



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 709

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 30 12 77
(21) PV 9116-77

(51) Int. Cl. C 12 P 7/48

(40) Zveřejněno 30 05 80
(45) Vydáno 01 01 84

(75)

Autor vynálezu SEICHERT LEOPOLD RNDr. CSc., PRAHA
MUSÍLKOVÁ MARIE RNDr. CSc., PRAHA
FENCL ZDENĚK RNDr. DrSc., PRAHA
UJCOVÁ EMMA RNDr. CSc., PRAHA

(54)

Způsob výroby kyseliny citronové submersním fermentačním způsobem
zkvašováním cukerných roztoků plísní *Aspergillus niger*

1

Vynález se týká způsobu výroby kyseliny citronové submersním fermentačním způsobem
zkvašováním cukerných roztoků plísní *Aspergillus niger*.

Pro submersní způsob výroby kyseliny citronové nelze použít produkční kmeny *Aspergillus niger* vhodné při výrobě způsobem povrchovým a je nutno vyšlechtit a aplikovat kmeny nové - nově vyšlechtěné mutanty plísně *Aspergillus niger*. Nevyřešenou otázkou ovšem stále zůstává přísna specifická v citlivosti jednotlivých mutant k základním podmínkám fermentace, bez jejichž znalostí nelze pak dosáhnout ekonomické výroby.

Tato skutečnost vylučuje aplikovat stejnou technologii při použití různých produkčních kmenů. Tak např. autoři S. M. Martin a W. K. Warers (Ing.Eng.Chem. 44, 2229/1952), D. S. Clark (Can. J. Microbiol. 8, 133/1962) nebo patent USA č. 3, 105015 používají plísně rostoucí ve formě pelet. V poslední době si stále více autorů všímá vztahu mezi morfologií plísně *A. niger* a produkcí kyseliny citronové. A. Cimerman a sp. (Abst.V.Int. Ferm.Sym., Berlin 1976, 405) se snaží o snížení velikosti pelet přidáním různých přírodních polymerů a tím o zvýšení tvorby citronové kyseliny. V další práci (4th FEMS Symposium, Vienna, 1977) pak sleduje morfologii plísně až do konečné tvorby pelet, tj. do 74 h, a bere ji jako indikátor produkce citronové kyseliny.

Nevýhody růstu v peletách spočívají v tom, že proces je náročnější na čas (o 2 až 3

202 709

dny), je dosahována nižší výtěžnost (o 20 až 30 %), je vysoká spotřeba O_2 (poměr kapaliny ku O_2 je cca 2:1).

Tyto nevýhody odstraňuje způsob výroby kyseliny citronové podle vynálezu, jehož podstatou je, že se kultivuje mutanta plísně *Aspergillus niger* S 59 uložená ve sbírce mikroorganismů CCF č. 1600, jejíž inokulum se nechá růst ve formě pelet a poté se přenes do vlastního fermentačního tanku, kde se nechá růst difusně po celou dobu fermentace při počátečním pH=5 a při teplotě 28 až 32 °C na kultivační půdě, která obsahuje cukrový substrát s výhodou sacharosou v koncentraci 10 % až 20 % váhových.

Protože při difusním způsobu fermentace dochází k bezprostřednímu styku média se všemi vlákny produkční plísně je fermentační proces podstatně urychlen, je dosahováno vyšší výtěžnosti a je snížena spotřeba substrátu pro vlastní růst produkčního mikroorganismu. Proces nevyžaduje vysokou aeraci (poměr kyseliny ku O_2 je cca 5:1) a tím dochází ke značnému snížení vlastních nákladů na energii a výrobu.

Difusní způsob fermentace je umožněn vlastnostmi nového vysokoprodukčního mikroorganismu kmene *Aspergillus niger*, mutanta S 59. Další velkou výhodou uvedeného kmene je, že během procesu se vytváří minimální množství vedlejších kyselin (pouze ve stopách).

Dále je uveden příklad kyseliny citronové podle vynálezu.

