



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206 988

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 24 10 79
(21) PV 7183-79

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 15 09 80
(45) Vydáno 01 11 83

(75)

Autor vynálezu LEOPOLD JINDŘICH doc. dr. ing., ULČ JAROSLAV ing., PLZEŇ, ČERNÝ VÁCLAV ing.,
PAŠEK JAROSLAV a TREFIL LADISLAV ing., KAZNĚJOV

(54) Průmyslový kmen houby *Aspergillus niger* van Tieghem CCM - F - 663

1

Vynález se týká průmyslového kmene (metanty) houby druhu (species) *Aspergillus niger* van Tieghem.

Průmyslové produkční kmeny mají to společné, že je u nich zvlášť výrazně vyvinuta schopnost produkce určitého metabolitu, v případě citronového kvašení produkce kyseliny citronové. Projevují se však mezi nimi dosti významné rozdíly nejen v intenzitě biochemických procesů, ale i v jiných vlastnostech, např. v tvorbě cizích kyselin, rychlosti klíčení konidií, růstu hyf a mycelia. Rozdíly mohou být vůči kontaminacím, inhibitorům melas, přísady hexakvanoželeznatému draselného, stopových prvků, tak i způsobu přípravy melasového substrátu. Dva různé kmeny houby *Aspergillus niger* mohou na jedné melase produkovat stejná, na druhé melase rozličná množství kyseliny citronové. Projevuje se zde vliv různého složení melas, přičemž hrají význačnou roli v melase přítomné stimulatory a inhibitory růstu a tvorby kyseliny citronové. Průmyslové produkční kmeny jsou sice hodnoceny především z hlediska intenzity produkce kyseliny citronové, jejich hodnoty však může být zvýšena popř. snížena dalšími vlastnostmi. Současný nejlepší provozně použitelný kmen chráněný podle čs. autorského osvědčení č. 180276 tvoří na vhodných melasách zpracovávaných běžným způsobem maximálně 75 % kyseliny citronové, ale na méně vhodných melasách pouze 60 až 70 %. Kromě toho není schopen efektivně prokvasit vrstvu substrátu vyšší než 9 cm nebo substrát s koncentrací cukru vyšší než 15 %.

Uvedené nedostatky tohoto kmene odstraňuje vynález, jímž je nový průmyslový kmen houby druhu (species) *Aspergillus niger* van Tieghem, interně označovaný jako kmen L2, získaný mutací parentálního kmene L houby *Aspergillus niger*. Nový kmen je uložen v Čs. sbírce mikroorganismů University J.E.Parkyně v Brně, Třída obránců míru č. 10 pod označením CCM-F-663. Vynález, to je kmen L2 předčí parentální kmen L ve vyšší výtěžnosti o 3 až 8 % kyseliny citronové, a zvláště tím, že lze jeho spory snadněji získat ze sporulační agarové půdy připravené podle autorského osvědčení č. 196162, spory klíčí rychleji a souvislá blanka mycelia se vytvoří o 3 až 5 hodin dříve a je méně citlivý vůči inhibitorům melas, které působí smáčení a potápění mladého mycelia při startu kvasného cyklu. Vůči současnému provoznímu kmenu L1 se vyznačuje vyššími výtěžky kyseliny citronové o 8 až 15 %, schopností efektivně zkvasit melasový substrát s obsahem 15 % cukru o výšce vrstvy substrátu 9 až 15 cm, popř. koncentrací cukru až do 18 %. Předpokladem dosažení uvedených výsledků s vynálezem, tj. kmenem L2 je jeho kombinace s melasovým substrátem zbaveným inhibitorů klíčení spor a růstu hyf, například substrátem připraveným podle Doc.Dr.ing. Leopolda a kol., který umožňuje jeho růst a intenzivní biochemickou činnost nebo postupem publikovaným Doc.Dr.ing. Leopoldem a kol. v časopise Nahrung 8 str. 37, 166 (1956). Kmen L2 patří totiž do skupiny kmenů, které jsou citlivé vůči některým v melasách přítomným inhibitorům klíčení spor a růstu hyf. Na nevhodném melasovém substrátu spory špatně klíčí, vytvořený mycel se smáčí a potopí se. Mycel intenzivně produkující kyselinu citronovou se tvoří jen tehdy, když jsou tyto inhibitory z melasy odstraněny, což lze např. docílit způsobem přípravy substrátu podle Doc.Dr.ing. Leopolda a kol. Kmen L2 během citronového kvašení tvoří cizí kyseliny (kyselina šťavelová, kyselina glukonová) jen ve stopových množstvích.

V následujících pokusech jsou demonstrovány výhody kmene L2, který se vyznačuje vysokými výtěžky u zkoušených melas, zatímco s kmenem L1 jsou získané výtěžky kyseliny citronové značně nižší (tabulka I). Substráty z uvedených melas pro oba kmeny byly připraveny způsobem podle PV Doc.Dr.ing. Leopolda a kol. o názvu "Způsob přípravy melasového substrátu pro citronové kvašení". Pokud byl substrát z uvedených melas připraven běžným způsobem, byly s kmenem L1 dosaženy výtěžky o 3 až 10 % nižší a s kmenem L2 byl takto připravený substrát prakticky nezkvasitelný.

