



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

200 018
(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 26 05 78
(21) PV 3414-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/38

(40) Zverejnené 30 11 79
(45) Vydané 01 02 83

(75)
Autor vynálezu

VAROŠEK ŠTEFAN ing., PIEŠŤANY, GUĽOVÁ EVA ing., HLOHOVEC,
SUCHOŇOVÁ ELENA, HLOHOVEC, FILIPOVÁ BRIGITA, HLOHOVEC

(54) Spôsob zvýšenia aktivity produkčného kmeňa *Aspergillus niger* u technickej fermentácie kyseliny citrónovej

1

Predmetom vynálezu je zvýšenie aktivity produkčného kmeňa *Aspergillus niger* u technickej fermentácie kyseliny citrónovej, pri získaní jeho nových vlastností v opakovanom styku s kultivačným médiom, ktoré obsahuje účinnú látku.

Samozrejým predpokladom priemyslového citrónového kvasenia je aktívny kmeň, zaručujúci vysokú výťažnosť v priemyselnom merítku na nasadený cukor. Je všeobecne známe, že premena cukru na organickú kyselinu, v tomto prípade na kyselinu citrónovú, sa deje intracelulárnymi enzýmami, t.j. vo vnútri buniek, ktoré vytvárajú myceliovú vrstvu. Cukor vniká pod osmotickým tlakom do buniek a kyselina difunduje do roztoku. Od enzymatickej aktivity takto vytvoreného mycélia, závisí priebeh, doba a výsledok fermentácie.

Existuje niekoľko spôsobov ako zvýšiť aktivitu produkčného kmeňa, či už je to pôsobenie UV svetla, alebo tzv. mutagenných látok, pričom dochádza k morfológickým zmenám u použitého produkčného kmeňa. Ďalším spôsobom získavania aktívnejšej formy mikroorganizmu sa považujú zásahy, ktoré vedú k premene v metabolizme v smere zvýšenej látkovej výmeny, na základe stále opakovaného kontaktu produkčného kmeňa s kultivačným médiom. Ako pri tomto spôsobe, aj pri predošlých, základnou podmienkou zostáva, aby produkčný kmeň okrem vysokej výťažnosti mal nasledujúce vlastnosti:

- kultivácia musí byť jednoduchá, so zabezpečením dostatočného množstva spór kmeňa *Aspergillus niger* pre prevádzku,
- nesmie podliehať fyziologickej degenerácii a musí vykazovať určitú odolnosť voči

200 018

menším zmenám prostredia,

- mať schopnosť rýchlo porastať na organických substrátoch s odolnosťou voči kontaminujúcim mikroorganizmom. Táto podmienka je z priemyslového hľadiska dôležitá, no rýchla tvorba myceliárnej blany na povrchu substrátu a použitie chemických sterilizačných látok, zabezpečujú dnes minimálny výskyt zvlášť bakteriálnej kontaminácie pri fermentácii kyseliny citrónovej,

- nevytvárať vo zvýšenej miere vedľajšie kyseliny, zvlášť kyselinu oxalovú, ktorej oddeľovanie z vykvaseného média spôsobuje značné problémy a zvýšené náklady na výrobu.

Na základe hore uvedeného sa za účelom zvýšenia aktivity kmeňa huby *Aspergillus niger* aplikoval systém ovplyvnenia pôvodného prevádzkového kmeňa zmenou jeho kultivačných podmienok a to od konzervy cez tekutú pôdu až po sporulačnú pôdu, stále opakovaným pôsobením pri jeho príprave účinnou látkou a to peroxidom vodíka.

Prídavok peroxidu vodíka k tekutej a pevnej sporulačnej pôde má za následok, že dochádza k zmene morfológického znaku u produkčného kmeňa *Aspergillus niger* a to v tom, že oproti pôvodnej sporulačnej pôde je jej zafarbenie prerastaním submycélia žlté a nie biele. No hlavným znakom je dosiahnutia mohutnejšej tvorby spór, rýchla klíčivosť na prevádzkovom médiu a predpokladaná zvýšená aktivita vo vzťahu k biosyntéze kyseliny citrónovej, bez zmeny farby konídií, ktoré zostávajú čierne.

Vzhľadom k tomu, že výsledky biosyntézy kyseliny citrónovej sú závislé od použitého média a od obsahu stimulačných a inhibičných látok v tomto médiu, ďalej od použitého produkčného kmeňa, boli pre stanovenie rozdielu porovnané spóry získané z kultivácie kmeňa *Aspergillus niger* na pôvodnej kultivačnej pôde a pôde s účinnou látkou v rôznych kombináciách cez kvasné pokusy.

