuve „BIOSAN ES-20“ esant 120 apsisukimų per minutę maišymo režimui. Reguliariai tiriama susidariusios gliukozės koncentracija fermentacijos terpėje cukraus kiekio nustatymo metodais. Fermentacija skaitoma pilnai įvykusi kuomet cukraus kiekis fermentacijos terpėje nebedidėja.

#### **2.4.11. Vienalaikė sacharifiacijos ir fermentacijos reakcija**

Celiuliozės skaidymas fermentais, kaip ir kitos cheminės reakcijos, lėtėja terpėje didėjant produkto koncentracijai. Siekiant išlaikyti reakcijos greitį yra tikslinga šalinti susidarančią gliukozę. Kaip efektyvus gliukozės vartotojas gali būti naudojamas *Aspergillus niger* grybas. Tokiu atveju sudaroma sistema, kurioje terpėje esantis celiuliazės fermentas skaido celiuliozinę žaliavą, o šio fermento aktyvumą palaiko *A. niger*, kuris sunaudoja susidarančią gliukozę ir išskiria nedidelius kiekius celiuliazės į terpę. Tokiu būdu fermentacijos metu vienu metu skaidoma celiuliozė ir susidaro tikslinis produktas - citrinų rūgštis. Tiesa, toks citrinų rūgšties gamybos būdas reikalauja didesnės proceso kontrolės ir yra labiau dinamiškas, nei fermentavimo būdai kuomet žaliava pilnai suskaidoma atskiro etapo metu ir tik po to pradama citrinų rūgšties fermentacija. Celiuliazės optimali veikimo temperatūra yra didesnė, nei optimali fermentacijos temperatūra *Aspergillus niger* mikroorganizmui, todėl abi reakcijos negali vykti didžiausiu įmanomu greičiu. Kitas veiksnys turintis įtaką fermentų veikimui ir mikroorganizmo augimui yra terpės rūgštingumas. Nors ir celiuliazės veikimui naudojamo citratinio buferio pH yra puikiai tinkantis *Aspergillus niger*

biomasės augimui, tačiau prasidėjus citrinų rūgšties gamybai tirpalo pH gali pradėti drastiškai mažėti, o tai stabdo celiuliazės veikimą. Fermento inaktyvavimo problema, dėl didelio terpės rūgštingumo, gali būti išspręsta naudojant stipresnį buferį. Temperatūriniai parametrai fermentui ir mikroorganizmui yra nustatomi suboptimalūs, tačiau nors ir lėčiau, fermentacija vyksta nepertraukiamai. Siekiant užtikrinti pakankamą kiekį substrato citrinų rūgšties fermentacijai sporų suspensija, inokuliumo sudarymui, pasėjama į fermentacijos terpę praėjus atitinkamam laiko tarpui. Šio laikotarpio vykdomas celiuliozės fermentacinis skaidymas esant optimalioms sąlygoms iki kol susidaro tinkamas cukraus kiekis terpėje.

Žaliavos fermentinis skaidymas vykdomas pagal anksčiau aprašytus metodus, tačiau fermentacija vykdoma ne iki galo, o tik iki to laiko momento kuomet susidaro užtenkamas cukraus kiekis citrinų rūgšties gamybai. Terpėje susidarius pakankamam gliukozės kiekiui reakcijos sąlygos pakeičiamos į palankesnes *Aspergillus niger* augimui. Į fermentavimo terpę pridedamas atitinkamas kiekis mikroelementų tirpių druskų pavidalu pagal 2.2 lentelę. Kadangi bendras fermentacijos terpės tūris lygus 100 ml į ją pasėjami 2 ml sporų suspensijos paruoštos anksčiau aprašytais metodais. Fermentacija vykdoma 30 °C temperatūroje termostatuojamame kratytuve „BIOSAN ES-20“ nustačius 190 apsisukimų per minutę maišymo greitį. Esant tokiems parametrams „CeluStar XL“ fermentų mišinio efektyvumas nėra optimalus ir reakcija sulėtėja, tačiau reakcijos greičio sumažėjimą dalinai kompensuoja reakcijos pagreitinimas kuomet iš terpės sunaudojama gliukozė citrinų rūgšties gamybai. Visos fermentacijos metu periodiškai stebimi šie parametrai: pH, citrinų rūgšties koncentracija, bei cukraus kiekio pokytis reakcijos terpėje. Terpės rūgštingumas palaikomas ties pH 4,5 nukrypęs nuo šio parametro rūgštingumas pakoreguojamas siekiant nesustabdyti celiuliazės aktyvumo. Fermentacija laikoma pilnai įvykusi kuomet fermentacijos terpėje citrinų rūgšties koncentracija nebedidėja, o cukraus kiekis sumažėja iki tokio lygio, kuris nebeskatina citrinų rūgšties gamybos.

#### **2.4.12. Melasos paruošimas citrinų rūgšties gamybai.**

Melasa yra pašalinis produktas cukraus rafinavimo procese, kuriame gausu mikroelementų. Norint panaudoti melasą citrinų rūgšties fermentacinėje gamyboje yra būtina sumažinti mikroelementų koncentraciją terpėje. Tai gali būti atliekama dviem metodais. Pirmuoju metodu iš cukringos žaliavos yra pašalinami visi divalenciniai mikroelementai jonų mainų kolonomis. Šis metodas plačiai taikomas pramonėje. Pašalinius mikroelementus terpė yra praskiedžiama reikiamu kiekiu vandens ir pridedamas reikiamas kiekis mikroelementų. Proceso palengvinimui mikroelementai tiekiami jų druskų tirpalų pavidalu.

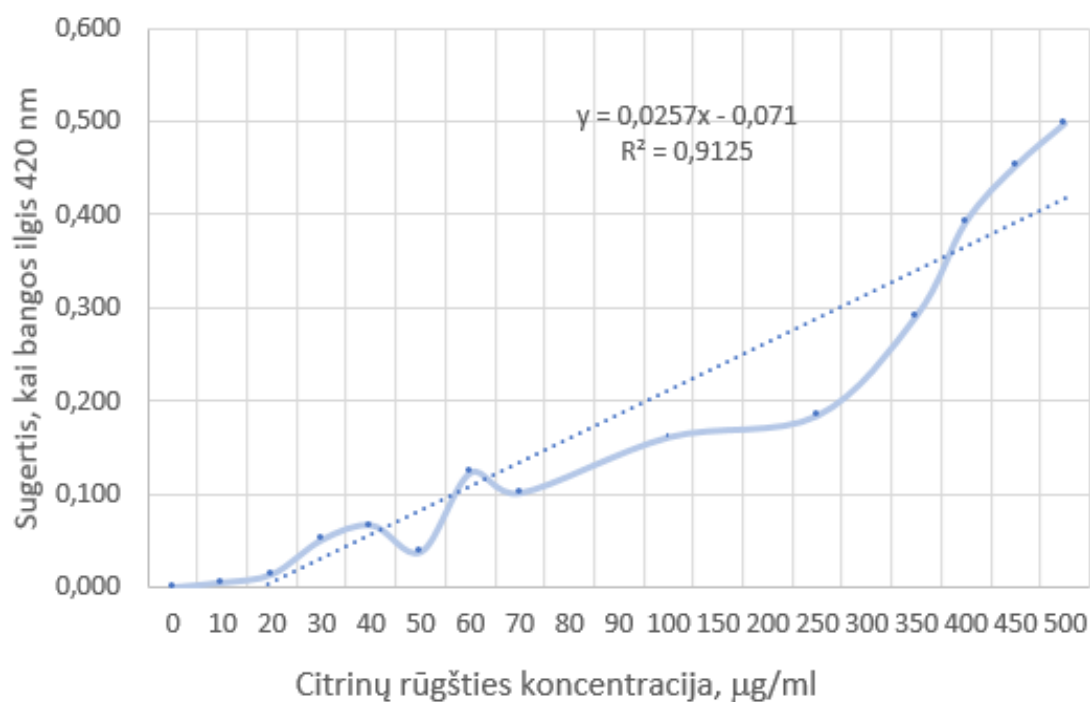
Nedidelės apimties tyrimams tikslingiau naudoti kitą metodą, kurio metu katijonų mainų kolonų naudojimas nėra būtinas. Tam, kad užtikrinti tinkamą mikroelementų kiekį visa terpė perskaičiuojama pagal didžiausios koncentracijos elementą, o kiti sudėtiniai elementai papildomi iki reikiamos koncentracijos fermentacijai vykdyti. Užtikrinti šio metodo patikimumą būtina nustatyti tikslią sudedamųjų komponentų koncentraciją melasoje. Dažniausiai pasitaikantis perteklinis elementas melasoje yra  $Fe^{2+}$  jonų kiekis, todėl liepsnos fotometriniiais metodais tiriant šio elemento kiekį būtina kuo tiksliau nustatyti jo kiekį. Nustačius geležies jonų perteklių visą terpę nurodyta 2.2 lentelėje perskaičiuojama pagal geležies jonų kiekį ir pridedami atitinkami kiekiai kitų sudėtinųjų elementų. Šitaip melasos vandeninis tirpalas tampa skaidresnis ir mažiau klampus, o tai palengviną fermentaciją. Siekiant padidinti biomasės augimą ir pamažinti  $Fe^{2+}$  jonų įtaką į terpę pridedama 0,2 g/l kalio ferocianato. Į paruoštą terpę su tinkamu terpės rūgštingumu pasėjamas atitinkamas kiekis *Aspergillus niger* sporų suspensijos ir fermentacija atliekama termostatuojamame kratytuve. Toliau citrinų rūgšties fermentacija atliekama įprastiniais metodais, reakcijos eigoje periodiškai stebimi pH, cukraus ir citrinų rūgšties koncentracijos.

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. Pagaminamos citrinų rūgšties koncentracijos įvertinimas

##### 3.1.1. Tyrimas panaudojant piridiną ir acto anhidridą

Sklandžiai tyrimų eigai ir tiksliems tyrimų rezultatams užtikrinti vienas iš esminių veiksnių yra tinkamų tyrimo metodų parinkimas. Siekiant užtikrinti rezultatų atsikartojamumą buvo tiriamos įvairios koncentracijos citrinų rūgšties tirpalai. Vienas iš pasirinktų tyrimo metodų buvo citrinų rūgšties reakcija su piridinu ir acto anhidridu. Šios reakcijos metu susidaro rusvos spalvos spalviniai junginiai, kurių spalvos intensyvumas tiesiogiai priklauso nuo citrinų rūgšties koncentracijos tiriamame bandinyje. Tyrimas buvo atliekamas pagal eksperimento eigą aprašytą P.Chellapandi knygoje [Laboratory Manual in Industrial Biotechnology]. Iš gautų tirpalų šviesos sugerties rezultatų 420nm bangos ilgyje buvo sudaryta kalibracinė kreivė, kuri pavaizduota 3.1 paveiksle.



