



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 20 06 78

(21) PV 4054 - 78

(40) Zverejnené 30 11 79

(45) Vydané 15 10 82

200 029

(11) (B 1)

(51) Int. Cl.³

C 12 N 1/38

(75)

Autor vynálezu GUŤOVÁ EVA ing., HLOHOVEC
VAROŠEK ŠTEFAN ing., PIEŠŤANY
FILIPOVÁ BRIGITA, HLOHOVEC

(54)

Zvýšenia aktivity produkčného kmeňa *Aspergillus niger* pri technickej fermentácii kyseliny citrónovej

1

Vynález sa dotýka zvýšenia aktivity produkčného kmeňa *Aspergillus niger* pri technickej fermentácii kyseliny citrónovej pestovaním kmeňa na zmenenom živnom médiu.

Kmeň *Aspergillus niger* pestovaný na kultivačnej pôde s doteraz používaným zložením dáva nestabilné výťažky kyseliny citrónovej, veľmi závislé na kvalite sladinky. Spoluprácia býva často spomalená, konídie tmavosivé, drobné, konídionosiče nízke. V citrolúhoch aj ku koncu kvasenia sa chromatografickou metódou zisťuje značné množstvo kyseliny jablčnej. Nárast acidity pri citrokvasení je pomalý.

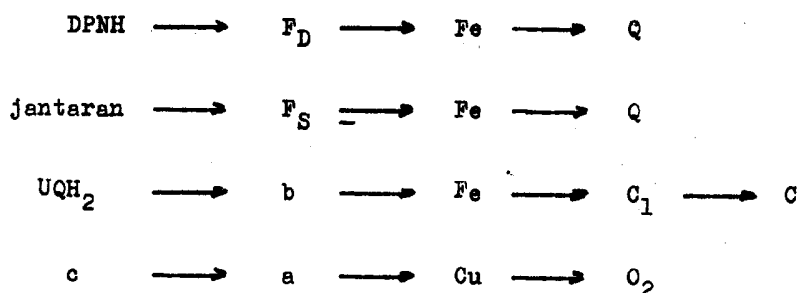
Vyššie uvedené nedostatky sú eliminované zvýšením aktivity kmeňa *Aspergillus niger* aplikovaním systému ovplyvňovania pôvodného kmeňa zmenou jeho kultivačných podmienok tak, aby sa zlepšila enzymatická činnosť plesne *Aspergillus niger*, hlavne činnosť oxidoreduktáz a aby sa zlepšil transport živín do buniek.

Takto vypestovaná nová odroda - výživový mutant - pri správnej technológii kvasenia dáva vysoké a stabilné výťažky kyseliny citrónovej.

Kyselina citrónová je produkovaná kmeňom *Aspergillus niger*. Prítomnosť vedľajších kyselín v citrolúhoch svedčí o tom, že kyselina citrónová sa tvorí ako výsledok reakcií di- a tri-kyrboxylových kyselín, ale súčasne s týmito reakciami prebiehajú aj reakcie bočné, napríklad kondenzácia zlúčenín C₂ a C₄, vznikajúcich štiepením molekúl glukózy. Všetky tieto reakcie sú katalyzované príslušnými enzýmami. Množstvo kyseliny citrónovej a rýchlosť jej

hromadenia teda priamo úmerne závisi od aktivity enzýmov, ktoré umožňujú tvorbu kyseliny jej cyklom, alebo bočným cyklom z vedľajších kyselín.

Z energetického hľadiska sú dôležité hlavné enzýmy NAD^+ a FAD^+ , ktoré sa nachádzajú v mitochondriách buniek. Prenos elektrónov, ktorých donorom je NADH alebo kyselina jantárová, tvorí niekoľko komplexov. Tri z nich obsahujú nehmotne železo, štvrtý pevne viazanú meď. Prenos elektrónov umožňujú pohyblivé složky.



