



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262 877

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 29 12 86
(21) PV 10086-86.S

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 16 08 88
(45) Vydáno 1.3.1990

(75)
Autor vynálezu

ROSENBERG MICHAL ing., BRNO,
ŠTURDÍK ERNEST ing. CSc., BRATISLAVA,
GOMÖRY JÚRAJ ing., HLOHOVEC,
STANEK STANISLAV ing., LEOPOLDOV,
KACINA ROMAN ing., HLOHOVEC,
ŠKÁRKA BOHUMIL doc. ing. CSc., BRATISLAVA

(54)

Kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* CCM 8004

Řešení se týká nového kmene *Aspergillus niger* CCM 8004, který produkuje na jednoduchém definovaném médiu kyselinu glukonovou vysokou rychlostí i stupněm konverze, s minimálním obsahem nežádoucích látek a pigmentů. Kmen má použití při fermentační produkci kyseliny glukonové.

Vynález se týká nového kmene *Aspergillus niger* mutant N-XI, který produkuje na jednoduchém minerálním médiu kyselinu glukónovou s vysokou rychlostí produkce i selektivitou, bez významnějších množství zbarvených látek a vykazuje zvýšenou odolnost vůči solím kyseliny glukónové ve fermentačním médiu.

Schopnost kmene *Aspergillus niger* produkovat kyselinu glukónovou je známá již více než 40 let (Miall, L.M.: Organic Acids, In Primary Products of Metabolism, Academic Press, New York 1978). Těto vlastnosti je využíváno při fermentační výrobě kyseliny glukónové, jejích solí a glukono- δ -laktonu. Literární údaje uvádějí, že konverze glukózy na kyselinu glukónovou probíhá na vícesložkovém minerálním médiu s přidavkem dalších výživových komponent (kukuřičný výluh, kvasničný autolýzát, atd.), což společně s vyšší koncentrací biomasy (3 až 5 g suché váhy na litr) způsobuje, že výsledný produkt obsahuje značné množství balastních látek (složky produkčního média, látky uvolněné z biomasy - pigmenty, sekundární metabolity, atd.) a klade vyšší ekonomické nároky na získání vysoce čistého produktu, který je potřebný např. pro farmaceutické, či potravinářské použití. Katalogy kultur hub u nás (Catalogue of Cultures, Universita Karlova, Praha 1976; Catalogue of Cultures - Fungi Czechoslovak collection of microorganisms, J.E. Purkyně University, Brno 1982) uvádějí druh *Aspergillus niger* bez vlastnosti vysoce selektivně produkovat kyselinu glukónovou. U nás nejsou k dispozici vysokoprodukční kmeny hub, které by byly schopné vysoce selektivní produkce kyseliny glukónové.

Uvedený nedostatek odstraňuje vynález, kterým je nový kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* mutant N-XI. Kmen je uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J.E. Purkyně v Brně (Třída Obránců míru) pod označením CCM 8004. Nový kmen byl získaný tak, že na vodní suspenzi spór *Aspergillus niger* v koncentraci 10^6 spór v jednom mililitru s přídavkem 1% (w/v) Tweenu 80 se působilo γ -zářením po dobu 20 až 30 minut. Suspenze spór byla pak rozlita na sladidinový agar a kultivována při 25 až 30°C. Z vysporulované kultury byla připravena suspenze spór, která po vhodném naředění byla rozlita na sladidinový agar. Jednotlivé vyrostlé kolonie kultury mikroorganismu byly hodnoceny fermentačními zlouškami, jak z hlediska produkce kyseliny glukónové, tak i tolerance na vysoké koncentrace glukonátových solí a tvorby pigmentů. Takto získaný kmen *Aspergillus niger* mutant N-XI byl několikrát pasážován na tekuté půdě s vysokým obsahem glukózy a dále uchováván klasickým způsobem. Mezi hlavní přednosti takto vyselektovaného kmene *Aspergillus niger* mutant N-XI patří vysoká rychlost produkce kyseliny glukónové - 1,2 až 1,8 % (hmotnost/objem) utilizovaného sacharidu za hodinu při výtěžcích 94 až 98 % teoretické hodnoty. Koncentrace biomasy je však v porovnání s dostupnými literárními údaji (3 až 5g suché hmotnosti mycelia / liter media) podstatně nižší (0,5 až 1,0g na liter media). Tyto hodnoty jsou dosahovány na jednoduchém definovaném minerálním médiu s asimilovatelným zdrojem uhlíku a živných solí, což společně s nižší koncentrací biomasy umožňuje získat požadovaný produkt vysoké čistoty s minimálním obsahem balastních a pigmentujících látek. Kmen si zachovává vysokou produkční schopnost i při vysokých koncentracích glu-

konátových solí ve fermentačním médiu (více než $450 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$).