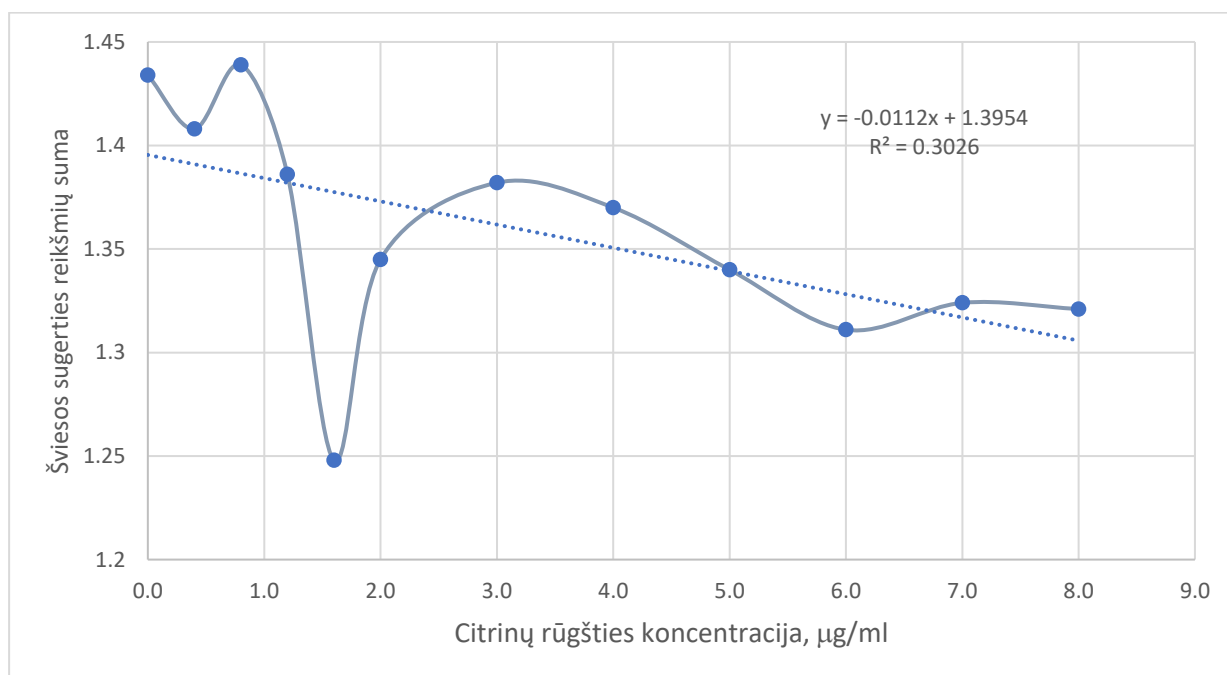
3.1 pav. Šviesos sugerties priklausomybė nuo citrinų rūgšties koncentracijos kalibracinė kreivė

##### 3.1.2. Tyrimas panaudojant vario (II)-amonio kompleksinį reagentą

Ieškant alternatyvaus citrinų rūgšties nustatymo metodo buvo išbandytas tyrimo būdas aprašytas K. Zarei, M. Atabati, and N. Karimian straipsnyje [Simultaneous Dual Wavelength Spectrophotometric determination of Citric and Ascorbic Acids Using an Artificial Neural Network]. Šiuo metodu citrinų rūgšties koncentracijai nustatyti yra naudojamas reagentas paruošiamas sumaišant 2,4968g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 4,28g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 6ml koncentruoto amoniako ir ištirpinant visas medžiagas 50ml distiliuoto vandens. Reagento pH nustatomas 9, o tai lengvai šarminė terpė. Nustačius tinkamą pH visas reagento tūris papildomas iki 100 ml žymos. Sudarytu reagentu tiriami paruošti žinomų koncentracijų vandeniniai citrinų rūgšties tirpalai sumaišant dvi

dalis tiriamojo mėginio su dviem dalimis reagento ir praskiedžiant reakcijos mišinį 6 dalimis vandens.

Citrinų rūgščiai reaguojant su vario (II) – amonio kompleksu tirpalo spalva skaidrėja ir tampa mažiau intensyvi. Šis spalvos pokytis išmatuojamas spektrofotometru prie dviejuose skirtinguose bangos ilgiuose, 600nm ir 750nm. Gauti tirpalų šviesos sugerties rezultatai skirtinguose bangos ilgiuose yra sudedami ir braižomas kalibracinis grafikas, kuris atspindi tiriamo tirpalo sugerties abiejų bangos ilgių priklausomybę nuo citrinų rūgšties koncentracijos tirpale. Ištyrus žinomus citrinų rūgšties tirpalus gaunama kalibracinė kreivė pavaizduota 3.2 paveiksle.



**3.2 pav.** Šviesos sugerties verčių sumos priklausomybė nuo citrinų rūgšties koncentracijos kalibracinė kreivė

### 3.1.3. Tinkamiausio būdo citrinų rūgšties koncentracijai tirti pasirinkimas

Iš gautų kalibracinių kreivių matoma, kad tikslesnis grafikas susidaro tyrimo metodo metu, kuriame naudojamas piridinas ir acto anhidridas, taip pat tai atspindi ir  $R^2$  patikimumo vertė, kuri pirmajame metode yra 0,9125, o antrajame tik 0,3026. Tai parodo, kad antrasis metodas su vario(II) – amonio kompleksu yra daugiau kaip tris kartus mažiau patikimas nei pirmasis būdas. Dėl antrojo metodo metu nustatomos tik mažos citrinų rūgšties koncentracijos tiriami fermentacijos mėginiai turėtų būti skiedžiami daugiau nei šimtą kartų, o tai taip pat padidina paklaidos tikimybę. Antrasis tyrimo metodas yra greitesnis, tačiau mažiau tikslus, todėl vėlesnėse tyrimo stadijose šis metodas naudotas tik kaip kokybinė reakcija parodanti, kad terpėje yra citrinų rūgšties, kuomet tirpalas pasidaro skaidresnis. Dėl išvardintų priežasčių, kiekybiniam citrinų rūgšties tyrimams, buvo nuspręsta pasirinkti tyrimo metodą, kuomet naudojamas piridinas ir acto anhidridas.

### 3.2. Tinkamiausio anglies šaltinio citrinų rūgšties gamybai įvertinimas

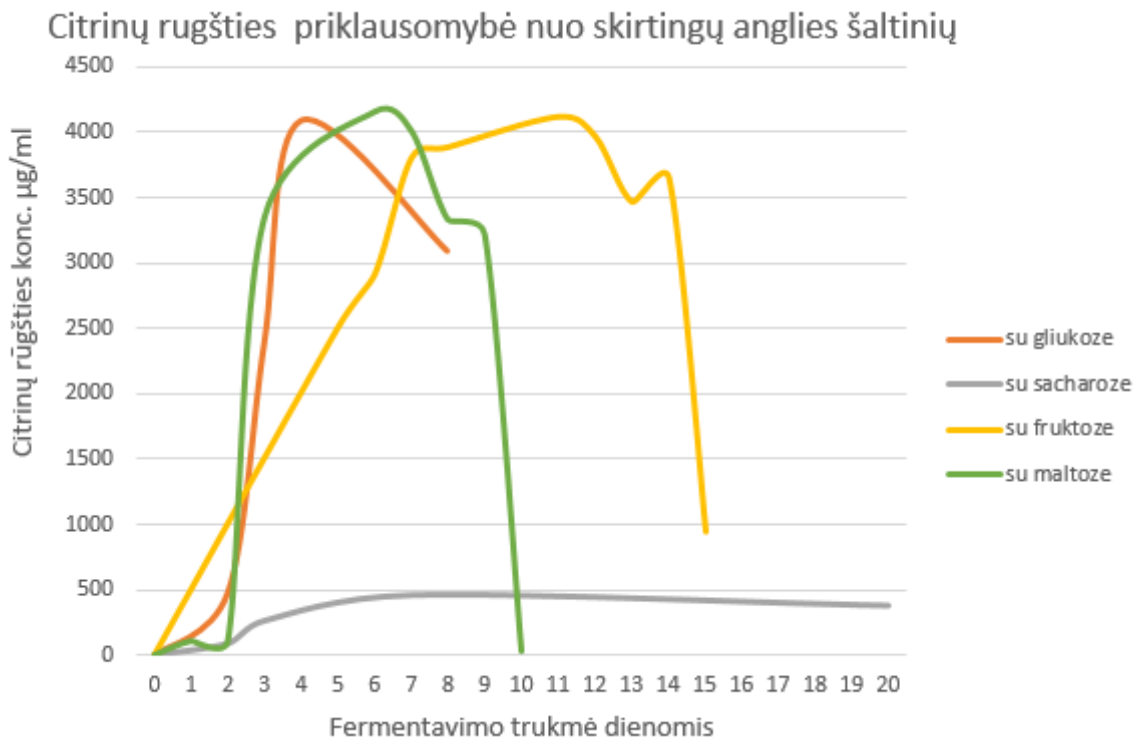
Citrinų rūgštis gaunama panaudojant *Aspergillus niger* filamentinį grybą. Ši rūgštis gaunama fermentacijos metu iš substrato, kuriame yra didelė koncentracija sacharidų. Mikroorganizmo augimo greitis ir pagaminamas citrinų rūgšties kiekis skiriasi priklausomai nuo to, koks anglies

šaltinis yra panaudojamas. Siekiant nustatyti palankiausią anglies šaltinį buvo naudojama citrinų rūgšties sintezei skirta terpė, kurios sudėtis nurodyta 3.1 lentelėje, terpėje buvo keičiamas tik anglies šaltinis. Bandymų metu buvo tirti tokie anglies šaltiniai: gliukozė, fruktozė, maltozė ir sacharozė. *Aspergillus niger* buvo užaugintas ant kietos terpės siekiant suformuoti subrendusių sporų kultūrą. Susiformavus sporoms jų suspensija buvo pasėta į skystą fermentavimo terpę citrinų rūgšties gamybai. Sporų skaičius suspensijoje, pasėjamoje į terpę, buvo išlaikomas nepakitęs kiekvienos fermentacijos metu. Eksperimentų metu į skystos terpės 50 tūrio vienetų buvo pasėjama 1 tūrio vienetų sporų suspensijos, kurios šviesos sugertis 550nm šviesos bangos ilgyje buvo 1,150A, o tai tolygu  $10^6$ /ml sporų koncentracijai. Fermentacija buvo atliekama 29° C temperatūroje ir esant 190 apsisukimų per minutę maišymo greičiui. Susidariusios citrinų rūgšties koncentracija buvo nustatoma reguliariai imant mėginius iš fermentacijos terpės. Šie mėginiai tirti spektrofotometriškai nustatant reakcijos metu susidariusių spalvinių junginių intensyvumą, kuomet reaguoja citrinų rūgštis, piridinas ir acto anhidridas.