Příklad

Příprava inokula: Použijeme spor plísně *Aspergillus niger* mutanty S 59 rostoucích v Erlenmayerových bankách v objemu 100 ml obsahujících 15 ml nabobtnalých a povražených pšeničných zrn. Obsahem 1 banky očkujeme 24 l média následujícího složení: 14 % sacharózy, 0,25 % NH_4NO_3 , 0,025 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 % KH_2PO_4 , 0,01 % rozpustného škrobu, 0,0001 % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0002 % $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,00065 % $FeCl_3$. Otáčky míchadla 400 otáček/min, množství vháněného vzduchu 6 l/min, teplota 28 až 30 °C, doba kultivace 35 až 40 hodin. Vyrostlé inokulum je v peletách. **Příprava fermentačního média:** Připravíme sterilní fermentační médium o složení: 15 % sacharózy, 0,08 % NH_4Cl , 0,1 močoviny, 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,016 % KH_2PO_4 , 0,007 % KCl , 0,002 % $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 % $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 % $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a očkujeme při teplotě média 30 až 35 °C 3 až 5 % inokula.

Vlastní fermentace: Nerezový fermentor s centrálně umístěným mechanickým míchadlem (6ti lopatková turbína s dělicím kotoučem) obsahuje 152 l produkčního fermentačního média. Obrátky míchadla během prvních 48 hodin fermentace 300 otáček/min, dále až do konce fermentace 400 otáček/min. Množství vháněného vzduchu 12 l/min, teplota 30 °C, doba fermentace 168 h. Růst mycelia je difusní umožňující dosažení výtěžnosti 70 až 75 % na vnesený cukr. Vedlejší kyseliny jsou tvořeny pouze ve stopách.

V tabulce 1 je porovnán povrchový způsob fermentace a stávající submersní způsob fermentace se submersní fermentací dle vynálezu pokud jde o náklady, dobu fermentace, výtěžnost, spotřebu elektrické energie atd. pro výrobní jednotku s objemem výroby cca 72 t/den.

Tabulka 1

	Povrchová fermentace	Submersní fermentace dle stávajícího stavu techniky	Submersní fermentace dle vynálezu
Doba fermentace	9 dnů	7 dnů	4 dny
Výtěžnost	70 %	70 %	80 %
Náklady:			
1) Investiční náklady			
budovy	57,0	25,6	25,6
zařízení	26,62	38,27	38,27
celkem	83,62	63,87	63,87
2) výrobní náklady			
suroviny	10,76	12,70	12,70
elektr. energie	0,90	10,40	3,20
mzdy	12,87	7,90	7,90
celkem	24,53	31,00	23,80
3) roční náklady			
odpisy zařízení	1,78	2,55	1,70
odpisy budov	1,90	0,85	0,60
výrobní náklady	24,53	31,00	24,00
celkem	28,21	34,40	26,30

Například roční náklady poklesnou u submersní fermentace ze 34,40 na 26,3 cenových jednotek ve srovnání s 28,21 cenových jednotek při povrchové výrobě stejné kapacity. Mimoto způsob podle vynálezu je z hlediska cukerného zdroje flexibilní a lze proto použít nejrůznější cukerné substráty.

V tabulce uvedené údaje jsou převzaty z časopisu Process Biochemistry, November 1977/ /Schierholt J.: Fermentation Processes for the Production of Citric Acid/.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby kyseliny citronové submersním fermentačním způsobem zkvašováním cukerných roztoků plísní *Aspergillus niger*, vyznačený tím, že se kultivuje mutanta plísně *Aspergillus niger* S 59 uložená ve sbírce mikroorganismů CCF č. 1600, jejíž inokulum se nechá růst ve formě pelet a po té se přenese do vlastního fermentačního tanku, kde se nechá růst difusně po celou dobu fermentace při počátečním pH=5 a při teplotě 28 až 32 °C na kultivační půdě, která obsahuje cukrový substrát s výhodou sacharózou v koncentraci 10 % až 20 % hmotnostních.