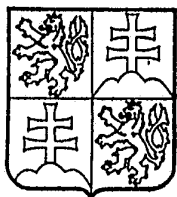


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 142

(21) PV 9589-87.M
(22) Přihlášeno 22 12 87

(40) Zveřejněno 12 07 90
(45) Vydáno 30 12 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 N 1/14

(75) Autor vynálezu VALTR ZDENĚK ing.,
PAŠEK JAROSLAV,
ČERNÝ VÁCLAV ing., KAZNĚJOV,
RŽIČKOVÁ LUDMILA ing., HORNÍ BŘÍZA

(54) Průmyslový kmen mikroorganismu *Aspergillus niger*, vhodný pro výrobu kyseliny citronové povrchovým způsobem

(57) Předmětem řešení je produkční kmen *Aspergillus niger*, mutant CA-179 (CCM 8038) pro výrobu kyseliny citronové povrchovým způsobem, který dosahuje zvýšených výtěžností než doposud známé kmeny. Kyselina citronová vyrobená z nového kmene je využitelná v potravinářském, farmaceutickém průmyslu a ve spotřební chemii.

Vynález se týká nového produkčního kmene (mutanta) houby *Aspergillus niger*, využitelného pro své vlastnosti v průmyslové výrobě kyseliny citronové povrchovým způsobem.

Nový kmen označený ES-10 (CCM 8038) vedle vysoké výtěžnosti, odpovídající nejlepším známým a provozně využívaným současným kmenům U-47 (CCM F-749) a CS-179, produkuje výrazně snížené množství vedlejší kyseliny oxalové, což má význam pro následné zpracování kvasných roztoků na krystalickou kyselinu citronovou.

Provozní kmeny pro výrobu kyseliny citronové povrchovým způsobem jsou hodnoceny především podle dosahované výtěžnosti, tj. množství vytvořené kyseliny citronové v % na nasazený cukerný zdroj v kvasném médiu, určený ke konverzi na kyselinu citronovou. Její tvorbu lze též vyjádřit údajem produkce g/m²/den.

Vedle základního kritéria vhodnosti kmene pro provozní využití musí kmen splňovat i další podmínky. Kmen určený pro průmyslovou aplikaci musí prokazovat bohatou tvorbu konidií při pěstování na speciální sporulační půdě určené k přípravě očkovacího materiálu (autorské osvědčení č. 196 162).

Mezi využívanými kmeny existují rozdíly nejen v intenzitě biochemické přeměny cukerné složky média, ale i v charakteru vytvářeného produkčního média a mycelia, tedy schopnostech rychlého vyklíčení očkovaných konidií, nárůstu mladého mycelia, jeho celistvost, soudržnost a schopnost v průběhu kvasného procesu vytvořit zdravé produkční mycelium přiměřené hmotnosti, vzhledu, aktivity a odolnosti proti infekčním mikroorganismům.

Produktivnost kmenů je výrazně ovlivňována složením kvasného média, technologickým postupem jeho přípravy, způsobem a dávkami přísad. Vlivy se projevují nejvíce u technologických postupů, kdy je zpracovávána jako cukerná surovina melasa (čs. patent č. 121 832, čs. patent č. 130 943, autorské osvědčení č. 180 276, 245 107 a 233 664).

Důležitým ukazatelem pro charakteristiku kmene je tvorba vedlejších kyselin, především kyseliny oxalové. Její množství možno regulovat v určitých mezích dávkami kyseliny fosforečné do hotového média, dominantní vliv má však druh a kvalita zpracovávané melasy. V případě kombinace kmene s běžnou produkcí kyseliny oxalové s typem melasy, stimulující její další tvorbu navíc, může dojít k situaci, že její vysoký obsah v kvasných roztocích způsobuje potíže při jejich zpracování. Východiskem je zde nasazení kmene se sníženou vedlejší tvorbou kyseliny oxalové.

