



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

196162

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 24 11 77
/21/ /PV 7759-77/

(40) Zveřejněno 29 06 79

(45) Vydáno 15 06 82

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/16

(75)

Autor vynálezu

LEOPOLD JINDŘICH doc. dr. ing., PLZEŇ a ULČ JAROSLAV ing., ČERNICE

(54) Pevná kultivační půda indukující intenzivní produkci konidií u hub druhu *Aspergillus niger*

1

Vynález se týká intenzivní produkce konidií u takových kmenů houby druhu *Aspergillus niger*, které na doposud známých pevných sporulačních půdách tvoří spory jen obtížně nebo spory se z těchto půd nedají získat nebo pouze s obtížemi, použitím minerální sporulační půdy obsahující vedle sladu jako zdroj uhlíku a energie glycerol nebo glycerol a kyselinu citrónovou.

Houby tvořící mycelium, ke kterým patří houba druhu *Aspergillus niger*, lze kultivovat v laboratoři po naočkování fruktifikačních orgánů /konidií/ nebo vegetativních částí houby /myceliálních fragmentů/ v poměrně malém množství do kultivačního média. Používá-li se však houba za účelem produkce nějakého metabolitu, jako kyseliny citrónové, kyseliny glukonové a podobně, v provozním měřítku, lze použít jako inokulační materiál pouze konidie produkční houby, které musí být k dispozici při každém startu kvasného cyklu v dostatečném množství. Za určitých podmínek vyrůstají z tak zvaných patních buněk mycelia jako asexuální fruktifikační orgány konidiofory se sterigmaty, na jejichž koncích se vytváří řetězce konidií.

Aby se konidie daly získat škrabáním nebo odsáváním, jsou dotyčné kultury kultivovány na pevných, tzn. agarových půdách, Předpokladem poměrně rychlé, především však intenzivní produkce konidií je určité složení kultivační /sporulační/ půdy, které bývá někdy specifické pro jednotlivé kmeny *Aspergillus niger*. Pro průmyslové kmeny druhu *Aspergillus niger* a jiných byla vypracována řada předpisů pro složení spo-

2

rulačních půd, které byly z části uveřejněny v literatuře /na příklad C.Booth, Methods in microbiology, Vol.4, Acad.Press, London-New York 1971; W.F.Harrigan, M.F. Mc Cance, Laboratory methods in microbiology, Acad.Press London-New York 1966; G.Smith, An introduction to industrial mycology.6. Ed.Arnold Ltd. London 1969/. Obvykle jsou používána nutričně chudá média, která prý lépe podporují sporulaci než bohatá média. Několik speciálních sporulačních médií pro *Aspergillus* doporučili Moyer, Wells, Stubbs, Herrick a Mey /cit.dle Thom C.M. a K.B. Raper, A. manual of the *Aspergilli*. The Williams-Wilkins Comp., Baltimore 1945/. Jsou to obvykle materiální média obsahující draslík /někdy i sodík/, hořčík, fosfát, dusík /obvykle ve formě dusičnanu amonného/ a glukosu s přísadou sladu nebo autolysátu kvasinek; jiná sporulační média obsahují místo glukosu sacharosu a dusík ve formě peptonu. Většina kmenů houby *Aspergillus niger* na těchto médiích vytváří velmi husté a stejnoměrně sporulující kultury, jejichž značné množství konidií se dá snadno získat škrabáním nebo odsáním.

Vyskytují se však kmeny houby *Aspergillus niger*, které za zmíněných osvědčených sporulačních agarových půdách sporulují neuspokojivě; sporulace je řídká, nestejnoměrná, hlavičky jsou malé a konidie se nedají získat nebo jen s obtížemi, jelikož se kultura při doteku škrabadla nebo trubice vysavače rozmaže. Jindy zase je myceliální vrstva, nesoucí konidiofory, krabátá, takže nelze konidie získat škrabáním, neboť mycel se trhá od agaru. Tako-

vý nedostatek je velmi závažný, neboť pro nedostačující množství inokulačního materiálu nelze dotyčnou kulturu aplikovat v provozu, i když má sebestopší produkční schopnosti.

Výše uvedené nedostatky běžných pevných sporulačních půd, projevující se při pěstování některých kmenů houby *Aspergillus niger*, jsou odstraněny u agarových sporulačních půd podle vynálezu, jejichž podstatou je obsah /vedle sladu/ glycerolu, někdy též kyseliny citrónové jako zdroje uhlíku a energie. Byly zkoušeny alkoholy s jednou /methanol, ethanol/ a s dvěma /ethylenglykol/ OH-skupinami, které neměly na sporulaci houby efekt; teprve glycerol, dále sorbitol a mannitol byly účinné. Z organických kyselin působily příznivě na sporulaci kyseliny s dvěma karboxylovými skupinami /kyselina malonová, jantarová, glutarová/ a s třemi karboxylovými a hydroxyskupinami /kyseliny mléčná, jablečná/ a s třemi karboxylovými skupinami a jednou hydroxyskupinou /kyselina citrónová/. Na půdách, které obsahují jednu nebo dvě z těchto sloučenin, vyrůstají nezkrabatělé, s agarem pevně spojené mycely s nesčíslnými konidiofory s černými hlavičkami, které se dají bez obtíží seškrabat.

