



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

255250

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 7/48

(22) Přihlášeno 24 11 86

(21) PV 8542-86.A

(40) Zveřejněno 11 06 87

(45) Vydáno 15 11 88

(75)
Autor vynálezu

UJCOVÁ EMMA RNDr. CSc., PRAHA, BÁLINT ŠTEFAN ing. CSc., BRATISLAVA
SEICHERT LEOPOLD RNDr. CSc., PRAHA, KRČMAŘ STANISLAV ing. CSc.,
BRATISLAVA, MUSÍLKOVÁ MARIE RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob výroby kyseliny citrónové submersní fermentací

Řeší se způsob submersní výroby kyseliny citrónové fermentačním postupem. Předmětem řešení je způsob regulace O_2 v jednotlivých fázích fermentačního procesu. Množství přiváděného O_2 počáteční růstové fázi fermentačního procesu, tj. od 0 do 24 hod., je 10 až 30 mg O_2 l⁻¹. Snížením množství přiváděného O_2 v počáteční růstové fázi se stimuluje aktivita klíčového enzymu glykolysy fosfofruktokinázy, čímž dojde k nahromadění metabolitů potřebných v produkční fázi pro tvorbu kyseliny citrónové. Způsob fermentace umožňuje zvýšení výtěžnosti zejména u vysoko-produkčního kmene *Aspergillus niger* S 59 1 600 až na 95 % počítáno na nasezený cukr.

Vynález se týká způsobu výroby kyseliny citrónové submersní fermentací.

Výroba kyseliny citrónové submersním fermentačním postupem uskutečňovaná pomocí *Aspergillus niger* na cukerných substrátech z glukózy, sacharózy, hydrolyzátů škrobu, hydrolyzátů melasy, celulózy, řepné, resp. třtinové melasy se uskutečňuje ve sterilních fermentorech, ve kterých se vsádka promíchává mechanicky pomocí rotujících míchadel, nebo proudem dispergovaného vzduchu. Produkční mikroorganismus roste přitom ve formě vláknité suspenze, přičemž se uskutečňuje intenzivní látková výměna. Mycelium využívá z okolního prostředí, kyslík, živiny, uhlíkatý zdroj a vylučuje do něho produkty látkové výměny - kysličník uhličitý, další metabolity a teplo.

Je snaha optimalizovat tento proces ve směru maximálního hromadění kyseliny citrónové tak, aby v co nejkratším čase se z přítomného cukru přeměnilo maximální množství cukru na kyselinu citrónovou.

Je známo, že o úspěšném průběhu konverze cukrů na kyselinu citrónovou rozhoduje počáteční fáze procesu, ve kterém se formuje mycelium produkčního mikroorganismu vhodné morfologické struktury a vysoké biochemické aktivity. Pokud se nepodaří v úvodním stádiu připravit takovýto biologický materiál, ani optimální podmínky v dalších fázích procesu nemohou výrazně zlepšit průběh fermentačního procesu, nepodaří se dosáhnout vysokou produkci kyseliny citrónové. Dosavadní postupy se soustředily především na šlechtění a výběr vysoko-produkčních kmenů (čsl. AO 201 807, AO 217 928, AO 217 939), přípravu vegetativního inokula (čsl. AO 209 715), dodržení optimálních bioinženýrských parametrů, jako optimální obvodová rychlost míchadla (čsl. AO 191 098), optimální koncentrace rozpuštěného kyslíku (patent PLR č. 121 786), optimální rychlost laminárního proudění vzduchu, geometrické uspořádání míchacího systému atd.

Nevýhodou těchto postupů je, že nepokrývají všechny možnosti vypěstovat vysokoaktivní produkční biologický materiál.

Tyto nevýhody odstraňuje způsob podle vynálezu, jehož podstatou je, že množství přiváděného O_2 v počáteční růstové fázi fermentačního procesu, tj. od 0 do 24 hod je 10 až 30 mg O_2 l⁻¹ min⁻¹. Průběh fermentace se reguluje přítokem vzduchu kterým se fermentor během celého procesu provzdušňuje. Fermentační proces může přitom probíhat vsádkovým i přítokovým způsobem.

Produkční mikroorganismus *Aspergillus niger* rostoucí ve formě difúzního mycelia anebo ve formě vloček při dýchání spotřebovává nejen kyslík rozpuštěný v médiu, ale i kysličník přítomný přímo v bublinkách vzduchu tou částí hyfy, která není bezprostředně v daném okamžiku smáčená médiem. Dále se využívá vlastnosti produkční houby, regulovat aktivitu glykolytických enzymů během aerace kultury v produkčním médiu.