V tabuľke č. 1 sú uvedené výsledky vplyvu zmeny v zložení tekutej a sporulačnej pevnej pôdy, na aktivitu kmeňa *Aspergillus niger*, pri fermentácii na melasovom substráte v Erlemeyerových baňkách pri sledovaní rôznych kombinácií s prídavkom účinnej látky a takto získaných spór, s ktorými sa previedlo očkovanie, oproti pôvodným.

Tabuľka č. 1:

Pevná sporulačná pôda	pôvodná tekutá pôda bez H_2O_2 výťažok v %	nová tekutá pôda s H_2O_2 výťažok v %
č. 1 Pôvodná pôda	66,1	72,2
č. 2 Pôda s obsahom H_2O_2	69,8	97,0
č. 3 Pôda s obsahom glycerín + H_2O_2	70,2	99,2
č. 4 Pôda s obsahom glycerín	71,8	87,5

Výsledky charakterizujú produkčnú aktivitu medzi kmeňom *Aspergillus niger*, kultivovaným na rôznych pôdach, pričom vplyv účinnej látky je zrejmý už pri pokuse č. 1, keď bol pridaný len do tekutej pôdy a vzrast výťažnosti u spór získaných z pôvodnej sporulačnej pôdy a pôdy opracovanej účinnou látkou, je daný rozdielom vo výťažnosti od 6 až 17 %, čo

je dostatočne štatisticky významný rozdiel pri 4 paralelkách u každého pokusu. Súčasne sa dosiahlo o 30 až 40 % väčšie množstvo spór z 1 Erlenmeyerovej banky, čo je v gramoch 0,6 až 0,8, oproti 0,3 až 0,5 g na pôvodnej pôde.

V ďalšom pokuse sa sledovalo optimálne zloženie sporulačnej pôdy s prídavkom účinnej látky pred a po sterilizácii sporulačnej pôdy, očkovanej spórami z tekutej pôdy, s prídavkom účinnej látky. Získané spóry kmeňa *Aspergillus niger* boli testované na melasovom substráte v Erlenmeyerových bankách, výsledky sú v nasledujúcej tabuľke:

Tabuľka č. 2:

č. pokusu	prídavok H_2O_2 ml/l	prídavok glycerín + H_2O_2 ml/l	výťažok %
1	+ 0,1		82,4
2	+ 0,3		97,1
3	+ 0,5		99,4
4	+ 0,5		101,6
5	+ 0,6		83,8
6		- 0,1	87,5
7		- 0,2	90,1
8		- 0,3	98,8
9		- 0,4	92,0

Poznámka: + H_2O_2 (pridané po sterilizácii sporulačnej pôdy)

- H_2O_2 (pridané pred sterilizáciou sporulačnej pôdy)

Ako z výsledkov vidno, najväčší vplyv na aktivnosť spór produkčného kmeňa *Aspergillus niger* mal prídavok samotného peroxidu vodíka, ktorý sa pridával po sterilizácii do sporulačnej pôdy. Avšak praktické prevedenie si vyžaduje zvláštne opatrenia pre zabezpečenie sterility, čo pri príprave veľkého množstva spór pre prevádzkové účely je obtiažne. Prídavok peroxidu vodíka pred sterilizáciou, vzhľadom k vysokým sterilizačným teplotám pri príprave sporulačnej pôdy, si vyžiadal použiť vhodný prídavok negatívneho katalyzátora, ako sú (kys. fosforečná, kys. sírová, glycerín) a iné. Použitím kombinácie glycerín + peroxid vodíka, s vylúčením glukózy, sa dosiahli výsledky adekvátne prídavkom peroxidu vodíka po sterilizácii (viď tabuľka č. 2, pokus 6 až 9) to znamená, že 1. spôsob sa dá použiť pre overovanie vplyvu účinnej látky na kmeň *Aspergillus niger* a 2. pre bežnú prípravu spór pre prevádzku.

Poznámka: V ďalšom popise je označenie (P) pre spóry získané kultiváciou na pôvodnej pôde, označenie (N) pre spóry získané kultiváciou na pôde s účinnou látkou.

Za účelom ďalšieho sledovania aktivity takto získaného spórového materiálu, previe-

200 018

dol sa laboratórny pokus za použitia melás z 2 cukrovarníckych kampaní a to melasy č. 1 z roku 1976, č. 2 z roku 1977 za použitia spór *Aspergillus niger* (P, N). Laboratórny pokus sa viedol vo fermentačných nádobách (obsah 2000 ml, výška 9 cm), výsledky sú v tabuľke č. 3.

