



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

244 775

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno 23 10 84

(21) /PV 8046 - 84/

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 7/48

(40) Zveřejněno 13 11 85

(45) Vydáno 01 06 88

(75)
Autor vynálezu

UJCOVÁ EMMA RNDr. CSc.;
SEICHERT LEOPOLD RNDr. CSc.;
MUSÍLKOVÁ MARIE RNDr. CSc.;
KROVÁK PŘEMYSL JUDr. ing.;
SALVET MIROSLAV ing., PRAHA

(54)

Způsob výroby kyseliny citronové fermentací
houby *Aspergillus niger*

Podstatou řešení se submersní fermentace houby *Aspergillus niger* mutanty S 59 /CCF č. 1600/ ve vírovém hydrodynamickém poli, které vytváří kapalinový cirkulační paraboloid, zvedající nepřetržitě fermentační medium do vzduchového prostoru nad hladinou media ve fermentační nádobě, kde dochází k jeho vějířovitému rozstříku do stran ve tvaru kapiček, a to při počátečním pH= 4 až 5 a teplotě 28 - 32 °C a kultivační půdě obsahující cukrový substrát s výhodou sacharózu v koncentraci 8% až 20% hmotnostních.

244 775

Vynález se týká způsobu výroby kyseliny citronové submersním fermentačním způsobem, a to zkvašováním cukerných roztoků houby *Aspergillus niger*.

Při tomto fermentačním způsobu nelze použít produkční kmeny *Aspergillus niger* vhodné při výrobě způsobem povrchovým a je nutno vyšlechtit a aplikovat kmeny nové - nově vyšlechtěné mutanty houby *Aspergillus niger*. Nevyřešenou otázkou ovšem stále zůstává přísná specifita v citlivosti jednotlivých mutantů k základním podmínkám fermentace, bez jejichž znalostí nelze pak dosáhnout ekonomické výroby.

Jednou ze základních podmínek fermentace je způsob růstu, homogenizace a aerace media, dále typ míchadla, tvar tělesa míchadla, počet otáček, viskozita media atd. To má významný vliv na morfologii houby a na produkci kyseliny citronové.

Hlavní nevýhodou dříve popsanych způsobů výroby kyseliny citronové fermentací houby *Aspergillus niger* /Schierholt J.: *Processe Biochemie*, November 1977/ jsou vysoké nároky na vzdušení a tím na spotřebu elektrické energie, což ekonomicky znevýhodňuje výrobu produktu.

Tuto nevýhodu odstraňuje způsob výroby kyseliny citronové podle vynálezu, jehož podstatou je, že houba *Aspergillus niger* mutanta S 59 uložená ve sbírce mikroorganismů CCF č. 1600, se submersně kultivuje ve vírovém hydrodynamickém poli, které

vytváří kapalinový cirkulační paraboloid, zvedající nepřetržitě fermentační medium do vzduchového prostoru nad hladinu media ve fermentační nádobě, kde dochází k jeho vějířovitému rozstříku do stran ve tvaru kapiček, a to při počátečním pH 4-5 a teplotě 28° - 32°C a kultivační půdě obsahující cukrový substrát s výhodou glukozu nebo sacharozu v koncentraci 8% až 20% hmotnostních.

Kapalinový cirkulační paraboloid s výhodou umístěný uprostřed fermentační nádoby, vzniká pomocí bezlopatkového míchadla /a.o. 228221, a a.o. 228350/, které sestává z dutého rotoru, složeného z pláště s výhodou tvaru válce a dna, ve kterém je alespoň jeden otvor pro vstup media do rotoru.

Otáčením dutého rotoru, který je svojí dolní polovinou potopen ve fermentačním mediu a horní polovinou vyčnívá nad hladinu do vzduchového prostoru uzavřené fermentační nádoby, se otvorem ve dnu rotoru nasává fermentační medium na dno rotoru. Uvnitř rotoru se pak vytváří kapalinový paraboloid, který nepřetržitě zvedá medium ode dna fermentační nádoby vzhůru vzestupnou spirálou nad hladinu media. Zde se medium vějířovitě rozstříkuje do stran a poté ve formě kapiček padá vzduchovým prostorem zpět na hladinu media, případně stéká na hladinu po stěnách fermentační nádoby ve formě tenkého kapalného filmu.

Přitom současně vnější stěna pláště rotoru, která je potopená pod hladinou media, vytváří pod hladinou media centrální vír, který je tříštěn zárázkami na lokální víry.

V plynném prostoru, ve kterém medium nabylo tvaru drobných kapiček nebo tenké vrstvy /filmu/, dochází k intenzivnímu styku tekuté a plynné fáze bez ohledu na viskozitu media, čímž dochází k růstu kultivovaných mikroorganismů, které pak v prostoru pod hladinou maximálně produkují kyselinu citronovou. Přitom dochází k vysokému využití přiváděného vzduchu.