**3.1 lentelė.** Fermentacijos skystoje fazėje mitybinė terpė

Medžiaga	Kiekis
Gliukozė, fruktozė, maltozė arba sacharozė	12g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1g
MgSO <sub>4</sub>	10mg
FeSO <sub>4</sub>	1mg
MnSO <sub>4</sub>	1mg
H <sub>2</sub> O	100ml

Siekiant tiksliai nustatyti citrinų rūgšties koncentraciją buvo sudaryti žinomų koncentracijų citrinų rūgšties tirpalai. Šie tirpalai buvo ištirti būdu aprašytu P.Chellapandi knygoje [Laboratory Manual in Industrial Biotechnology]. Pagal aprašytą metodą citrinų rūgšties tirpalo 1ml buvo sumaišytas su 1ml piridino ir 5ml acto anhidrido. Reakcijos mišinys buvo kaitinamas 32° C temperatūroje 30 minučių. Įvykus reakcijai ir susidarius spalviniams junginiams jų šviesos sugertis buvo ištirta spektrofotometriškai 420nm šviesos bangos ilgyje, o gauti rezultatai palyginti su gauta kalibracine kreive.



**3.3 pav.** Citrinų rūgšties koncentracijos išeigos priklausomybė nuo skirtingų anglies šaltinių

Iš gautų spektrofotometrinių tyrimų rezultatų matoma, kad didžiausias kiekis citrinų rūgšties per trumpiausią laikotarpį buvo pagamintas fermentavimo terpėje su gliukoze. Šioje terpėje jau ketvirtą fermentacijos dieną buvo pasiektas citrinų rūgšties išeigos maksimumas, kuris siekė 4089 µg/ml. Terpėse su kitais anglies šaltiniais buvo pasiektas panašus citrinų rūgšties koncentracijos rezultatas, tačiau fermentacija truko ilgiau. Išskirtinai mažas kiekis citrinų rūgšties susiformavo terpėje su sacharoze, nors fermentacija ir buvo vykdyta ilgiausiai, o terpėse su fruktoze ir maltoze citrinų rūgšties koncentracijos maksimumas buvo pasiektas per 11 ir 6 dienas atitinkamai. Įvertinus šiuos fermentacijos rezultatus buvo nuspręsta tolimesnius tyrimus tęsti naudojant gliukozę gaunamą iš įvairių pigių anglies šaltinių.

### 3.3. Tinkamos sąlygos micelių granulių susidarymui

Tyrimų metu buvo pastebėta, kad gera citrinų rūgšties išeiga galima tik tose terpėse, kuriose susidaro *A.niger* sferinės micelių granulės. Šių granulių susiformavimas indikuoja ir didelį biomasės augimą fermentacijos metu. Naudojant ne grynas žaliavas su skirtingomis priemaišomis pastebėta, kad citrinų rūgšties fermentacija nevyksta, jei terpėje yra didesnis kiekis divalenčių jonų. Tai patvirtino ir fermentacija su terpe, kurios sudėtyje yra didesnis kiekis geležies (II) jonų. Fermentacijos terpės sudėtis pavaizduota 3.2 lentelėje.

Fermentacijos metu esant mikroelementų pertekliui *Aspergillus niger* sporos tinkamai nesudygsta ir nesusiformuoja biomasė. Buvo pastebėta, kad tinkamoms micelių granulėms susidaryti yra svarbus ir pradinis terpės rūgštingumas. Šis parametras buvo mažiau svarbus, tačiau fermentacijos pradžioje nustačius pirminę pH vertę ties 4-5 terpėje biomasės augimo greitis buvo didesnis, o citrinų rūgšties sintezė prasidėdavo greičiau. Todėl daroma prielaida, kad susiformavus sferinėms filamentinio grybo micelėms fermentavimo terpėje galima tikėtis didelės citrinų rūgšties koncentracijos ir tai taip pat indikuoja jog terpėje nėra divalenčių mikroelementų pertekliaus.

### 3.2 lentelė. Fermentacijos skystoje fazėje mitybinė terpė

Medžiaga	Kiekis
Gliukozė	14g
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0,2g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,014g
$\text{MgSO}_4$	0,1g
$\text{FeSO}_4$	10mg
$\text{CuSO}_4$	1mg
$\text{H}_2\text{O}$	100ml

Esant palankioms fermentavimo sąlygoms ir tinkamai terpės sudėčiai jau po pirmosios fermentavimo paros pasėtos sporos terpėje regimai padidėja, o po pirmųjų 2-3 dienų micelių granulės padidėja iki maždaug 1-2mm dydžio. Jei terpėje nėra mikroelementų pertekliaus micelių granulės neužauga didesnės nei 5mm fermentacijos periodu. Tinkamų micelių susiformavimas matomas 3.4 paveiksle.



**3.4 pav.** Susiformavusios sferinės micelių granulės fermentavimo terpėje su gliukoze.



**3.5 pav.** Nesusiformavusios micelės indikuojančios prastą terpės sudėtį.

### 3.4. Alternatyvaus gliukozės šaltinio išbandymas citrinų rūgšties fermentacijai

Citrinų rūgšties fermentacijoje didelę dalį fermentacijos kaštų ir pagaminto produkto kainos sudaro žaliava ir jos kaina. Siekiant sukurti konkurencingą rinkoje prekę ieškoma vis pigesnių fermentacijos žaliavos šaltinių. Kaip pigus substratas citrinų rūgšties fermentacijai dažnai naudojama melasa, gaunama cukraus rafinavimo procese. Melasa yra pašalinis produktas, kuriame susikaupia cukraus gryninimo atliekos, tokios kaip augaliniai riebalai, vitaminai ir mikroelementai. Melasa yra klampi ir tamsiai rudos spalvos, o spalvą jai suteikia, tokios priemaišos kaip gliukono rūgštis. Melasa naudojama dėl joje esančio gana didelio kiekio gliukozės, sacharozės ir fruktozės. Fermentacijai naudojama melasa turi būti išvaloma nuo



mikroelementų priemaišų ir praskiedžiama siekiant sumažinti jos klampą. Tačiau fermentacijos metu susidariusios citrinų rūgšties kiekio nustatymas spektrofotometriniais metodais tampa keblus dėl terpėje esančių rudą spalvą suteikiančių junginių.

Siekiant ištirti melasos tinkamumą citrinų rūgšties fermentacijai buvo paruošta fermentacijos terpė su melasa. Melasa buvo praskiesta iki apytiksliai 10-12 % cukraus koncentracijos, kol terpės klampa sumažėjo. Melasoje nėra pakankamas kiekis azoto sklandžiai citrinų rūgšties fermentacijai vykti, todėl į terpę papildomai pridedama 0,3 g amonio sulfato. Terpės rūgštingumas nustatomas pH 4,5. Į fermentacijos terpę pasėjami 2ml sporų suspensijos su 1,150A sugertimi. Fermentacijos metu reguliariai stebėtas citrinų rūgšties koncentracijos pokytis terpėje.

Jau pirmosiomis fermentacijos dienomis buvo stebimas menkas biomasės augimas, o terpėje esančios sporos sudarė nedidelius agregatus, tačiau micelių granulių taip ir nesudarė. Tai indikavo, kad terpėje su melasa yra mikroelementų perteklius ir iš negrynintos melasos didelė citrinų rūgšties gamybos išeiga mažai tikėtina. Dėl melasoje esančių spalvinių junginių spektrofotometriniai citrinų rūgšties tyrimo metodai nebuvo labai tikslūs ir nustatomas citrinų rūgšties kiekis terpėje svyravo, tai atspindi terpės su melasa kreivė 3.6 paveikslėlyje, tačiau terpėje vis dėlto susidarė nedidelis kiekis citrinų rūgšties. Maksimali pasiekta citrinų rūgšties išeiga buvo 89,53 µg/ml.

Siekiant didesnės citrinų rūgšties išeigos buvo nuspręsta melasą gryninti panaudojant rūgštinį apdorojimą. Gryninimo metu iš melasos yra pašalinama dalis mikroelementų ir taip pat melasa tampa skaidresnė. Prieš gryninimą melasa buvo praskiesta iki 20-25% cukraus koncentracijos vandeniui. Rūgštinis apdorojimas buvo vykdomas 85 °C temperatūroje kaitinant melasą su 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tirpalu. Apdorojimas vykdomas vieną valandą. Norint apdoroti 100 ml melasos buvo sunaudota 4 ml 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Norint neutralizuoti terpėje pasilikusią laisvą sieros rūgštį buvo pridėta kalcio oksido ir palikta nusistovėti. Praėjus 12 h tirpalas išsisluoksniavo. Skaidrusis sluoksnis buvo dekantuotas ir praskiestas iki 10-12 % cukraus koncentracijos tirpale. Siekiant padidinti biomasės augimo greitį į terpę buvo pridėta 2 mg kalio ferocianido. Į ruošiamą terpę buvo pridėta 0,3 g amonio sulfato, sporų suspensijos ir pradėta citrinų rūgšties fermentacija aprašytais metodais.

Citrinų rūgšties nustatymas spektrofotometriniais metodais buvo efektyvus būdas nuskaidrintoje terpėje nustatyti produkto koncentraciją. Terpėje stebėtas citrinų rūgšties koncentracijos augimas buvo greitesnis ir labiau priminė būdingą eksponentinį produkto koncentracijos augimą citrinų rūgšties fermentacijoje. Maksimalus kiekis susidariusios citrinų rūgšties buvo pasiektas 9 fermentavimo dieną, o citrinų rūgšties koncentracija siekė 249,81 µg/ml. Tai matoma terpės su gryninta melasa kreivėje 3.6 paveikslėlyje. Šis rezultatas buvo ženkliai geresnis, nei fermentacijos metu kuomet naudojama neapdorota melasa. Nors terpėje ir susidarė didesnis kiekis citrinų rūgšties buvo stebimas menkas biomasės prieaugis, o susiformavusių micelių granulių forma ir dydis nebuvo optimalios citrinų rūgšties gamybai. Todėl, buvo padaryta prielaida, jog terpėje vis dar yra per didelis kiekis mikroelementų ir norint užtikrinti optimalią terpės sudėtį reikalinga išsami mikroelementų koncentracijos, esančių melasoje, analizė.