Kmen ES-10 (CCM 8038) splňuje všechny podmínky pro využití jako nový průmyslový kmen, vhodný pro povrchový způsob citronového kvašení na melasových substrátech.

Nový kmen byl postupně ověřován v laboratorních, poloprovozních a provozních kvasných zkouškách v porovnání s dosud ve výrobě využívaným kmenem U-47 a dalším novým kmenem CS-179, který je pro kmen ES-10 parentálním.

Při zkouškách prokázal zvýšenou produkční aktivitu proti kmenu U-47 a sníženou produkci kyseliny oxalové proti oběma srovnávaným kmenům.

Předmětem vynálezu je nový průmyslový kmen mikroorganismu *Aspergillus niger*, mutant ES-10, uložený v Čs. sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně, tř. Obránců míru č. 10 pod označením CCM 8038.

Morfologická a fyziologická charakteristika

Mutant *Aspergillus niger* ES-10 pěstován na glycerinové půdě (autorské osvědčení č. 196 162) o složení: 125 g glycerinu, 45 g sladového extraktu, 15 g NaCl, 0,5 g NH₄NO₃, 0,08 g MgSO₄aq, 0,0015 g CuSO₄aq a 30 g agaru na 1 litr půdy, při teplotě 32 °C tvoří během 36 až 44 hodin kulaté kolonie o průměru 0,6 až 0,8 cm. K tvorbě konidií dochází ve středu kolonií po 50 hodinách kultivace. Od 4. dne je sporulační agar pokryt souvislým myceliárním povlakem se spodní nažloutlou, mírně vrásněnou stranou. Vnější strana mycelia jeví sporulaci po celé ploše. Po 8 dnech kultivace vzhled kultury představuje souvislý, bohatě sporulující porůst s intenzivní produkcí konidií, které se snadno oddělují

poklepem, lze je velmi dobře získat seškrabáním či odsátím a použít ke konzervaci.

Na sladidlovém agaru a syntetické půdě Czapek dosahuje kmen obdobných charakteristik růstu se zpožděním o 10 až 15 hodin. Intenzita sporulace po 8 dnech růstu je snížena.

Mikroskopický vzhled: Z myceliární plochy v celém průměru kolonie se tvoří konidiofory délky 3 až 4 mm, konidiální hlavice o průměru 0,1 mm jsou kulovitěho tvaru světle až tmavě hnědě zbarveny. Po celém obvodu vyrůstají primární sterigmata lahvicového tvaru a sekundární sterigmata nesou na koncích řetězce konidií, které jsou kulovitěho tvaru, hladké, o průměru 3 až 4 μ m tmavě hnědé až černé barvy.

Kmen ES-10 pěstován v tekutém melasovém médiu s 15 % cukru a optimální přísadou hexakvanoželeznatanu draselného, kyseliny fosforečné a přídavku $ZnSO_4$ aq v povrchových kvasných pokusech při teplotě 32 °C projevuje první známky klíčení po 14 hodinách a do 24 hodin tvoří souvislé mycelium, které sílí, bělá, dochází k jeho zvrásnění a mezi 2. až 3. dnem produkuje kyselinu citronovou.

Kmen ES-10 se liší od parentálního kmene CS-179 a provozního kmene U-47 především intenzitou tvorby kyseliny citronové (výtěžností) a úrovní souběžné tvorby vedlejší kyseliny oxalové. Hmotnost mycelia kmene ES-10 je zhruba o 10 až 15 % vyšší.

Kmen ES-10 po 9ti denním kvasném cyklu povrchového kvašení s výškou 9 až 12 cm melasového substrátu dosahuje za normálních podmínek těchto výsledků:

% výtěžnosti	U-47	75 až 80 %
	CS-179	82 až 85 %
	ES-10	83 až 86 %
Tvorba kyseliny oxalové (% OX/KC)	U-47	3 až 11 %
	CS-179	5 až 13 %
	ES-10	1 až 8 %

Z hlediska provozní použitelnosti kmene je vedle zvýšené výtěžnosti především ceněna vlastnost snížené tvorby kyseliny oxalové.