Tabulka I: Výtěžky kyseliny citronové v procentech na nasazený cukr s kmeny L1 a L2 houby *Aspergillus niger* na různých melasách. Výška substrátu 9 cm, koncentrace cukru 15 %, doba kvašení 9 dní.

Melasa	Kmeny houby <i>Aspergillus niger</i>	
	L1	L2
I	77,4	90,4
II	75,3	88,7
III	72,2	83,9
IV	74,0	86,5

Další výhodou vynálezu, tj. kmene L2 je schopnost prokvasit melasový substrát s obsahem 15 % cukru ve větší výšce než obvyklých 9 cm, tj. na výšce do 15 cm (tabulka II).

Tabulka II: Výtěžky kyseliny citronové v % na nasazený cukr při různých výškách melasového substrátu za použití kmene L2.

Melasa	Výška vrstvy substrátu v cm		
	9	12	15
I	90,4	87,4	83,0
II	88,7	86,1	82,9
III	83,9	81,0	79,0
IV	86,5	84,0	81,5
Kvasná doba (dny)	9	10	11

K již uvedeným výhodám kmene L2 se řadí ještě jeho schopnost zkvasit melasový substrát o koncentraci cukru až 18 % (tabulka III).

Tabulka III. Výtěžky kyseliny citronové v % na nasazený cukr při různé koncentraci cukru melasového substrátu při výšce vrstvy 9 cm.

Melasa	Koncentrace cukru v %	
	15	18
I	90,4	80,2
II	88,7	77,6
III	83,9	78,0
IV	86,5	78,1
Kvasná doba (dny)	9	10

Výhody kmene L2, tj. schopnost zkvasit vyšší výšky substrátu popř. i vyšší koncentraci cukru než je obvyklé lze kombinovat. Pro nový produkční kmen L2 se osvědčila sporulační půda podle Leopolda a Ulče podle autorského osvědčení č. 196162. Na této sporulační půdě roste produkční kmen při teplotě 33 až 36 °C a tvoří za 7 až 9 dní hustý koberec středně velkých konidiálních hlaviček, z nichž se dají konidie snadno získat.

Konidiofory jsou v průměru 5 mm dlouhé, konidiální jsou středně velké, střípaté, černé. Konidie jsou kulové, hladké, většinou tmavodnědé, v průměru 3 až 4 μ m. Kulaté vesikle nesou řadu dalších ne vždy stejně dlouhých primárních sterigmat 20 až 25 μ m dlouhých, na kterých jsou kratší sekundární sterigmata asi 7 až 9 μ m dlouhé. Sekundární sterigmata nesou na svých koncích řetězce konidií. Konidie lze konzervovat například ve sterilním písku nebo karborafinu.

Nový produkční kmen byl získán kombinovaným působením nitrosometylmočoviny a UV světla tak, že se na suspenzi spor parentálního kmene L houby *Aspergillus niger* působilo nejprve 1 hodinu 0,05 % roztokem nitrosometylmočoviny a potom UV světlem v dávce 20 000 ergů/ mm^2 . Po působení mutagenních faktorů byly spory podrobeny tepelnému šoku při 50 °C po dobu 1 hodiny. Po jednotlivých stupních následovalo pasážování spojené se selekcemi.

206 888

Příklad 1

V tlakové nádobě vybavené míchadlem a přívodem tlakové páry se připraví za studena melasový roztok s koncentrací cukru 40 %, upraví se pH roztoku kyselinou sírovou na 6,8 a přidá se předem vyzkoušené množství hexakvanoželeznatanu draselného. Po uzavření nádoby se roztok zahřeje přímou parou na teplotu 115 °C, která se udržuje po dobu 30 minut. Potom se roztok přečerpá do beztlakové nádoby, zředí vodou na 30 % cukru a vaří při atmosférickém tlaku dalších 15 minut. Melasový roztok se zředí biologicky nezávadnou vodou na koncentraci 15 % cukru a přidá se 0,09 g kyseliny fosforečné na litr roztoku. Koncentrace volného iontu hexakvanoželeznatanu draselného se má pohybovat kolem 10 mg na 100 ml substrátu.

Je-li třeba, lze koncentraci upravit například podle autorského osvědčení č. 188969. Melasový substrát se převede do kvasných misek a zkvasí kmenem L1 houby *Aspergillus niger*. Výška substrátu je 9 cm, doba kvašení 9 dnů. Výtěžek kyseliny citronové počítáno na nasazený cukr je 87,8 %.

Příklad 2

Melasový substrát se připraví stejným způsobem jako u příkladu 1, naplní se do kvasných misek na výšku vrstvy substrátu 12 cm a zkvašuje se po dobu 10 dnů kmenem L2. Výtěžek kyseliny citronové na nasazený cukr je 84,0 %.

Příklad 3

Melasový substrát se připraví stejně jako u příkladu 1, ale roztok se zředí na 18 % cukru. Kvasný proces se vede na výšce substrátu 9 cm po dobu 10 dnů. Výtěžek kyseliny citronové na nasazený cukr je 80,0 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Průmyslový kmen houby *Aspergillus niger* van Tieghem CCM-F-663, produkující kyselinu citronovou.