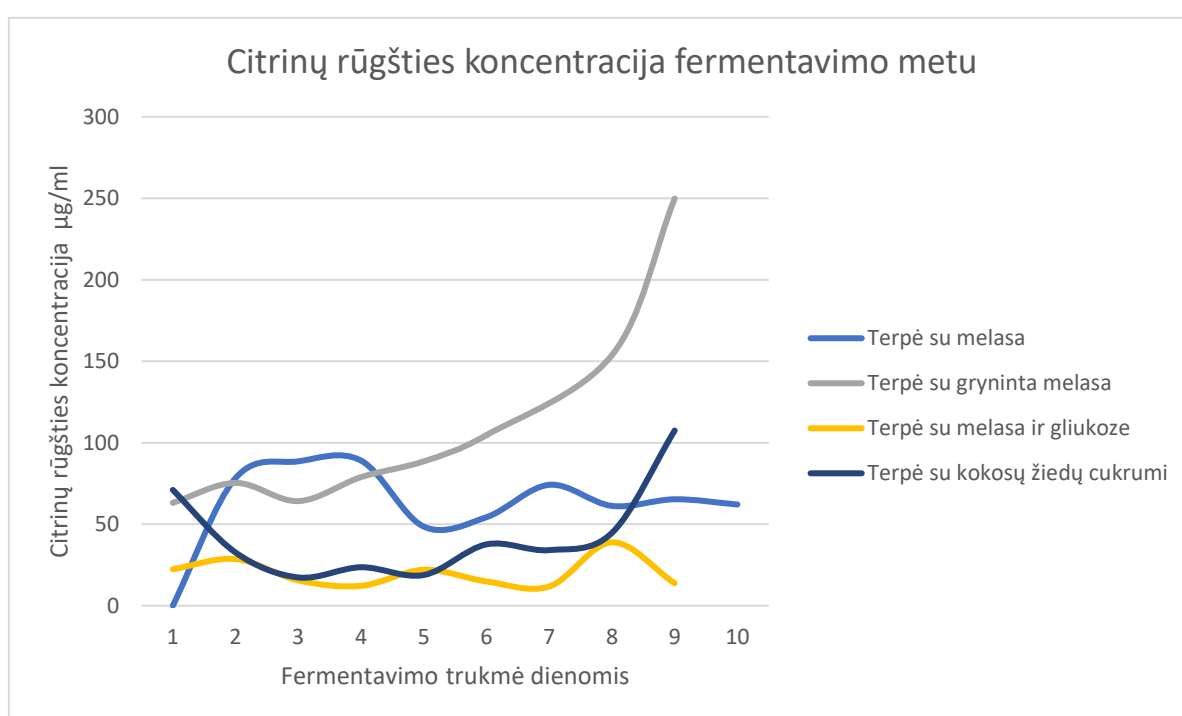
Atlikus melasos analizę liepsnos fotometriniais metodais buvo nustatyta melasoje esančių mikroelementų koncentracija. Siekiant sudaryti optimalias sąlygas citrinų rūgšties gamybai nurodytas 3.1 lentelėje į terpę su melasa buvo pridedama atitinkamas kiekis mikroelementų ir gliukozės perskaičiuojant visą terpę pagal labiausiai perteklinį mikroelementą. Šiuo atveju mikroelementas labiausiai ribojantis *Aspergillus niger* augimą buvo geležis. Geležies jonų koncentracija melasoje beveik 30 kartų viršijo rekomenduojama citrinų rūgšties gamybai koncentracija, todėl visi terpės komponentai buvo papildyti pagal šį elementą ir pradėta citrinų rūgšties fermentacija aprašytais metodais taip pat pridedant 2mg kalio ferocianido 100 ml terpės.

Atlikus fermentacijos terpėje susidarančios citrinų rūgšties koncentracijos nustatymą spektrofotometriniais metodais tapo aišku, kad susidarančio produkto koncentracija yra mažesnė,

nei apdorotoje melasoje. Taip pat dėl iš melasos nepašalintų spalvinių junginių citrinų rūgšties koncentracijos rezultatai buvo nepatikimi ir nustatomos citrinų rūgšties koncentracija terpėje svyravo fermentavimo metu. Tai atspindi terpės su melasa ir gliukoze kreivė 3.6 paveiksle. Taip pat šioje terpėje stebėtas tik minimalus biomasės prieaugis.

Kaip kitas alternatyvus pigios žaliavos šaltinis buvo pasirinktas kokosų palmių žiedų cukrus. Jis savo sudėtimi panašus į melasą, tačiau savo sudėtyje turi mažesnę kiekį mikroelementų. Siekiant nustatyti citrinų rūgšties išeią naudojant šią anglies šaltinį buvo naudojama terpės sudėtis pateikta 3.1 lentelėje, o fermentacija ir citrinų rūgšties nustatymas vyko įprastiniais metodais.

Fermentacijos metu pagaminamas citrinų rūgšties kiekis buvo nedidelis, o pasėta sporų suspensija nesudarė granulės formos micelių. Todėl galima teigti, kad šiame cukruje taip pat yra per didelis kiekis divalenčių mikroelementų, turinčių įtaką citrinų rūgšties išeiagai. Siekiant geresnės citrinų rūgšties išeiigos iš kokoso palmių žiedų cukraus būtinas žaliavos apdorojimas mikroelementams pašalinti.



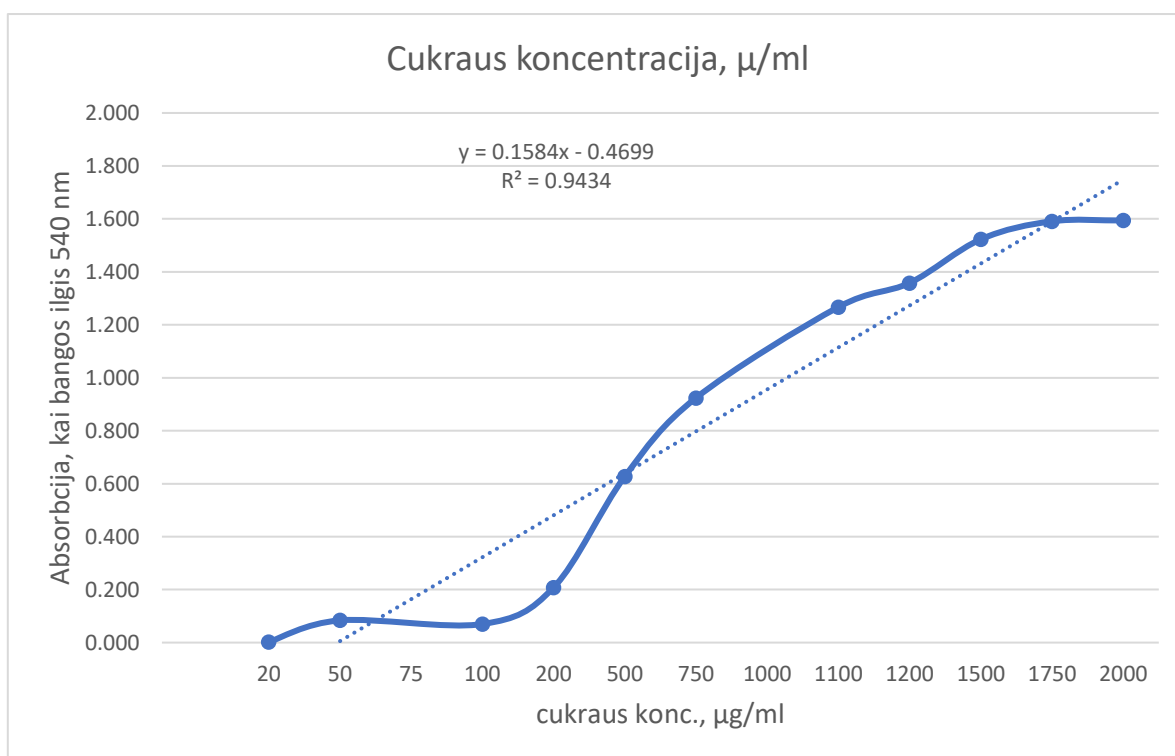
**3.6 pav.** Citrinų rūgšties fermentacijos išeiaga, kuomet panaudojama melasa kaip žaliava

### 3.4.1. Celiuliozinės žaliavos panaudojimas citrinų rūgšties fermentacijai

Pastaruoju metu vis didesnis dėmesys kreipiamas į celiuliozės turinčią žaliavą, kaip alternatyvų ir pigų anglies šaltinį fermentacijai vykdyti. Celiuliozė gali būti panaudota tik tuo atveju, kai ji yra suskaidoma iki gliukozės, kurią mikroorganizmas pasisavina. Yra mikroorganizmų, kurie geba patys suskaidyti celiuliozę, nes išskiria celiuliazės fermentus, tačiau šitoks skaidymas yra lėtas, nes celiuliozė yra gana stabilios struktūros tinklinių molekulių junginys. Pramonėje norint procesą pagreitinti yra naudojami apdorojimo etapai, kurių metu celiuliozės turinti žaliava yra suskaidoma iki cukraus formos tinkamos mikroorganizmo pasisavinimui. Paprastai apdorojimas susideda iš trijų etapų, tai yra iš fizikinio, cheminio, fermentinio apdorojimų. Fizikinis apdorojimas reikalingas siekiant padidinti celiuliozės turinčios žaliavos paviršiaus plotą, kuris reikalingas norint užtikrinti greitą ir efektyvų cheminį žaliavos apdorojimą. Cheminio apdorojimo metu žaliava yra veikiamą rūgštiniais arba šarminiais tirpalais. Šio proceso metu yra nutraukiami

skersiniai celiuliozės ryšiai tarp grandinių. Tai palengvina apdorojimą fermentais. Celiuliozės suskaidymui naudojami fermentai pasižymi dideliu aktyvumu ir suskaido celiuliozę iki gliukozės molekulių, tačiau šių fermentų veikimui būtina užtikrinti tinkamą temperatūrą ir terpės rūgštingumą. Dažnai norint išsaugoti fermento aktyvumą yra naudojami buferiai, kurie palaiko tinkamą terpės rūgštingumą arba naudojami didesni kiekiai celiuliazinių fermentų turinčių didesnę aktyvumą.

Norint kontroliuoti celiuliozinės žaliavos apdorojimo progresą yra būtina stebėti susidarančios gliukozės koncentraciją. Šitai gali būti atliekama naudojant spalvines reakcijas panaudojant gliukozės redukcines savybes. Viena iš tokių kiekybinių reakcijų cukraus kiekio fermentacijos terpėje nustatymui yra reakcija panaudojant paruoštą DNSA reagentą. Norint tiksliai nustatyti cukraus kiekį tiriamame mėginyje reikalingas kalibracinės kreivės sudarymas ištiriant žinomų koncentracijų gliukozės tirpalus. Šiam tyrimui naudota kalibracinė kreivė nurodyta 3.7 paveiksle.