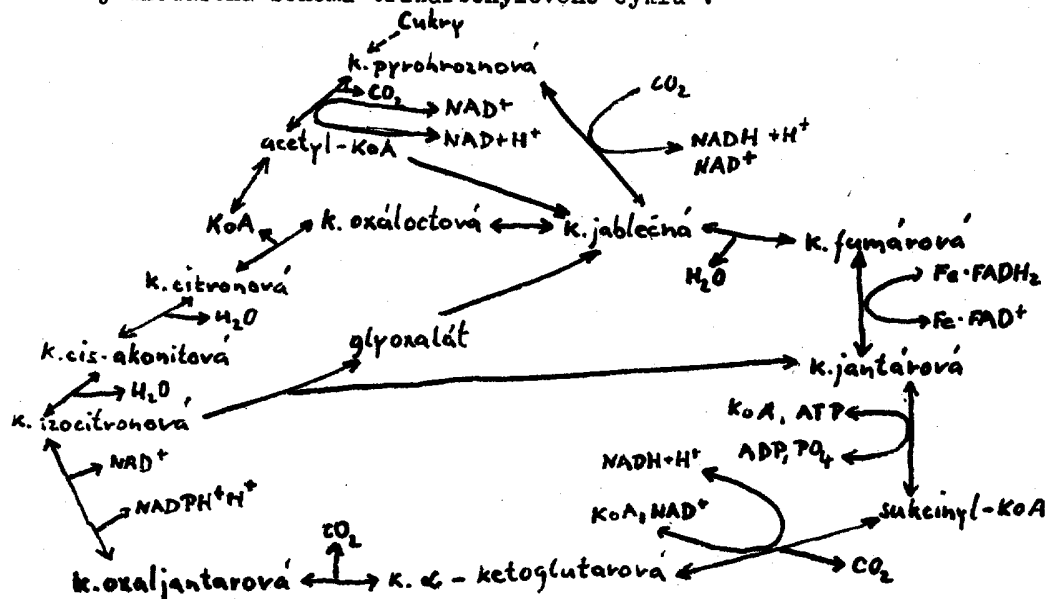
kde F_D , F_S - dehydrogenázy NADH a kys, jantárovej

UQ - ubichinón - koenzým Q

a, b, c, C_1 - cytochrómy

Posledným stupňom je prenos elektrónov na kyslík a výsledkom je oxidácia substrátu. Permentné reakcie v Krebsovom cykle zabezpečujú $\text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{NAD}^+$ a jeho opätovná účasť na oxidácii. Prenos uhlíka z redukovaných nikotínamidových dehydrogenáz katalyzujú flavoproteíny. Akceptorom elektrónov je železo hému, ktoré pri oxidácii mení valenciu.

Zjednodušená schéma trikarboxylového cyklu :



Oxidázy a peroxidázy majú kov /železo, meď/ v prostetickej skupine. Môžu byť týmto stopovými prvkami aktivované. Pre dobrý priebeh fermentácie a rýchle nahromadenie metabolitov je však okrem aktívneho enzymatickeho systému potrebný i zvýšený transport látok do buniek. Tento transport zabezpečuje cytoplazmatická membrána. Môže byť pasívny - nevyžaduje energiu, alebo aktívny - podmienený využitím energie ATP, vzniknutého v bunke. Ide o výmennú reakciu. Pri nahromadení K^+ , Mg^{2+} , $H_2PO_4^-$ sa uvoľňuje H^+ a Na^+ . Pri aktívnom prenose, ale aj pri difúzii sa do bunky dostávajú ióny sodné a z bunky ióny draselné.

Nahromadenie kyseliny citrónovej závisí od vhodných živných pôd, na ktorých sa *Aspergillus niger* pestuje. Spoluračná pôda musí zabezpečiť rýchly rast plesne a dobrú spoluprácu. Už na jej zložení závisí, aký enzymatický systém si plesň vytvorí. Aktivita tohoto enzymatickeho systému závisí i od kultivačných podmienok /teplota, pH, atď./.

Pretože energeticky dôležité oxidoreduktázy FAD^+ a NAD^+ , ktoré ovplyvňujú tvorbu kyseliny citrónovej jej cyklom i vedľajšími dráhami majú v prostetickej skupine železo a meď, sú tieto oxidoreduktázy aktivované soľami železa a medi. Aktivovaním enzýmov nastáva rýchlejší nárast acidity, vyžadujúci rýchlejší transport látok /hlavne glukózy/ do buniek, ktorý je podmienený výmennou reakciou medzi sodnými a draselnými iónmi cytoplazmatickou membránou. Docieluje sa to znížením obsahu draselných solí a pridaním sodných solí vo forme $NaCl$ alebo Na_2SO_4 . $NaCl$ pôsobí navyše aj termostabilne a aktivuje niektoré enzýmy tým, že komplex s pozitívnym kovom pomerne malého priemeru, vytvára novú konfiguráciu v roztoku, ktorá môže byť výhodnejšia pre štruktúrne usporiadanie niektorých enzým-substrátových komplexov. Kládny vplyv na zlepšenie transportu do bunky má súčasne i zníženie fosforečných a horečnatých solí.