Regulační mechanismus, který závisí na koncentraci kyslíku, v aerovaném médiu u hub je nejvýraznější u kvasinek, kde byl poprvé pozorován Pasteurem a podle něho i nazván jako Pasteurův efekt. Mechanismus tohoto efektu se vysvětluje následovně:

a) V podmínkách anaerobiózy u hub jednotlivé biosyntetické dráhy jako glykolýza, resp. dýchací řetězec soutěží o substrát, kterým je adenosindifosfát (ADP) a anorg. fosfát (Pi). Při aerobním procesu je potřebné 20x více ADP a Pi než při anaerobním procesu. Proto aerobní proces potlačuje glykolýzu.

b) V podmínkách anaerobiózy, resp. aerobiózy působí allostericky na aktivitu fosfofruktokinázy (klíčový enzym glykolytické dráhy) adenosintrifosfát (ATP) a adenosinmonofosfát (AMP). Aktivita tohoto enzymu se v přítomnosti ATP snižuje, zatímco v přítomnosti AMP zvyšuje, takže výsledná katalytická aktivita závisí na poměru aktuální koncentrace ATP/AMP.

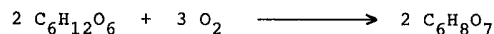
Tato závislost je za anaerobních podmínek malá, za aerobních podmínek naproti tomu velká. Za zvýšené anaerobiózy bude mít proto fosfofruktionáza vyšší aktivitu než za aerobiózy. mít proto fosfofruktiokináza vyšší aktivitu než za aerobiózy.

I když mikroskopická vláknitá houba *Aspergillus niger* je striktní aerob, tyto regulační mechanismy platí v určitém rozsahu i pro tyto buňky.

Je známo, že v procesu biosyntézy a hromadění kyseliny citrónové v médiu je bezpodmínečně nutné, aby enzymy glykolytického cyklu byly vysoko aktivní, protože právě tyto katalyzují přeměnu trojuhlíkatých sloučenin na pyruvát, resp. acetylkoenzym A, které jsou bezprostředními prekurzory syntézy kyseliny citrónové.

Výhodou postupu podle vynálezu je skutečnost, že omezením dýchání v mladém produkčním myceliu regulací přítoku vzduchu ve fermentoru v počátečních fázích procesu je možno stimulovat glykolýzu u existujících buněk a syntézu glykolytických enzymů u rostoucích buněk, čímž se vytvoří produkční médium *A. niger* o vysoké biochemické aktivitě pro produkci kyseliny citrónové.

Tuto skutečnost lze využít díky poznatku podle kterého *Aspergillus niger* během fermentace kyseliny citrónové spotřebovává kyslík nejen z média, ve kterém je rozpuštěný, ale i přímo z drobných bublinek vzduchu, které jsou v dobře dispergovaných systémech ve vysoké koncentraci. Tento poznatek se získal teoretickým výpočtem i z naměřených údajů. Oxidace glukózy na kyselinu citrónovou probíhá podle následující stechiometrie:



Podle této stechiometrie je pro vznik 1 kg kyseliny citrónové zapotřebí 0,5 kg O_2 .

Když nebereme v úvahu, že během fermentace se kyslík spotřebovává i na oxidaci glukózy, ze které vznikají jiné produkty (CO_2 , oxosloučeniny jako prekurzory biomasy) je potřebné dodat produkční kultuře během fermentace průměrně $15,6 \text{ mol O}_2 \text{ m}^{-3}\text{h}^{-1}$. Maximální hodnota v modelovém pokuse byla stanovena $46,2 \text{ mol O}_2 \text{ m}^{-3}\text{h}^{-1}$. Maximální hodnota přenosu O_2 do média se však zjistila jen $10 \text{ mol m}^{-3}\text{h}^{-1}$.

Z uvedených údajů vyplývá, že rozdíl mezi hodnotami 46,2 resp. 15,6 a hodnotou 10 představuje kyslík vyjádřený v $\text{mol m}^{-3}\text{h}^{-1}$ spotřebovaný hyfami produkčního mycelia přímo + bublinkami dispergovaného vzduchu.

Z uvedených příkladů je zřejmé, že kyslík, který využívá *A. niger* v průběhu fermentace kyseliny citrónové se dostává do buněk nejen z média, ve kterém je rozpuštěný, ale i přímo z plynné fáze difúzí přes tenký kapalný film ulpívající na buněčné stěně hyfy, která v daném okamžiku není smáčená médiem, ale vyčnívá do bubliny mikroskopických rozměrů.

Produkční mikroorganismus *Aspergillus niger* využívá nejen O_2 rozpuštěný v médiu, ale i přímo z plynné fáze z bublinek vzduchu, čímž lze omezit vzdušnění v růstové fázi fermentačního procesu na 10 až $30 \text{ mg O}_2/\text{l}^{-1}/\text{min}^{-1}$ a tak stimulovat aktivitu klíčového enzymu glykolýzy-fosfofruktokinázy, čímž dojde k nahromadění prekurzorů využívaných ve vlastní produkční fázi k tvorbě produktu - kyseliny citrónové.