**3.7 pav.** Šviesos sugerties priklausomybė nuo cukraus koncentracijos kalibracinė kreivė

### 3.4.2. *Aspergillus niger* išskiriamos celiuliazės kiekio nustatymas

Norint nustatyti ar *Aspergillus niger* DSM 821 mikroorganizmų kultūra geba skaidyti ir pasisavinti celiuliozinę žaliava buvo atliekamas tyrimas celiuliozinio aktyvumo nustatymui. Kaip fermentavimo terpės substratas buvo naudoti celiuliozės plaušai ir Czapek-Dox HIMEDIA terpė, kurios sudėtis nurodyta 3.3 lentelėje. Fermentacijos terpės rūgštingumas buvo nustatomas tinkamiausias *A. niger* celiuliazės aktyvumui, t.y. pH = 6. Į fermentacijos terpę pasėta 2ml sporų suspensijos ir fermentacija vykdyta 10 dienų termostatuojamame kratytuve esant 32 °C temperatūrai ir 120 apsisukimų per minutę maišymo režimui. Praėjus fermentacijos laikotarpiui susidariusi biomasė buvo atskirta nuo celiuliozės ir pasverta. Gautas biomasės svoris buvo 0,1525g, o sunaudotos celiuliozės svoris nuo pradinės sudėties skyrėsi 0,0124g. Norint sužinoti išsiskyrusios celiulazės kiekį terpėje, buvo nuspręsta išsodinti fermentą koncentruotu atvėsintu amonio sulfato tirpalu. Nucentrifugavus iš tirpalo išsiskyrusį fermentą jo sausoji masė buvo 0,0351g. Terpėje susidariusios citrinų rūgšties koncentracija buvo 5,02 µg/ml. Tai parodo, kad

naudojama *Aspergillus niger* filamentinio grybo kultūra nepasižymi dideliu celiuliaziniu aktyvumu.

### 3.3 lentelė. Fermentacijos mitybinė terpė

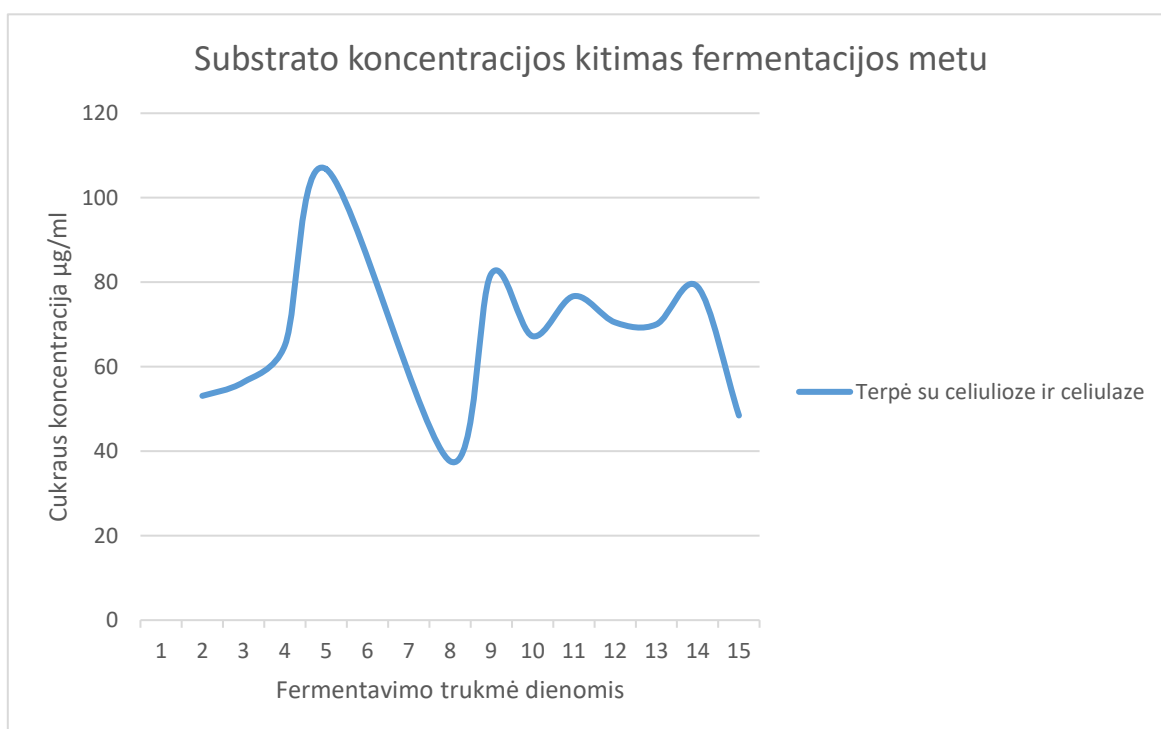
Medžiaga	Kiekis
Celiuliozė	1g
Sacharozė	3g
NaNO <sub>3</sub>	0,2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1g
MgSO <sub>4</sub>	0,005g
KCl	0,05g
FeSO <sub>4</sub>	0,001g
H <sub>2</sub> O	100ml

#### 3.4.3. Vienalaikės sacharifikacijos ir fermentacijos reakcijos atlikimas panaudojant celiuliozę kaip substratą

Citrinų rūgšties fermentacijai reikalingas gana didelis kiekis cukraus fermentacinėje terpėje, todėl siekiant panaudoti celiuliozinę žaliavą citrinų rūgšties fermentacijai prieš pradėdant fermentaciją yra tikslinga suskaidyti didelę dalį celiuliozės iki gliukozės, panaudojant fermentus. Tačiau, fermentų veikimo principai diktuoja, jog terpėje didėjant fermentinio skaidymo produktų koncentracijai reakcija lėtėja ir fermentų aktyvumas tampa mažesnis. Dėl to yra tikslinga šalinti susidariusią gliukozę iš fermentavimo terpės. Tai gali būti atliekama naudojant *Aspergillus niger* ir atliekant vienalaikę sacharifikacijos ir fermentacijos reakcija, sutrumpintai SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation). Tokio proceso metu celiuliazės fermento aktyvumo stabdymas yra mažesnis dėl iš reakcijos terpės pašalinamos gliukozės, bei dėl filamentinio grybo į terpę išskiriamo nedidelio celiuliazės kiekio. Siekiant stabilaus pH palaikymo terpėje fermentacijos metu yra reikalinga sudaryti buferinę sistemą palaikančią norimą terpės rūgštingumą.

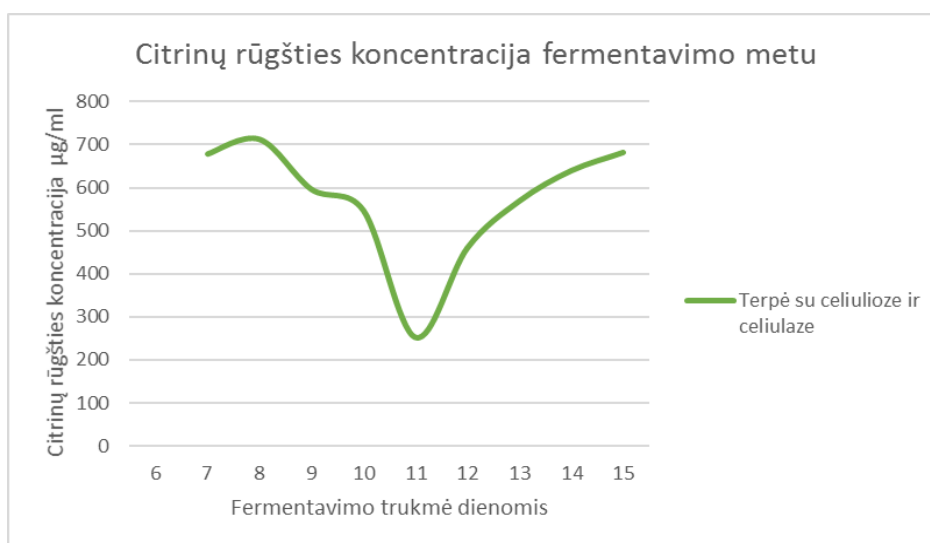
Tyrimui atlikti buvo naudojamas fermentų mišinys CeluStar XL. Šiame fermente yra didelis kiekis aktyvios celiuliazės, o optimalios sąlygos fermento veikimui yra 40 °C temperatūra ir terpės rūgštingumas lygus pH 6 vertei. Eksperimentu buvo naudojamas 1 N citratinis buferis, susidedantis iš natrio citrato ir citrinų rūgšties. Fermentinio skaidymo metu kaip celiuliozinė žaliava buvo naudojama susmulkintas celiuliozinis filtras. Siekiant nustatyti susidarančios gliukozės koncentraciją terpėje periodiškai buvo imami mėginiai ir tiriami spektrofotometriniu cukraus koncentracijos nustatymu būdu, kuomet yra naudojama DNSA. Po 6 fermentacijos dienų buvo nuspręsta, kad susidariusi cukraus koncentracija fermentavimo terpėje yra pakankama *Aspergillus niger* augimui ir citrinų rūgšties fermentacijai. Po 6 celiuliozės skaidymo parų terpėje

nustatyta gliukozės koncentracija spektrofotometriniais metodais buvo 106,77  $\mu\text{g/ml}$ . Norint užtikrinti palankias mikroorganizmo sporų sudygimui sporų suspensija į terpę buvo pasėta sumažinus jos temperatūra iki 30 °C ir pridendant reikiamą kiekį mikroelementų pagal fermentavimo terpės sudėtį nurodyta 3.1 lentelėje, o terpės rūgštingumas buvo palankus celiuliazės veikimui.



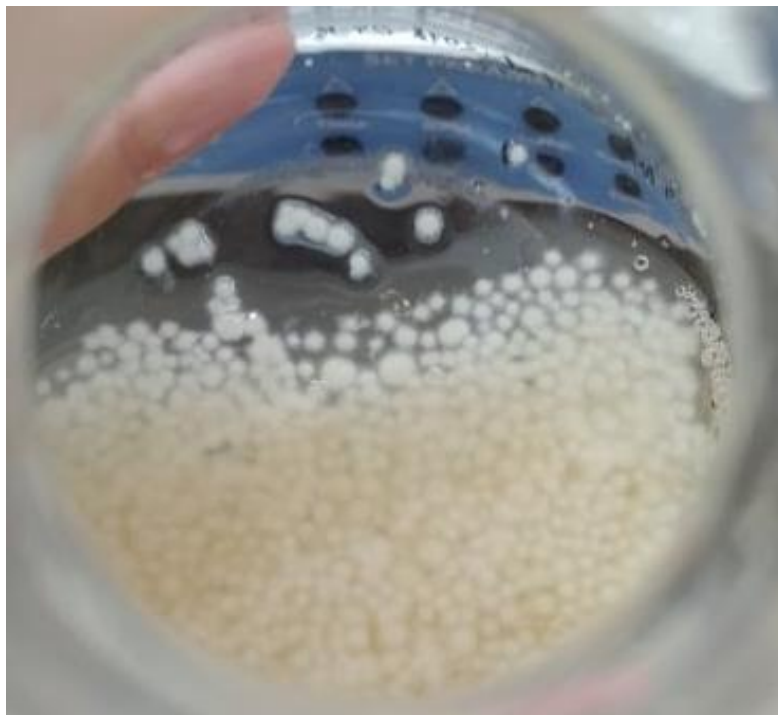
**3.8 pav.** Cukraus koncentracijos terpėje priklausomybė nuo fermentacijos trukmės

Tyrimo metu stebėtas stabilus gliukozės koncentracijos fermentacijos terpėje augimas iki laikotarpio, kol buvo pasėta *Aspergillus niger* sporų suspensija. Po sporų suspensijos pasėjimo prasidėjo sporų dygimas ir citrinų rūgšties gamyba, todėl buvo sunaudojamas didelis kiekis substrato. Staigus substrato sumažėjimas terpėje po 6 fermentacijos dienos matomas 3.8 paveiksle pavaizduotame grafike. Vėlesnėse fermentacijos stadijose cukraus koncentracija mažai svyravo ir buvo gana pastovi iki kol 14 fermentacijos dieną susinaudojo didžioji dalis substrato ir cukraus koncentracija terpėje pradėjo mažėti.



