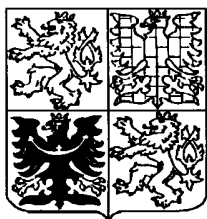


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 12.02.92

(40) 16.02.94

(21) 411-92

(13) A3

5(51)

C 12 N 1/14

(71) Kaznějovské chemické závody s.p., Kaznějov, CZ;

(72) Růžičková Ludmila ing., Horní Bříza, CZ;
Černý Václav ing., Kaznějov, CZ;
Bartásek Jaromír ing., Kaznějov, CZ;
Pendl Jiří ing., Plzeň, CZ;
Hotěk František ing., Petrohrad, CZ;

(54) **Produkční kmen mikroorganismu
Aspergillusniger pro povrchovou výrobu
kyseliny citronové**

(57) Nový produkční kmen houby *Aspergillus niger* (mutanty) s vysokou biochemickou aktivitou a rychlou klíčivostí spór, produkující kyselinu citronovou na melasových substrátech povrchovým kvašením, způsob jeho získání a kultivace. V textu jsou uvedeny výsledky laboratorního a provozního ověřování.

Popis vynálezu

Produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* pro povrchovou výrobu kyseliny citronové.

Vynález se týká nového produkčního kmene (mutanty) houby *Aspergillus niger* pro průmyslovou výrobu kyseliny citronové povrchovým způsobem.

Nový kmen, označený FL 310 (CCM) s rychlou klíčivostí spór a s vysokou biochemickou aktivitou je schopen kvašovat melasové substráty na kyselinu citronovou intenzivněji, než dosud používané kmeny ES 10 (CCM 8038) - AO 273 142, CS 179 (CCM 8037) - AO 273 141, U 47 (CCM-F-749) - AO 245 107 a L 1 (CCM-F-504) - AO 180 276 a to při běžných i zvýšených výškách melasového substrátu.

Vhodnost průmyslového kmene je posuzována především podle produkce žádaného produktu (množství kyseliny citronové v % na nasazený cukr), tvorby vedlejších produktů (množství kyseliny oxalové v % na vyprodukovanou kyselinu citronovou) a podle možnosti získávání kvalitního očkovacího materiálu.

Nový provozní kmen FL 310 (CCM) byl ověřován v laboratorních, poloprovodních a provozních podmínkách na různých typech melas, kde se osvědčil zvýšenou produkční aktivitou kyseliny citronové při produkci kyseliny oxalové, srovnatelné s kmenem ES 10 (CCM 8038). Tvorbu kyseliny oxalové lze ovlivnit především výběrem zpracovávané melasy a složením kvasného substrátu tak, aby její množství vyhovovalo dalšímu technologickému zpracování kvasných roztoků. Kmen FL 310 (CCM) tvoří na glycerinové sporulační půdě (AO 196 162) bohatě sporulující porůst konidií, které se snadno oddělují a lze je velmi dobře získat pro očkování kvasných substrátů nebo ke konzervaci.

Kmen FL 310 (CCM) splňuje všechny podmínky pro využití jako nový průmyslový kmen pro povrchovou výrobu kyseliny citronové.

Předmětem vynálezu je nový průmyslový kmen *Aspergillus niger*

FL 310, uložený v Čs. sbírce mikroorganismů Masarykovy university v Brně, Tvrdého ul. 14 pod číslem CCM .

Morfologická a fyziologická charakteristika.

Kmen FL 310 byl pěstován na glycerinové sporulační půdě (AO 196 162) o složení: 125 g glycerinu, 45 g sladového extraktu, 15 g NaCl, 0,5 g NH_4NO_3 , 0,08 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0015 g $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 g agaru na 1 litr půdy. Při teplotě 32 °C tvoří během 34-40 hodin kulaté kolonie o průměru 0,5-0,8 cm. Tvorba konidií začíná po 40 hodinách kultivace. Během 50 hodin tvoří souvislý nažloutlý, mírně zvrásněný porůst mycelia. Po 7 dnech kultivace je vyvinutý souvislý bohatý porůst konidií. Konidie lze snadno získat seškrabáním nebo odsátím.