Tabuľka č. 3:

Melasa	očkované spórmi P výťažok v %	očkované spórmi N výťažok v %
1	65,8	75,6
2	71,1	84,2

Aj v tomto pokuse produkcia kyseliny citrónovej je u spór N vyššia o 10 až 13 % výťažnosti, rýchlejšia tvorba myceliárnej blany o 4 až 5 hodín, tj. z 22 hod. u spór P na 17 až 18 hod. u N.

Niekoľko v mnohých prípadoch aktívne kmene, ktoré dávajú vysoké výťažky v laboratórnych podmienkach nedávajú rovnaké výsledky v prevádzke, je potrebné zabezpečiť sledovanie aktivity spór kmeňa *Aspergillus niger* cez prevádzkové pokusy, kde je možné súčasne od sledovať odolnosť voči kontaminujúcim mikroorganizmom, rýchlosť klíčenia, biosyntézy kyseliny citrónovej, štruktúra mycélia a jeho odolnosť voči parazitickej plesni (*Penicília*) a porovnať s pôvodným kmeňom, výsledky sú v nasledujúcej tabuľke:

Tabuľka č. 4:

Spóry kmeňa <i>Asperg. niger</i> - očkované	výťažok titr. na nas. cukor v %	výťažok bez cudzích kys. v %	počet pokusov
P	58,56	58,37	200
N	67,82	67,09	296

Zhodnotenie prevádzkových výsledkov:

- výskyt bakteriálnych misiek prakticky bezvýznamný,
- výťažnosť u spór N je o cca 10 % vyššia,
- tvorba vedľajších kyselín za použitia spór P i N do 1 %, bez výskytu kyseliny oxalovej,
- rýchlosť klíčenia a tvorba myceliárnej blany posunutá v smere spór N a to z 22 hodín u P na 18 hod. u N,
- morfológické zdravé mycélia s pevnejšou štruktúrou u N, dávajú predpoklad vyššej odolnosti voči penicíliam.

Spóry získané kultiváciou, za súčasného pôsobenia účinnej látky u kmeňa *Aspergillus niger*, sú dostatočne aktívne s dosahovaním vysokých výťažností, nepodliehajú fyziologic-

kej degenerácii.

Spôsob prevedenia pokusov:

Pokus č. 1 a 2

Repná melasa sa zriedi vodou tak, aby koncentrácia polarizačného cukru bola 13 až 14 %. Za studena sa roztok upraví prísadami ferrokyanidu draselného a kys. fosforečnej. Kys. sírovou sa upraví pH. Takto upravený roztok sa rozleje po 100 ml do Erlenmeyerových baniek (obsah 300 ml), po uzatvorení prebieha sterilizácia v autokláve pri 100 kPa 30 min. Po ochladení sa sterilný substrát očkuje spórami produkčného kmeňa *Aspergillus niger*.

Pokus č. 3

Repná melasa sa zriedi vodou tak, aby koncentrácia polarizačného cukru bola po nariadení 13 až 14 %. Po zohriatí na teplotu nad 85 °C sa tento roztok upraví bežným spôsobom, prídavkami ferrokyanidu, kys. fosforečnej a kys. sírovej. Potom prebieha sterilizácia 10 min. pri 100 °C. Po ochladení sa substrát rozdelí do fermentačných nádob po 2000 ml a naočkuje spórami produkčného kmeňa *Aspergillus niger* P a N. Po 9. dňoch sa fermentácia ukončila a stanovil sa jej výťažok, bežným spôsobom v 3 paralelkách.

Pokus č. 4

Melasový roztok pripravený ako v pokuse 3, v 2 varákoch o objeme a 18 000 litrov. U každého pokusu sa substrát ešte opracoval antibakteriálnou látkou. Pri teplote 45 °C je náplň 1 kvasnej komory očkovaná spórami, po 9. dňoch sa stanovil výsledok fermentácie.

P R E D M E T V Y N Á J E Z U

Spôsob zvýšenia aktivity produkčného kmeňa *Aspergillus niger* u technickej fermentácie kyseliny citrónovej vyznačený tým, že sa produkčný kmeň opakovane kontaktuje s kultivačným médiom, obsahujúcim 0,1 až 0,5 ml/l peroxidu vodíka za súčasnej aplikácie katalyzátorov typu glycerín a kyseliny fosforečnej, brzdících rozklad peroxidu vodíka pri sterilizácii.