**3.9 pav.** Citrinų rūgšties koncentracijos priklausomybė nuo fermentavimo trukmės

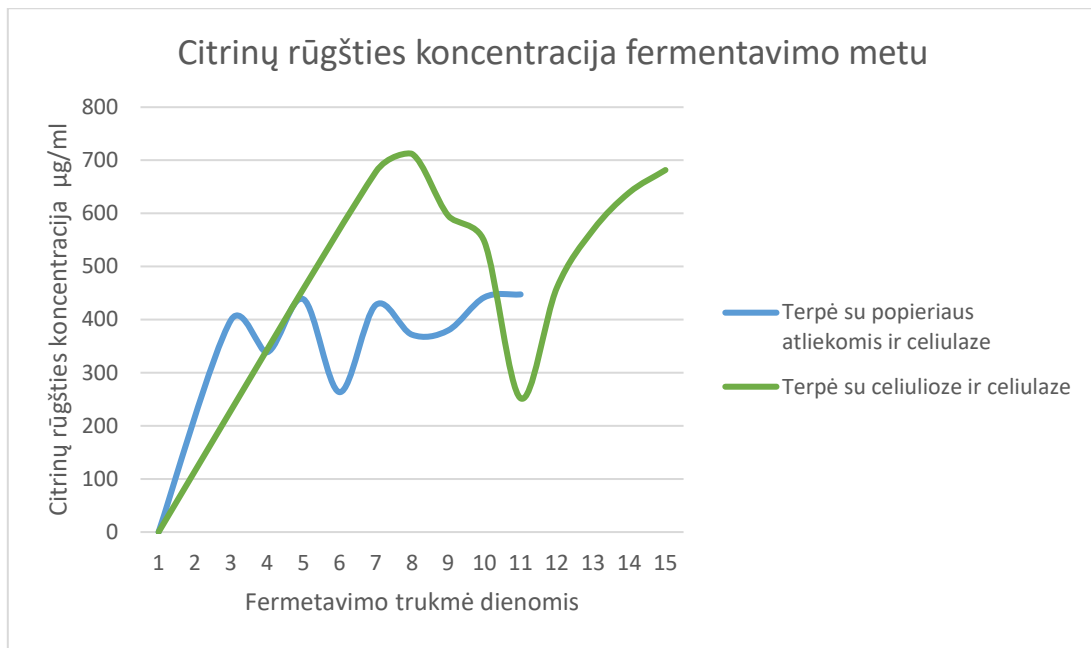
Iš 3.9 paveiksle esančio grafiko matyti, kad pasėjus sporų suspensiją į terpę prasidėjo fermentacija ir spartus citrinų rūgšties koncentracijos augimas. Taip pat po 8 fermentacijos dienos buvo stebimas didelis citrinų rūgšties koncentracijos sumažėjimas, tai galimai yra poveikis kalio ferocianido, kurio į fermentacijos terpę buvo pridėta 3 mg, norint paskatinti micelinių granulių susidarymą. Po šio priedo pridėjimo į terpę susiformavo 3-5mm dydžio sferinės micelių granulės matomos 3.10 paveiksle. Taip pat iš cukraus ir citrinų rūgšties koncentracijų grafikų galima daryti prielaidą, kad mikroorganizmas biomasę augina panaudodamas gliukozę citrinų rūgšties sudarymui, o šią biomasės suformavimui.



**3.10 pav.** Fermentacijos terpėje su celiuliozine žaliava susidariusios micelinės granulės

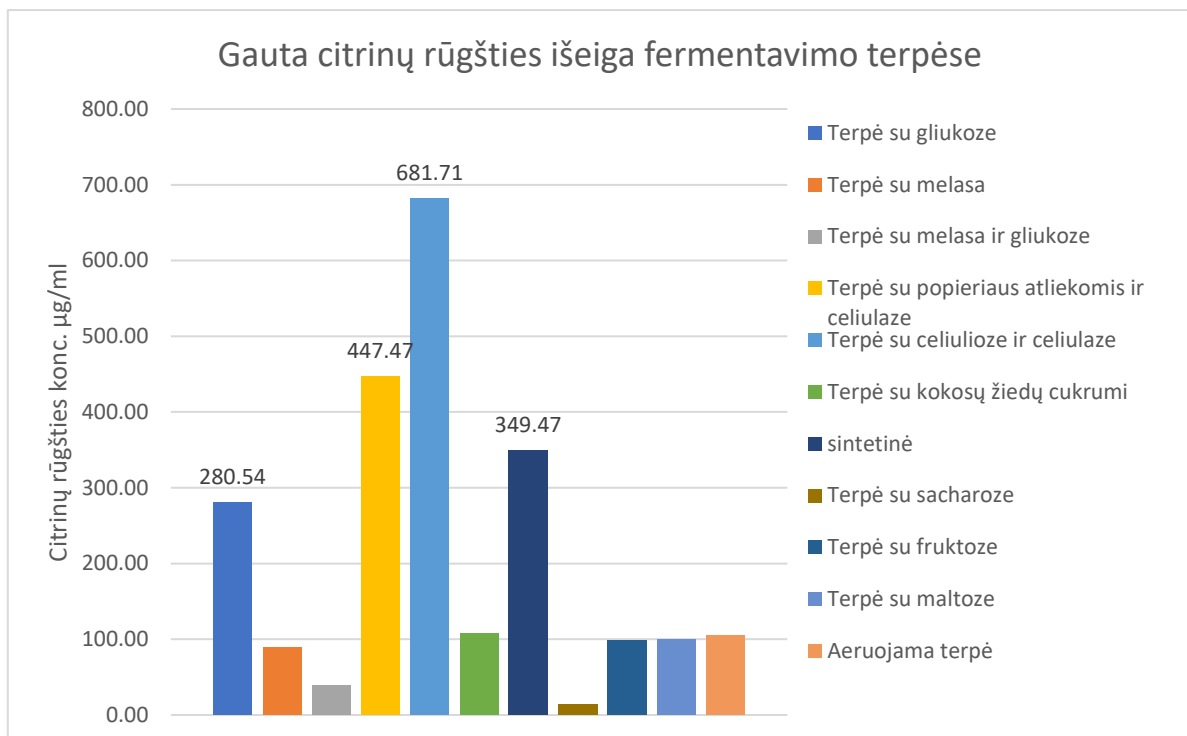
#### **3.4.4. Popieriaus perdirbimo pramoninių atliekų panaudojimas citrinų rūgšties fermentacijai**

Kaip alternatyvus grynos celiuliozės pakaitalas ir substratas citrinų rūgšties gamybai buvo išbandytos popieriaus pramonės atliekos, kurios savo sudėtyje turi susmulkintos celiuliozės plaušų. Šios atliekos susidaro popieriaus perdirbimo metu ir dėl didelio priemaišų kiekio tokių kaip kaolinas nebegali būti panaudotos pakartotinai popieriaus gaminimo procese. Norint užtikrinti didesnį paviršiaus plotą ir skersinių ryšių suskaidymą celiuliozės molekulėje buvo naudotas cheminis apdorojimas panaudojant natrio šarmo 2 % tirpalą. Tirpalas su popieriaus perdirbimo atliekomis buvo kaitinamas valanda 85 °C temperatūroje šarminiame tirpale. Baigus kaitinti, buvo leista tirpalui atvėsti iki kol išsisluoksniavo ir nusistovėjo sunkioji celiuliozės frakcija. Likęs tirpalas buvo dekantuos, o apdorota celiuliozė buvo praplauta distiliuotu vandeniu iki neutralios pH reikšmės. Gauta apdorota celiuliozė buvo apdorojama celiulazės fermentais naudojant 1 N citratinį buferį tinkamam terpės rūgštingumui užtikrinti. Fermentinis skaidymas vyko 40 °C temperatūroje ir esant 120 apsukimų per minutę maišymo režimui. Pakankamai suskaidžius terpėje esančią celiuliozę terpės temperatūra buvo sumažinta iki 30 °C ir į terpę buvo pridėtas atitinkamas kiekis terpės komponentų nurodytų 3.1 lentelėje pagal nustatytą susidariusios gliukozės kiekį terpėje.



**3.11 pav.** Susidariusios citrinų rūgšties koncentracijos palyginimas fermentavimo terpėse

Atlikus fermentacijos terpės spektrofotometrinius tyrimus citrinų rūgšties koncentracijai nustatyti paaiškėjo susidarančios citrinų rūgšties kiekis yra pakankamai didelis, lyginant su kitomis terpėmis (3.12 pav. ). Fermentacijos eigoje stebint citrinų rūgšties koncentracijos kitimą paaiškėjo, kad popieriaus perdirbimo pramoninės atliekos turinčios celiuliozės yra tinkama žaliava citrinų rūgšties fermentacijai, o žaliavoje esančios priemaišos neturi didelės įtakos tikslinio produkto koncentracijai, tai atspindi citrinų rūgšties koncentracijos grafikas pavaizduotas 3.11 paveiksle.