Nový produkční kmen ES-10 byl získán mutagenním působením UV světla na parentální kmen CS-179, který je též zařazen do souboru provozně využívaných kmenů.

K mutaci použita germicidní lampa 30 W firmy Philips, vyzařující monochromatické světlo o vlnové délce 253,7 nm. Suspenze konidií parentálního kmene byla získána spláchnutím sporulující kultury sterilním 0,5% roztokem tritonu a filtrací přes řídkou fritu k odstranění zhluků spor a zbytků hyf. Suspenze naředěna na koncentraci cca 10^6 konidií/ml. 5 ml této suspenze bylo rozlito na plochu Petriho misky (Ø 10 cm) a ozařováno UV lampou ze vzdálenosti 25 cm po dobu 5 až 25 minut při normální teplotě a intenzitě záření cca 4,5 J/m²/sec. Z přežitých kolonií byly získány monosporické kultury vypěstované na sporulační agarové půdě, které byly hodnoceny produkcí kyseliny citronové kvasnými testy s melasovou půdou. Z nich byl vybrán nejlepší a nejaktivnější mutant označený ES-10.

Příklad

1. V laboratorním pokusném vařáku s přímým ohřevem parou se připraví kvasné melasové médium složení: 300 g 50 % melasy, 4 až 7 %, hexakvanoželeznatanu draselného, 0,2 až 0,6 % H_3PO_4 počítáno na nasazený cukr a 5 mg $ZnSO_4$ aq na 100 ml substrátu.

varu doplní vodou na konečný objem (15 g cukru/100 ml), přidá se ZnSO_4aq , rozleje se do pokusných nádob s výškou substrátu 9 až 12 cm a zaočkuje se testovanými kmeny. Po 9 dnech kultivace při 32 °C se stanoví výtěžnost kyseliny citronové a produkce kyseliny oxalové.

Melasa	kmen	výtěžek %	% OX/KC
A	U-47	81,2	9,8
	CS-179	85,2	10,8
	ES-10	86,8	6,1
B	U-47	83,8	8,2
	CS-179	87,1	9,6
	ES-10	87,6	4,1

2. Substrát pro provozní vaření v kvasných komorách byl připraven v provozním vařáku tak, že k podkladu vody bylo odměřeno množství melasy, aby roztok obsahoval 35 % hmot. cukru. Směs byla ohřata na 85 °C, přidala se kyselina sírová na úpavu pH v rozmezí 6,0 až 6,6, kyanoželeznatan draselný 4 až 6 % hmot. na nasazený cukr, kyselina fosforečná 0,2 až 0,6 % hmot. a roztok se ohřál k varu, který trval 60 minut. Po skončení varu se roztok doplnil biologicky nezávadnou studenou vodou na konečných 14 % hmot. cukru. Po přidání předepsaného množství kyseliny mravenčí a síranu zinečnatého se kvasný roztok naplní do misek v komoře. Výška substrátu byla 9 cm, doba kvašení 9 dnů, teplota zkvašovaného roztoku 30 až 35 °C. Kvasné komory byly zaočkovány střídavě kmeny U-47 a CS-179 a ES-10. Dále uvedené výsledky jsou průměrem skupin 10 až 20 provozních komor se všemi třemi kmeny, zkvašujícími 3 druhy použitých melas.

Melasa	kmen	výtěžnost %	% OX/KC
I.	U-47	79,3	8,7
	CS-179	84,3	9,2
	ES-10	83,3	5,0
II.	U-47	77,8	7,3
	CS-179	81,6	8,2
	ES-10	83,6	5,1
III.	U-47	80,6	9,2
	CS-179	85,6	10,0
	ES-10	85,8	6,4

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Průmyslový kmen *Aspergillus niger*, mutant ES-10 (CCM 8038) pro povrchovou výrobu kyseliny citronové.