Jako příklady jsou uvedeny následující půdy /chemikálie jsou čisté pro analýzy, sladový výtažek je uschován v lednici, jinak začne brzo kvasit a je neupotřebitelný/:

Glycerol /100%/	105 g /resp. to-muto množství odpovídající množství méně koncentrovaného glycerolu/
sladový extrakt /80%/	45 g
NH ₄ NO ₃	0,45 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,06 g
NaCl	15 g
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,0015 g
agar	30 g

Doplnit destilovanou vodou na 1 l.

U některých kmenů houby *A. niger* lze vynechat přísadu síranu měďnatého.

Jsou kmeny houby *A. niger*, u kterých s výhodou doplníme uvedenou půdu se 4 % kyseliny citrónové, zčásti neutralizované s KOH tak, aby pH půdy bylo 4,8 až 5,0; zaručíme tím, že půda po vychladnutí ztuhne.

Konidie získané z agarových půd podle vynálezu, lze použít pro hlubinné kvašení jako takové nebo pro povrchovou fermentaci ve směsi se sterilním aktivním uhlím nebo se sterilním uhlíčitanem vápenatým nebo s oběma. Konidie vyklíčí v obou případech normálně a výtěžky kyseliny citrónové zůstávají kultivací konidií na agarových půdách podle vynálezu nedotčeny. Z konzervy dotyčného produkčního kmene *Aspergillus niger* přeneseme malé množství konidií do vhodné tekuté sporulační půdy a teprve

zde vytvořené konidie slouží k očkování agarových sporulačních půd podle vynálezu. Tímto postupem se značně prodlouží životnost konzervy kmene houby *Aspergillus niger*.

Agarová sporulační půda podle vynálezu byla zkoušena na řadě různých kmenů houby *Aspergillus niger* a osvědčila se na 60 % z nich.

Dále jsou uvedeny příklady sporulačních agarových půd podle vynálezu. Byl zkoušen morfologický vzhled kultur, snadnost snímání konidií z kultur a jejich biochemická aktivita kvasnými pokusy na produkci kyseliny citrónové naočkováním na kvasný melasový substrát a stanovením kyseliny citrónové po ukončení kvasného pokusu.

P ř í k l a d 1

Rozpustíme v destilované vodě množství glycerolu odpovídající 105 g 100% glycerolu, dále 45 g sladového výtažku /s 80 % sušiny/, 0,45 g dusičnanu amonného, 0,06 g síranu hořečnatého /se 7 H₂O/, 15 g chloridu sodného, 0,0015 g síranu měďnatého /s 5 H₂O/, 30 g agar a doplníme do 1 l vodou. Roztok se povaří ve smaltované nádobě, až je agar rozvařen, odpařená voda se doplní a agarový roztok se naleje na příklad po 100 ml do 300 ml Erlenmeyerových baněk, které se po uzavření vatovými zátkami 1/2 hodiny sterilizují při přetlaku 0,5 atmosféry, nebo do misek, přičemž nemá být výška agarové půdy nižší 2 mm. Po vychladnutí se ztuhlá agarová půda naočkuje v Hansenově skřínce konidiami houby *Aspergillus niger* a inkubují se 8 až 10 dnů při 32 °C. Na povrchu tenkého bílého mycelia se tvoří hustý porost vysokých konidioforů, nesoucích hustý koberec černých hlaviček s nesčíslnými konidiami, které se dají snadno seškrabat nebo odsát. Po jejich naočkování na kvasné melasové roztoky vyrostla normální, vrásněná a bílá mycelia a po týdenním kvašení byl výtěžek kyseliny citrónové v průměru 77,5 %, vztažen na nasazený cukr.

P ř í k l a d 2

Byla připravena agarová sporulační půda jako u příkladu 1, která však byla doplněna 40 g kyseliny citrónové a takovým množstvím hydroxidu draselného, aby pH půdy bylo asi 5. Jinak bylo postupováno stejně jako u příkladu 1. Při sterilizaci je třeba dbát na to, aby banky s agarovou půdou byly co nejdříve po ukončení sterilizace vyjmuty z autoklávu; jinak hrozí nebezpečí, že agarová půda změkne. Vzhled kultur houby *A. niger* byl, po naočkování a inkubaci při 32 °C, stejný jako u příkladu 1. Konidie se daly snadno seškrabat. Při kvasných pokusech byl průměrný výtěžek kyseliny citrónové 78,1 %, počítáno na nasazený cukr.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Pevná kultivační půda indukující intenzivní produkci konidií u hub druhu *Aspergillus niger*, obsahující jako uhlíkatý zdroj sladový výtažek, vyznačená tím, že jako další zdroj uhlíku obsahuje 8 až 12 % hmotnostních vícemocného alkoholu v rozmezí 3 až 6 C atomů a/nebo 1 až 5 % hmotnostních vícemocné kyseliny nebo hydroxykyseliny v rozmezí 3 až 7 C atomů.

2. Pevná kultivační půda podle bodu 1, vyznačená tím, že jako vícemocné alkoholy lze použít glycerol, sorbitol, mannitol.

3. Pevná kultivační půda podle bodu 1, vyznačená tím, že jako organických vícemocných kyselin nebo hydroxykyselin lze použít kyseliny malonové, jantarové, glutarové, mléčné nebo citrónové.