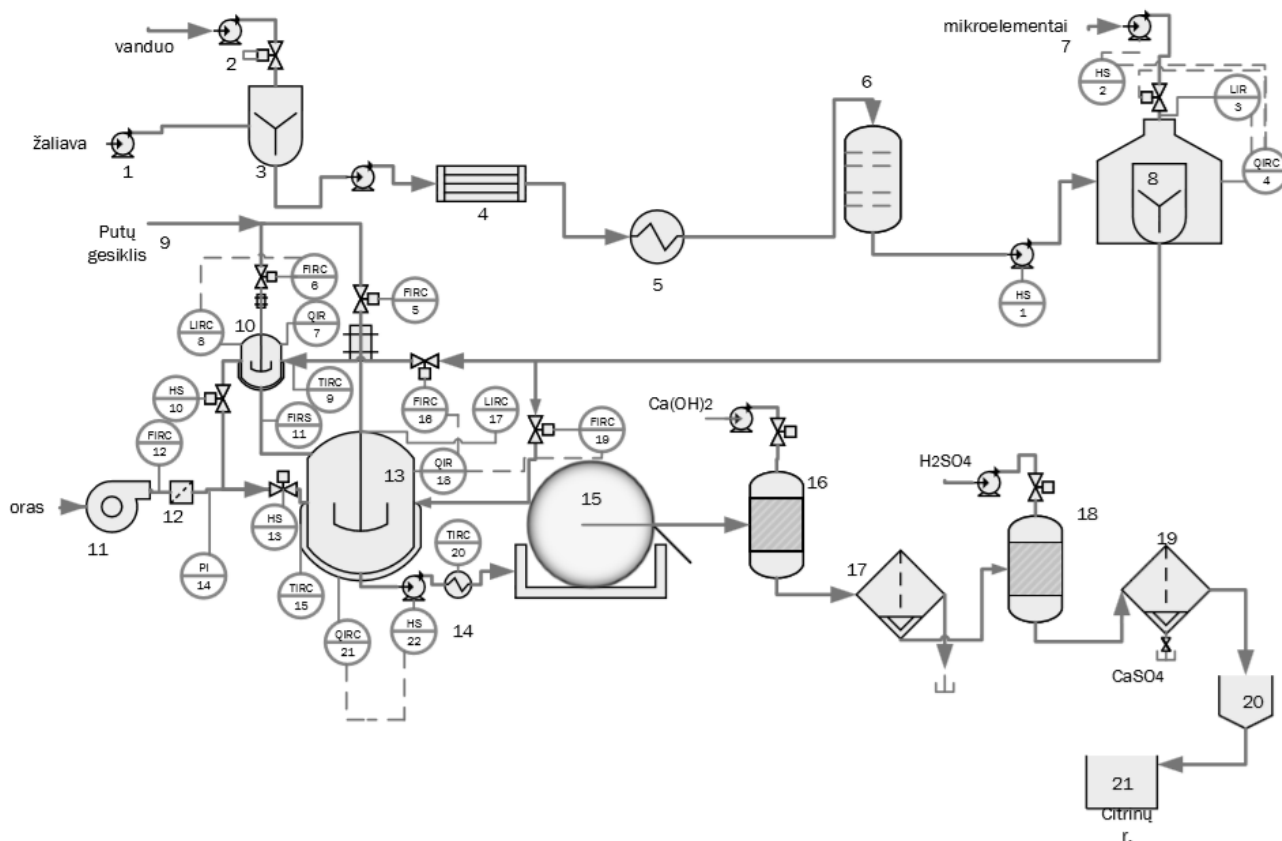
**3.12 pav.** Susidariusios citrinų rūgšties koncentracijos išeigos palyginimas skirtingose fermentavimo terpėse

Atlikus popieriaus perdirbimo atliekų peleningumo tyrimą buvo nustatyta, kad sausos žaliavos didžioji dalis yra sudaryta iš neorganinių temperatūrai atsparių ir nedegių priemaišų ši dalis

sudarė net 64,95 %. Tyrimas atskleidė, jog galima alternatyvi žaliava citrinų rūgšties gamybai gali būti popieriaus pramonės atliekos, o šių atliekų panaudojimas užtikrintų iš menkaverčių atliekų pagaminamo paklausaus produkto konkurencingos kainos sukūrimą ir išmetamų į aplinką atliekų sumažinimą.



## 4. Rekomendacijų dalis



4.1 pav. Automatizuota technologinė schema citrinų rūgšties gamybai

### 4.1. lentelė. Prietaisų lentelė

Nr.	Prietaisas arba komponentas/medžiaga
1	Žaliavos (gliukozės sirupas, melasa) siurblys
2	Vandens siurblys
3	Tinkamos cukraus konc. sudarymo talpykla
4	Terpės filtracijos celė
5	Sterilizatorius
6	Jonų mainų kolona
7	Papildomų mikroelementų talpykla
8	Mikroelementų homogenizavimas tirpinant, maišant
9	Medžiagos mažinančios putojimą
10	Inokuliumo sudarymo aeruojamas fermentatorius su maišikliu
11	Orapūtė
12	Oro filtras
13	Aeruojamas fermentatorius citrinos r. gamybai su maišikliu
14	Kaitinimo kamera micelių baltymų koaguliavimui
15	Rotacinis vakuuminis filtras su skruberiu
16	Kieto citrato reakcijos metu sudarymo talpykla
17	Dviejų fazių separatorius
18	Reakcijos kolona
19	Dviejų fazių separatorius
20	Priemaišų šalinimas
21	Kristalizatorius

#### 4.1. Technologijos aprašas

Fermentacijai panaudojama žaliava - melasa. Šios žaliavos technologiniame procese per metus sunaudojama 22,934,000 kg. Melasa praskiedžiama tinkamos cukraus konc. sudarymo talpykloje **3** vandeniui iki 20 % cukraus koncentracijos. Terpėje siekiant nustatyti tinkamą cukraus koncentraciją reikia įrengti automatinį klampos matuoklį, kurio rodmenys tiesiogiai kontroliuotų tiekiamo vandens kiekį. Melasos tirpalas nufiltruojamas terpės filtracijos celėje **4** siekiant pašalinti nuosėdas. Nufiltruotas tirpalas sterilizuojamas karščiu sterilizatoriuje **5**, 90 °C temperatūroje 2 valandas, todėl būtina įrengti temperatūros reguliavimo terpėje sistemą. Mikroelementų kiekis žaliavoje ištiriamas analitiniu būdu laboratorijoje. Žaliava esant per dideliu mikroelementų kiekiui papildomai filtruojama jonų mainų kolonoje **6**. Pridedama reikiami kiekiai mikroelementų tirpalų ir viskas sumaišoma homogenizavimo talpykloje **8**. Iš *Aspergillus niger* sporų paruošiamas inokuliumas, inokuliumo sudarymo aeruojamame fermentatoriuje su maišikliu **10**. Siekiant užtikrinti tinkamas fermentacijos sąlygas būtina kontroliuoti temperatūrą, ją palaikant 28-30 °C ribose, terpėje ištirpusio deguonies kiekį- 0.15 VVM ir maišymo greitį 190 aps/min. Fermentacijos terpėje susidaro 3-5 mm dydžio micelės ir atitinkamai pasikeičia terpės šviesos sugertis. Susidarius tinkamam inokuliumui visas inokuliacijos fermentatoriaus tūris transportuojamas į 10 kartų didesnę aeruojamą fermentatorių citrinių r. gamybai su maišikliu **13**. Fermentatoriuje **13** palaikomas tinkamas ištirpusio deguonies kiekis ( 1.0 VVM) skystoje terpėje ir užtikrinamas tinkamas maišymo režimas 190 aps/min ir palaikoma temperatūra 28-30 °C. Siekiant sumažinti putų susidarymą pridedamas minimalus kiekis putų gesiklio **9**. Vykstant fermentacijai susidaro šiluma, kuri dalinai pašalinama aeracijos metu, tačiau terpės temperatūra turi būti palaikoma 28-30°C, todėl būtina įrengti temperatūros stebėjimo ir palaikymo sistemą. Fermentacija vykdoma 7 dienas nuolatos stebint susidariusios citrinų rūgšties kiekį ir likusį maistinių medžiagų kiekį. Terpėje sumažėjus fermentacijai būtinų reagentų daugiau nei 30 % pradinio kiekio terpė atitinkamai papildoma reikiamu žaliavos kiekiu.

Pasiekus maksimalų tikslinio produkto kiekį visas fermentatoriaus **13** turinys tiekiamas į rotacinį vakuuminį filtrą **15**, prieš tai terpės baltymus koaguliavus kaitinimo kameroje **14**, 65 °C temperatūroje. Nuskaidrinta terpė tiekiamas į talpyklą **16**, kurioje sumaišoma su atitinkamu kiekiu kalcio hidroksido, siekiant neneutralizuoti visą citrinų rūgštį ir ją išskirti iš terpės kieto kalcio citrato pavidalu. Neutralizuojant citrinų rūgštį terpės pH tampa artimas **7**, todėl reikalinga terpės rūgštingumą stebinti sistema. Kietos nuosėdos atskiriamos dviejų fazių separatoriumi **17**. Kietas filtratas perkeliamas į maišomą reakcijos talpyklą **18**, į kurią tiekiamas atitinkamas kiekis sieros rūgšties tirpalo, kol ištirpsta visa citrinų rūgštis ir kaip pašalinis produktas susidaro gipsas. Kietas citratas pavirsta į citrinų rūgštį terpės pH esant 3,13, todėl reikalinga terpės rūgštingumo stebėsenos sistema. Visas tirpalas tiekiamas į kitą dviejų fazių separatorių **19**. Gautas tirpalas skaidrinamas aktyvuota anglimi priemaišų šalinimo talpykloje **20** ir iš karto koncentruojamas ir kristalizuojamas kristalizatoriuje **21**. Visų gryninimo pakopų metu ypač svarbu palaikyti tinkamą pH ir terpės temperatūrą.