Na takto upravenej kultivačnej pôde prebieha kultivácia 9 dní pri teplote $32^\circ C$ a 1 deň pri teplote $24^\circ C$. Konídie sú čierne, veľké, konidionosiče vysoké. Získané konídie v laboratórnych podmienkach dávajú stabilné výsledky vo výťažku kyseliny citrónovej vždy nad 80 %. Dobré výsledky vo výťažku kyseliny citrónovej boli dosiahnuté i v prevádzke na komorách, kde priemerný výťažok kys. citrónovej bol 72 %. Pre konídie vypestované na novej sporulačnej pôde je typický prudký nárast acidity sprevádzaný zvýšením uvoľnením tepla, ktoré je nutné do tretieho dňa citrokvasenia odoberať.

Na takto technologicky správne vedených komorách, v 9. deň citrokvasenia obsahujú citrolúhy kyselinu citrónovú, z vedľajších kyselín v malom množstve kyselinu glukónovú a niekedy v minimálnom množstve kyselinu jablčnú. Priemerné množstvo cudzích kyselín stanovené cez citren vápenatý je 0,1 %. V citrolúhoch sa nenachádza kyselina šťavelová. Z dôvodu zníženia množstva kyseliny glukónovej doporučuje sa pasáž kyselinou mravčou, prípadne glycerínom.

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené výsledky vplyvu zmeny zloženia sporulačnej pôdy na aktivnosť kmeňa *Aspergillus niger* pri fermentácii na melasovom substráte v Erlenmayerových bankách.

Sporulačná pôda	výťažok kyseliny citrónovej v %
-----------------	---------------------------------

1.	/K/	pôvodná pôda	72,6
2.	/K/	+ Na ⁺	67,3
3.	/K/	+ Fe ²⁺	78,3
4.	/K/	+ Fe ²⁺ + Na ⁺	79,9
5.	/K/	+ Fe ²⁺ + Na ⁺ + Cu ²⁺ - - Mg ²⁺ - KN ₂ PO ₄	91,4

Výsledky charakterizujú produkčnú aktivitu kmeňa *Aspergillus niger*, kultivovaného na rôznych pôdach. Vzrast výťažnosti u spór získaných na pôde so zmeneným zložením je v priemere 17 % pri 20 paralelkách, čo je štatisticky významný rozdiel.

Prevádzkové skúšky sú nasledovné :

Substrát očkovaný spormi kmeňa <i>Aspergillus niger</i>	Ø výťažok kys.citr.titr. na nasadený cukor	Ø výťažok kys.citr.bez cudzích kyselín
pôvodnými /P/	58,6	58,3
novými /N/	71,8	71,7

Zhodnotenie prevádzkových výsledkov :

- Ø- výťažnosť u spór N je vyššia o 13 %
- Ø tvorba vedľajších kyselín sledovaná cez citran vápenatý je 0,1 %
- chromatograficky v citrolúhoch zistená kyselina citrónová, málo kyselina glukonová, kyselina jablčná len niekedy v minimálnom množstve
- mycélium morfológicky zdravé, pevné
- od 4. dňa citrokvasenia prudký nárast acidity, zvýšené uvoľňovanie tepla .

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob zvýšenia aktivity produkčného kmeňa *Aspergillus niger* pri technickej fermentácii kyseliny citrónovej, vyznačujúci sa tým, že sa spóry produkčného kmeňa získavajú kultiváciou na pôde, ktorá vedľa obvykle používaných látok obsahuje síran železnatoamónny kryštalický 2 mg/l, síran miednatý kryštalický 0,6 mg/l, chlorid sodný 10,0 g/l, za súčasného zníženia obsahu dihydrofosforečnanu draselného na 0,06 g/l a síranu horečnatého kryštalického na 0,05 g/l.