Na sladovém a Czapkově agaru je porůst opožděn o cca 10 hodin. Intenzita sporulace je ^{na}sladovém agaru snížena, na Czapkově agaru ke sporulaci téměř nedochází.

Mikroskopický vzhled.

Konidie jsou tmavě hnědé až černé, hladké, kulovitěho tvaru o průměru 3-4 μm . Konidiální hlavice je kulatá o průměru 0,1 mm. Po celém jejím obvodu vyrůstají primární sterigmata lahvicovitěho tvaru a sekundární sterigmata nesou na svých koncích řetězce konidií. Konidiofory jsou 0,4-0,5 mm dlouhé.

Kmen FL 310 vytváří na produkčním melasovém substrátě optimálního složení za 20-24 hodin souvislou vrstvu mycelia, které tvoří během fermentace bohatě členitý bílý povrch s minimální sporulací.

Kmen FL 310 byl získán chemickou mutací z parentálního sbírkového kmene EL 115. Do vodní suspenze spór (koncentrace spór $2,86 \cdot 10^6$) bylo přidáno 0,02 % etyleniminu. Suspenze byla 3 hodiny míchána pomocí elektromagnetické míchačky. Pak byla suspenze naředěna tak, aby po rozlití na sporulační agarovou půdu vyrostly jednotlivé izolované kolonie, ze kterých byly získány monospórické kultury. Tyto byly hodnoceny kvasnými testy s melasovou půdou podle produkce kyseliny citronové. Byl vybrán nejaktivnější mutant FL 310.

Příklad 1

V laboratorním vařáku s přímým ohřevem parou byl připraven z vody a melasy roztok, obsahující 35 % hmot. cukru. Při teplotě 60 °C byla provedena úprava pH kyselinou citronovou na hodnotu pH 6,6-6,7 a dále přidáno 4-7 % hexakynoželeznatanu draselného, 0,2-0,6 % kyseliny fosforečné, počítáno na nasazený cukr. V této směsi byl udržován var po dobu 15 minut. Následovalo doplnění biologicky nezávadnou vodou na koncentraci cukru 15 % hmot. a pak bylo přidáno 5 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na 1 litr hotového substrátu. Substrát byl rozlit do pokusných nádob (výška substrátu 12-14 cm) a zaočkován testovanými kmeny. Po 8 dnech kultivace při 32 °C byla stanovena výtěžnost kyseliny citronové a produkce kyseliny oxalové:

výška substrátu:		12 cm		14 cm	
kmen	% KC	% KO/KC	% KC	% KO/KC	
FL 310	79,9	1,6	71,5	1,6	
ES 10	78,5	1,7	68,7	1,1	

Příklad 2

V provozním vařáku byl připraven substrát tak, že k podkladu vody bylo přidáno takové množství melasy, aby roztok obsahoval 35 % hmot. cukru. Po ohřevu na 85 °C byla přidána kyselina citronová na úpravu pH v rozmezí 6,0-6,6, hexakynoželeznatan draselný v množství 4-6 % a kyselina fosforečná 0,2-0,6 % hmot. na nasazený cukr. Roztok byl 60 minut udržován ve varu. Následovalo naředění biologicky nezávadnou studenou vodou na 14 % hmot. cukru. Po přidavku předepsaného množství kyseliny mravenčí a síranu zinečnatého byl kvasný substrát napuštěn do misek kvasné komory (výška substrátu 9-12 cm). Teplota zkvašovaného roztoku byla po dobu 9 dnů udržována v rozmezí 30-35 °C. Kvasné komory byly zaočkovávány střídavě kmeny FL 310 a ES 10. V souboru 470 provozních kvasných komor byly dosaženy tyto výsledky:

kmen	% KC	% KO/KC
FL 310	79,4	5,7
ES 10	77,5	5,4

Handwritten notes:
 1. 11. 11
 1. 11
 1. 11
 1. 11

Patentové nároky

Průmyslový kmen *Aspergillus niger* van Tieghem FL 310 (CCM 8141),
 produkující kyselinu citronovou povrchovým způsobem.

Aspergillus niger
 FL 310
 CCM 8141
 2006