Proces můžeme ovlivňovat zejména otáčkami rotoru, jeho rozměry, velikostí vstupních a výstupních otvorů, mírou pono-

ření celého rotoru pod hladinu media apod.

Zvýšení intenzity vírového pole umožňuje dokonalou difusi kyslíku i do medií, které mají již kašovitý charakter, ale ještě tečou v gravitačním poli.

Výhodou způsobu výroby kyseliny citromové podle vynálezu je dokonalé využití kyslíku z vháněného vzduchu pro růst buněk uvedené houby a tvorbu produktu, což má za následek zkrácení doby fermentace, a zlepšení ekonomiky celého procesu.

Dále uvedený způsob fermentace umožňuje šetrné bezlopatkové míchání media a tvorbu pelet s vhodnou strukturou a délkou vláken, což nelze dosáhnout běžnými lopatkovými míchadly, např. vrtulovým nebo turbínovým míchadlem, protože při jejich použití dochází často k vážnému poškození a tříštění živých buněk o hrany lopatek. Další výhodou je, že vírové pole zabrahňuje jakémukoliv usazování media /vláken apod./ na stěnách fermentační nádoby nebo ve stavbě /zarážkách/ uvnitř fermentační nádoby, a to jak pod hladinou, tak ve vzduchovém prostoru nad hladinou media /intenzita vírového pole se reguluje počtem otáček rotoru za min./.

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 jsou uvedeny příklady výroby kyseliny citronové podle vynálezu.

Příklad 1.

Příprava inokula: Použijeme spor plísně *Aspergillus niger* mutanty S 59 rostoucích v Erlenmayerových baňkách v objemu 100 ml obsahujících 15 ml nabobtnalých a povařených pšeničných zrn. Obsahem 1 baňky očkujeme 24 l média následujícího složení: 14 % sacharozy, 0,25 % NH_4NO_3 , 0,025 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,01 % KH_2PO_4 , 0,01 % rozpustného 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/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 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,016 % KH_2PO_4 , 0,007 % KCl , 0,002 % $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,001 % $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,001 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a očkujeme při teplotě média 30 až 35°C 3 až 5 % inokula.

Fermentační nádoba o obsahu 20 l s centrálně umístěným bezlopatkovým rotorem tvaru dutého válce se dnem tvaru mezikruží, t.j. s centrálním vstupním otvorem uprostřed tohoto dna obsahuje 10 l fermentačního média, takže zaujímá polovinu obsahu fermentoru.

Dolní část rotoru je ponořena pod hladinou fermentačního média téměř u dna fermentační nádoby, horní část rotoru vyčnívá do vzduchového prostoru, nad hladinu víkem uzavřené fermentační nádoby.

Ve fermentační nádobě je dále umístěno symetricky kolem obvodu pět zarážek ve tvaru tyčí, upevněných dolním koncem ve víku fermentační nádoby.

Vnitřní průměr fermentační nádoby $d_1 = 0,25 \text{ m}$, výška $h_1 = 0,35 \text{ m}$. Vnitřní průměr bezlopatkového rotoru $d_2 = 0,09 \text{ m}$, výška $h_2 = 0,23 \text{ m}$, z toho výška spodního nástavce dutého rotoru $h_3 = 0,1 \text{ m}$.

Množství vháněného vzduchu 1,6 l/min., teplota 30°C, doba fermentace 160 h. Růst mycelia je difusní, umožňující dosažení výtěžnosti až 75 % na vnesený cukr. Vedlejší kyseliny jsou tvořeny pouze ve stopách. Počet otáček míchadla 12 ot./s t.j. 720 ot./min., obvodová rychlost míchadla cca 3,3 m/s.

Příklad 2.

Postup je stejný jako v příkladu 1, ale místo sacharózy bylo použito jak pro přípravu inokula, tak pro přípravu fermentačního média 10 % glukosa. Doba fermentace byla 108 hodin,

vhánění vzduchu je 1,2 l/min., výtěžnost činí 85 %. Počet otáček míchadla za min. i obvodová rychlost dutého rotoru míchadla zůstává stejná jako v příkladu 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby kyseliny citronové fermentací houby *Aspergillus niger*, vyznačený tím, že houba *Aspergillus niger* mutanta S 59 uložená ve sbírce mikroorganismů CCF č. 1600, se submersně kultivuje ve vírovém hydrodynamickém poli, které vytváří kapalinový cirkulační paraboloid, zvedající nepřetržitě fermentační medium do vzduchového prostoru nad hladinou media ve fermentační nádobě, kde dochází k jeho vějířovitému rozstříku do stran ve tvaru kapiček, a to při počátečním pH = 4 až 5 a teplotě 28° - 32°C a kultivační půdě obsahující cukrový substrát s výhodou glukosu nebo sacharozu v koncentraci 8 % až 20 % hmotnostních.