



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

196 001

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno

13 06 77

(21)

(PV 3875 - 77)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno

29 06 79

(45) Vydáno

01 3 82

(75)
Autor vynálezu

MUSÍLKOVÁ MARIE RNDr.PhMr.,CSc.,
UJCOVÁ EMMA RNDr.CSc.,
SEICHERT LEOPOLD RNDr.CSc. a
FENCL ZDENĚK RNDr.DrSc.,

PRAHA

(54)

Produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger*

1

Vynález se týká nového produkčního kmene pro submersní výrobu kyseliny citrónové.

Citrónová kyselina se vyrábí průmyslově pomocí mikroorganismů již více než 50 let. Spektrum jejího použití je velmi široké, a to od farmaceutického průmyslu až po lehký a chemický průmysl. V poslední době se její uplatnění dále rozšiřuje, neboť se stává základní surovinou pro výrobu biologicky degradovatelných detergentů.

Zatímco pro její aplikaci v chemickém a lehkém průmyslu je zde možnost její výroby pomocí kvasinek z n-alkánů (Ajinomoto Co. Japan: A fermentation process for the production of citric acid. Angl. pat. 1,204.635, 1970). Pro potravinářské a farmaceutické účely je nutné, aby výchozí surovinou byl potravinářsky nezávadný produkt jako je např. sacharosa. V tomto případě se konverse sacharosy na citrónovou kyselinu provádí pomocí plísní, převážně kmenů *Aspergillus niger* (Jungbunzlauer Spiritus Chem. Fabrik AG: Preparation of citric acid. OE 293 313, pat. 1971, OE 296 194, pat. 1972). Klasický fermentační postup je povrchová fermentace melasových nebo cukerných médií. Tento postup je náročný na čas, fermentační prostor i pracovní síly, a proto se v současné době prosazuje ekonomičtější submersní způsob výroby.

Submersní způsob výroby se vyznačuje zejména možnostmi mechanizace, automatizace, vyšší produktivitou práce a možnostmi standardizace podmínky výroby, čehož nelze dosáhnout

198 001

při povrchovém způsobu. Pro submeršní výrobní postup dosud nejsou k dispozici vhodné vysoko produkční kmeny plísní.

Předmětem vynálezu je nový produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* mutanta 97 A pro submeršní výrobu kyseliny citrónové, uložený v mezinárodní sbírce mikroorganismů pod č. CCF 1957.

Morfologická a fyziologická charakteristika produkčního kmene mikroorganismu *Aspergillus niger* mutanta 97 A (Thom. CH. Raper, K. B.: A manual of the Aspergilli, Baltimore, 1945):

Dobře roste a rychle sporuluje (za 4 dny) na sladidinovém agaru. Barva spor je černá s nádechem do hněda. Na sporulačním agaru s pivem vytváří za 4 dny kolonie 4 cm v průměru, sporulace je hustá, černá po celé ploše kolení, spodní strana je nezvrásněná, střed mírně nažloutlý. Na Raulinově agaru (viz citace) dosahují kolonie 1,5 - 2 cm v průměru, středy skořicově sporulují, kolonie jsou na spodní i vrchní straně radiálně zvrásněny.

Na Czapekově agaru (viz citace) se tvoří kolonie o průměru 3 - 4 cm, sporulace je řídká, spory jsou zbarveny skořicově, kolonie jsou výrazně zvrásněny nejprve od středu kruhovitě a pak radiálně. Spodní strana je žlutá.

Mikroskopický vzhled: spory jsou tmavě hnědé, chlupaté, 4 - 5 μ v průměru, konidiofory 0,6 - 0,8 mm vysoké, hlavičky o průměru 0,1 mm výrazně kulaté. Životnost spor je dlouhodobá při skladování v karborafinu nebo v lyofilisovaném stavu i několik let.

Během submersní kultivace na syntetické půdě s 10-20 % sacharosy přeměňuje mutanta 97 A 55-65 % sacharosy na kyselinu citrónovou. Mutanta je citlivá na nedostatek stopových prvků, zvláště Fe, v médiu, při jejich nedostatku se produkce kyseliny citrónové značně snižuje.

Kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* mutanta 97 A byl získán tak, že se na suspenzi protoplastů výchozího kmene *Aspergillus niger* K 10 působilo UV světlem. Kultivace hyf, ze kterých byly protoplasty uvolňovány, a vlastní příprava protoplastů byly prováděny postupem uvedeným v práci M. Musílková, Z. Fencel (Folia Microbiologica 13 : 235 - 239, 1968).

Působení UV světlem bylo provedeno tak, že suspence protoplastů (10 ml v Petriho misce o průměru 10 cm) o koncentraci přibližně 10^6 /ml byla ozařována germicivní 30 W UV lampou (zn. Phillips) ze vzdálenosti 25 cm za pomalého míchání po dobu 3 minut při pokojové teplotě (intenzita záření : 3,95 J/m²/s).

Poté byla suspence rozlita na sladidinový agar v Petriho miskách a ponechána vysporulovat při teplotě 30 °C v termostatu. Z vysporulované kultury byla připravena suspence spor, která byla naředěna tak, aby po dalším rozlití na sladidinový agar vyrostly jednotlivé izolované kolonie. Tyto kolonie byly hodnoceny fermentačním testem z hlediska produkce kyseliny citrónové na rotační třepačce a vybrány nejlepší z nich.

Hlavní výhodou nové mutanty připravené z protoplastů je zvýšená schopnost produkovat citrónovou kyselinu za submersních podmínek kultivace, kdy médium obsahuje 10-20 % cukerného substrátu, přičemž až 65-75 % dodaného cukru je konvertováno na citrónovou kyselinu během 5-7 dní fermentace.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* mutanta 97 A CCF 1597 pro submersní výrobu kyseliny citrónové.