Příklady výroby kyseliny citrónové podle vynálezu:

P ř í k l a d 1

K přípravě inokula v inokulačním tanku se používají spóry houby *A. niger* S 591 600 rostoucí na obilkách pšenice (čsl. AO 209 715). Promyté a považené obilky pšenice se rozpustí do 100 ml Erlenmayerových baněk po 15 ml, vysterilizují a očkují suspenzí spór

houby získané smytím vysporulované kultury na agarové médium sterilní destilovanou vodou. Po vysporulování *A. niger* na pšenici (10 dní) se tato kultura použije k naočkování 24 l média následujícího složení: 14% glukózy nebo sacharózy, 0,25% NH_4NO_3 , 0,025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% KH_2PO_4 , 0,1% rozp. škrobu, 0,0001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0002% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,00065% FeCl_3 . Otáčky míchadla 400 ot/min, množství vháněného vzduchu 6 l/min, teplota 28 až 30 °C, doba kultivace 40 až 48 hod. Vyrostlé médium je v lehce soudržných peletách a použije se v množství 2,5–5% k naočkování sterilního fermentačního média tohoto složení: 10% glukózy, 0,08% NH_4Cl , 0,1% močoviny, 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,016% KH_2PO_4 , 0,007% KCl , 0,002% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH média 3,5.

Vlastní fermentace probíhá ve 75 l nerezovém fermentoru s 50 l fermentačního média při 28 až 30 °C. Fermentor je opatřen mechanickým míchadlem (šlopatková turbína s dělicím kotoučem) a 4 zarážkami u stěn fermentoru. Otáčky míchadla 666 ot/min⁻¹. Vzdušnění 0 až 8 hod. 5 l/min tj. 30 mg O_2 /l⁻¹/min⁻¹, 8 až 16 hod. 4 l/min tj. 24 mg O_2 /l⁻¹/min⁻¹, 16 až 24 hod. 2 l/min tj. 12 mg O_2 /l⁻¹/min⁻¹, 24 až 30 hod. 8 l/min tj. 48 mg O_2 /l⁻¹/min⁻¹, 30 až 108 hod. 20 l/min/120 mg O_2 /l⁻¹ (min⁻¹). Výtěžek kyseliny citrónové 95,2% na předložený cukr.

Pro srovnání je uveden výtěžek kyseliny citrónové dosažený za stejných podmínek pouze s tím rozdílem, že vzdušnění po celou dobu fermentace bylo 10 l/min. tzn., že se dodává 60 mg O_2 /l/min po celou dobu fermentace. Výtěžek kyseliny citrónové v tomto případě se pohybuje mezi 75 až 80 g/l, tzn., že podle nového způsobu se dosáhne zvýšení o 15 až 20 %.

P ř í k l a d 2

Příprava inokula jako v příkladu 1.

Fermentační médium obsahuje místo 10% glukózy 15% sacharózy. Fermentace probíhá v 250 l nerezovém fermentoru s centrálním umístěným mechanickým míchadlem (šlopatková turbína s dělicím kotoučem). Fermentor obsahuje 152 l ferment. média. Obrátky míchadla během fermentace 400 ot/min⁻¹. Vzdušnění se zvyšuje od 6 l/min tj. 12 mg O_2 /l⁻¹/min⁻¹/prvních 8 hod. 30 hod. a až do 50 l/min/99 mg O_2 /l⁻¹/min⁻¹/od 30. hod. do konce fermentace. Výtěžek kyseliny citrónové ve 120 hod. byl 135 g kyseliny citrónové na liter média, tj. 90% na předložený cukr.

P ř í k l a d 3

Příprava inokula jako v příkladu 1.

Fermentační médium obsahuje řepnou melasu naředěnou na 15% obsah cukru. Celkové množství melasy se rozdělí na 4 díly, podobně jako dávka hexakvanoželeznatanu draselného. Do 250 l fermentoru se napustí 80 l podkladové vody, která se ohřeje na 95 °C a přidá se první díl melasy a první díl hexakvanoželeznatanu a opět se zahřeje na 95 °C. pH se upraví pomocí H_2SO_4 na 5,2 a nechá se výdrž 10 min. Poté se přidá druhý díl melasy a hexakvanoželeznatanu, zahřeje na 95 °C s 10 minutovou výdrží. Stejně probíhá přidání 3. a 4. dílu. Po přidání posledního dílu s 10 min. výdrží se přidá 0,06 % kyseliny fosforečné a médium se doplní na žádaný objem, v našem případě na 152,1. Po 10 min. míchání se pH upraví na 6,65 a hladina volného hexakvanoželeznatanu draselného se upraví tak, aby nebyla nižší než 200 µg/ml. Fermentace probíhá při 30 °C. Obrátky míchadla během fermentace 400 ot/min⁻¹, vzdušnění se zvyšuje od 6 l/min tj. 12 mg O_2 /l⁻¹/min⁻¹/prvních 8 hod. až 30 hod. a až do 50 l/min tj. 99 mg O_2 /l⁻¹/min⁻¹/ od 30 hod. do konce fermentace.

Výtěžek kyseliny citrónové ve 120 hod. byl 120 g kyseliny citrónové na liter média, tj. 80% na předložený cukr v melase.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby kyseliny citronové submersní fermentací houbou *Aspergillus niger* vyznačený tím, že množství přiváděného O_2 v počáteční růstové fázi fermentačního procesu, tj. od 0 do 24 h. je 10 až 30 mg O_2 l⁻¹ min⁻¹.