## Išvados

1. Optimaliu anglies šaltiniu citrinų rūgščiai pagaminti buvo gliukozė.
2. Didžiausia citrinų rūgšties išeiga gauta terpėje su fermentais hidrolizuota celiulioze. Pagal analitinius metodus šioje terpėje citrinų rūgšties koncentracija buvo 681,71  $\mu\text{g/ml}$ .
3. Didžiausias sacharidų suvartojimas 69,13  $\mu\text{g/ml}$  buvo nustatytas terpėje su hidrolizuota celiulioze.
4. Optimalioje terpėje su gliukoze susidarė tinkamos micelių struktūros granulės.
5. Tinkama micelių granulių struktūra su divalenčiais jonais terpėje nesusiformavo

## Literatūros sąrašas

1. Optimization of Medium Components for Citric Acid Production by *Aspergillus niger* MTCC 281 [ineraktyvus] [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: [https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/123463/17/17\\_chapter%208.pdf](https://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/123463/17/17_chapter%208.pdf)

2. MURAD A. EL-HOLI and KHALAF S. AL-DELAIFY. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger* [ineraktyvus]. 2003. 11-17 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/1452/1/jb03072.pdf>

3. C.T. TRAN, L.I. SLY & D.A. MITCHELL. Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid-state fermentation [interaktyvus] 1998 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1023/A:1008821413239

4. B. MAX; J. M. SALGADOI; N. RODRÍGUEZ; S. CORTÉS; A. CONVERTI; J. M. DOMÍNGUEZ. Biotechnological production of citric acid [interaktyvus] 2010. 22, 28-29 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi:10.1590/S1517-83822010000400005

5. A.ROKOSu, C. A.ANENIHA. Effects of various conditions on the production of citric acid during fermentation of molasses by *Aspergillus niger* [interaktyvus] 1980 158-164[žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1016/0141-0229(80)90010-1

6. G. XIE and T.P. WEST. Citric acid production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 from a treated ethanol fermentation co-product using solid-state fermentation [interaktyvus] 2008. 7-11 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02586.x

7. Jrki KOM~NEK. MAX ROEHR CHRISTIAN P. KUBICEK. CITRI CACID [interaktyvus] 1996. 176-181[žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://dokumen.tips/documents/biotechnology-set-citric-acid.html>

8. I. KHALIL L. MAJUMDER. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Molasses and Pumpkin as Substrates [interaktyvus] 2010 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: [http://www.idosi.org/ejbs/2\(1\)10/1.pdf](http://www.idosi.org/ejbs/2(1)10/1.pdf)

9. S. GAMAL M. ALI. Optimization of Fermentation Conditions for Citric Acid Production by *Aspergillusniger* in Submerged Culture [interaktyvi] 2012 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per:

<http://khartoumspace.uofk.edu/bitstream/handle/123456789/13035/Optimization%20of%20Fermentation%20Conditions%20for%20Citric%20Acid%20Production%20by%20Aspergillusniger%20in%20Submerged%20Culture.pdf?sequence=1>

10. V.S. SHANKARANAND and B.K. LONSANE. Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system [interaktyvus] 1993. 15 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: [https://docksci.com/coffee-husk-an-inexpensive-substrate-for-production-of-citric-acid-by-aspergillu\\_5b0a1849d64ab275616b1810.html](https://docksci.com/coffee-husk-an-inexpensive-substrate-for-production-of-citric-acid-by-aspergillu_5b0a1849d64ab275616b1810.html)

11. F. C. PRADO , L. P. S. VANDENBERGHe , A. L. WOICIECHOWSKI , J. A. RODRÍGUES-LEÓN and C. R. SOCCOL. CITRIC ACID PRODUCTION BY SOLID-STATE FERMENTATION ON A SEMI-PILOT SCALE USING DIFFERENT PERCENTAGES OF TREATED CASSAVA BAGASSE [interaktyvus] 2005. 9-13 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://www.scielo.br/pdf/bjce/v22n4/26971.pdf>

12. Omkar Sawant, Sagar Mahale, Vanitha Ramchandran, Geetha Nagaraj, Ashok Bankar. FUNGAL CITRIC ACID PRODUCTION USING WASTE MATERIALS: A MINI-REVIEW [interaktyvus] 2018. 1-6 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.15414/jmbfs.2018.8.2.821-828

13. G. XIE and T. P. WEST. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* on Corn Distillers` Grains with Solubles [interaktyvus] 2006. 3-7[žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.3923/jm.2006.228.233

14. G. XIE and T. P. WEST. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* on the Ethanol Dry Milling Coproduct Thin Stillage [interaktyvus] 2007. 2, 5-9 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.3923/jm.2007.678.683

15. H. S. AUTA, K.T. ABIDOYE, H. TAHIR, A. D. IBRAHIM, and S. A. ARANSIOLA. Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Cultivated on *Parkia biglobosa* Fruit Pulp [interaktyvus] 2014 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1155/2014/762021

16. H. KIEL, R. GUVVIN, and Y. HENIS. Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger* on Low Sugar Concentrations and Cotton Waste [interaktyvus] 198. 18, 22-30 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243951/>

17. C. R. SOCCOL, L. P. S. VANDENBERGH, C. RODRIGUES. New Perspectives for Citric Acid Production and Application [interaktyvus] 2006. 77-83, 90-110 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://pdfs.semanticscholar.org/8989/7f1a3529491ddfa7aa753ab55ee376aa7696.pdf>

18. C. MADHUSUDAN, S. MANOJ,C. M RISHI. Citric acid production from cane molasses using submerged fermentation by *Aspergillus niger* ATCC9142 [interaktyvus] 2010. 2-9, 17 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <http://jprsolutions.info/files/final-file-5590ed3ae3a079.16312146.pdf>

19. G XIE , T P WEST. Citric Acid Production by *Aspergillus Niger* ATCC 9142 From a Treated Ethanol Fermentation Co-Product Using Solid-State Fermentation [interaktyvus] 2009. 11 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02586.x

20. J. N. CURRIE. THE CITRIC ACID FERMENTATION OF ASPERGILLUS NIGER. [interaktyvus] 1917. 81-119 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://www.jbc.org/content/31/1/15.full.pdf>

21. H. BUSCH. ANION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY OF ACIDS OF THE CITRIC ACID CYCLE [interaktyvus] 1952. 13 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://www.jbc.org/content/196/2/717.full.pdf>

22. HPLC Analysis of Pseudoephedrine and Citric Acid on Primesep Column [interaktyvus] 2002 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://www.sielc.com/compound-citric-acid.html>

23. J. R. MARIER, M. BOULET. DIRECT DETERMINATION OF CITRIC ACID IN MILK WITH AN IMPROVED PYRIDINE-ACETIC ANHYDRIDE METHOD [interaktyvus] 1952. 8-14 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(58\)91152-4/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(58)91152-4/pdf)

24. H. OLBRICH. THE MOLASSES [interaktyvus] 2006. 135-170 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: [http://www.biotechnologie-kempe.de/Molasses\\_OLBRICH.pdf](http://www.biotechnologie-kempe.de/Molasses_OLBRICH.pdf)

25. S. ASHRAF, S. ALI, IKRAM-UL-HAQ. Acidic pre-treatment of sugarcane molasses for citric acid production by *Aspergillus niger* NG-4 [interaktyvus] 2015. 36, 65-116 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://www.ijemas.com/vol-4-6/Shazia%20Ashraf,%20et%20al.pdf>

26. S. N. CHINEDU. Assessment of Growth and Cellulase Production of Wild-Type Microfungi Isolated from Ota, Nigeria [interaktyvus] 2010. 11,18, 36-41 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.3923/ajps.2010.118.125

27. Introduction to Enzymes [interaktyvus] 1972, 5-9 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <http://www.worthington-biochem.com/introBiochem/enzymeConc.html>

28. P. K. ROBINSON. Enzymes: principles and biotechnological applications [interaktyvus] 2015 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1042/bse0590001

29. W. HOU, J. BAO. Simultaneous Saccharification and Aerobic Fermentation of High Titer Cellulosic Citric Acid by Filamentous Fungus *Aspergillus Niger* [interaktyvus] 2018. 15-32, 38 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.011

30. S. ASHRAF, S. ALI, IKRAM-UL-HAQ. Pre-Treatment of Raw Sugarcane Molasses by Metal Complexing Agents for Improved Citric Acid Fermentation by *Aspergillus Niger* [interaktyvus] 2016. 7 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <http://www.ijrpb.org/pdf/v2-i6/6.pdf>

31. M. GHAREIB. Production of citric acid from molasses in presence of potassium ferrocyanide by *Aspergillus aculeatus* and *A. carbonarius* [interaktyvus] 1979. 8-13 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per:

[https://www.academia.edu/28298069/Production\\_of\\_citric\\_acid\\_from\\_molasses\\_in\\_presence\\_of\\_potassium\\_ferrocyanide\\_by\\_Aspgillus\\_aculeatus\\_and\\_A.\\_carbonarius](https://www.academia.edu/28298069/Production_of_citric_acid_from_molasses_in_presence_of_potassium_ferrocyanide_by_Aspgillus_aculeatus_and_A._carbonarius)

32. P.C. TRIVEDI. Advances in Microbiology [interaktyvus] 2003. 185-203 [žiūrėta 2020-05-31] ISBN: 81-7233-332-3

Prieiga per: <https://books.google.lt/>

33. S. AKULA, N. GOLLA. Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus niger* Isolated from Forest Soil [interaktyvus] 2018. [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.2174/1874070701812010256

34. A.NARASIMHA , P. SRIDEVI , B. VISWANATH, S. CHANDRA , R. REDDY. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* [interaktyvus] 2005. 12-38 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per:

[https://www.researchgate.net/publication/232735097\\_Nutrient\\_effects\\_on\\_production\\_of\\_cellulolytic\\_enzymes\\_by\\_Aspergillus\\_niger](https://www.researchgate.net/publication/232735097_Nutrient_effects_on_production_of_cellulolytic_enzymes_by_Aspergillus_niger)

35 V. MEYER , M. FIEDLER, B. NITSCHE, R. KING. The Cell Factory *Aspergillus* Enters the Big Data Era: Opportunities and Challenges for Optimising Product Formation [interaktyvus] 2015. 6-18 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1007/10\_2014\_297

36. H. KIEL, R. GUVIRIN, Y. HENIS. Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger* on Low Sugar Concentrations and Cotton Waste [interaktyvus] 1980. 42, 45-52[žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243951/pdf/aem00188-0009.pdf>

37. C. R. SOCCOL, L. P. S. VANDENBERGHE, C. RODRIGUES, A. PANDEY. New Perspectives for Citric Acid Production and Application [interaktyvus] 2006.22, 28 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://pdfs.semanticscholar.org/8989/7f1a3529491ddfa7aa753ab55ee376aa7696.pdf>

38. P. L. SHOW, K. O. OLADELE. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger* [interaktyvus] 2015. 6-20 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per doi: 10.1080/21553769.2015.1033653

39. P. L. SHOW, K. O. OLADELE. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger* [interaktyvus] 2007 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per:

<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/1292/1/JSIR%2066%288%29%20%282007%29%20618-620.pdf>

40. L. P. S. VANDENBERGHE, C. R. SOCCOL , A. PANDEY and J. LEBEAULT. Microbial Production of Citric Acid [interaktyvus] 1999. 23-30 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: <https://www.scielo.br/pdf/babt/v42n3/v42n3a01.pdf>

41. P. SHU, M. J. JOHNSON. The Interdependence of Medium Constituents in Citric Acid Production by Submerged Fermentation [interaktyvus] 1948. 86-92 [žiūrėta 2020-05-31] PMID: PMC518625

Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC518625/?page=9>

42. COMPOUND SUMMARY Citric acid [interaktyvus] 2004 [žiūrėta 2020-05-31]

Prieiga per: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/citric\\_acid#section=Names-and-Identifiers](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/citric_acid#section=Names-and-Identifiers)

43. What is citric acid (E330) and is it synthetic or natural? [interaktyvus] 2017 [žiūrėta 2020-05-31] Prieiga per: <http://www.food-info.net/lt/e/e330.htm>