Nový kmen *Aspergillus niger* mutant N-XI dobře roste na běžných kultivačních médiích používaných na kultivaci mikroskopických hub (Czapek-Doxův agar, sladinový agar, agar s glukózou a kvasničným extraktem apod.). Při 28°C dosahují kolonie při lineárním růstu na Czapek-Doxovém agaru v průměru 4,3 cm za 72 hodin, na sladinovém agaru (5°Bg) 3,1 cm. Na Czapek-Doxovém agaru jsou kolonie ploché, nízké, zpočátku tvořené bílým vzdušným myceliem. Při sporulaci se zbarvují od středu ze žluté na světle až tmavohnědo, na sladinovém agaru tmavohnědo až černě. Kolonie je na spodní straně radiálně zvrásněná, žluto černá. K hojné sporulaci na celé kolonii dochází na 6 až 7 den, v té době se tvoří na kolonii jemné sekundární mycelium. Spóry jsou tmavě pigmentované, na povrchu vyrůstají jemné výčnělky. Konidiofóry jsou 1 až 2 mm vysoké, většina fruktifikačních struktur má konidiofór vysoký 1,5 mm. Šířka konidioforu je v průměru $18,5 \mu\text{m}$, konidiální hlava má v průměru $230 \mu\text{m}$. Průměrná velikost konidií je $4,2 \mu\text{m}$, jejich viabilita je velmi dobrá. Životaschopnost spór při dlouhodobém skladování v suspenzi s aktivním uhlím, v parafinovém oleji či v lyofilizovaném stavu je velmi dobrá.

Kmen *Aspergillus niger*, mutant N-XI, je možné využít na vysoce efektivní fermentační přípravu kyseliny glukónové, glukono- δ -laktónu, glukono- α -laktónu či glukonátových solí, které mají široké spektrum využití (např. farmaceutický, potravinářský, chemický průmysl). Vynález ilustruje následujícími příklady provedení, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

Příklad 1

282 877

Na vodní suspenzi spór *Aspergillus niger* v koncentraci 10^6 spór/ml s přídavkem 1 % (objem/objem) Tweenu 60 se působí γ -paprsky ze zdroje ^{60}Co po dobu 20 až 30 minut. Suspenze se potom rozleje na sladidinový agar a nechá se vysporulovat v temnotě při $25\pm 30^\circ\text{C}$. Z takto vysporulované kultury se připraví suspenze spór v 0,9 % chloridu sodného, která se ředí tak, aby po rozlití na sladidinový agar vyrostly za 2-4 dny jednotlivé kolonie kultury mikroorganismu, které se hodnotí fermentačními zkouškami na produkci kyseliny glukónové i na zvýšenou odolnost vůči solím kyseliny glukónové. Takto byl vybrán kmen *Aspergillus niger*, mutant K-XI.

Příklad 2

Připraví se 2,5 l kultivačního média, které obsahuje v 1 litru 200g glukózy, 0,39g hydrogenfosforečnanu amonného, 0,19g dihydrogenfosforečnanu draselného a 0,16g heptahydrátu síranu hořečnatého. Sterilní kultivační médium se v 5 l fermentoru zaočkuje spórami *Aspergillus niger*, mutant K-XI na koncentraci spór $0,5-1\cdot 10^6/\text{ml}$ a kultivuje se při teplotě 30°C , za míchání při 350 otáčkách za minutu a za vzdušnění 1,2 objemu vzduchu na 1 objem fermentačního média za minutu. V průběhu fermentace je pH média udržováno přídavkem 48 % (hmotnost/objem) roztoku hydroxidu sodného na hodnotě 6,5. Glukóza byla v produkční fázi transformována na kyselinu glukónovou rychlostí 1,3-1,4 % (hmotnost/objem) glukózy za 1 hodinu, přičemž maximální koncentrace biomasy nepřevyšuje hodnoty 0,9g suché váhy mycélia na 1 litr fermentačního média. Médium po fermentaci obsahuje více než 233g glukonátu sodného na 1 litr, což je 96 % teoretické hodnoty. Celková doba fermentace je maximálně 29 hodin.

Příklad 3

282 877

Izolovaný kmen má tu vlastnost, že jeho mycelium po oddělení od fermentačního média je možné použít několikrát za sebou na fermentační přípravu kyseliny glukónové, čímž se ušetří doba potřebná na růst mycelia. Připraví se 170 g glukózy v 1 litru a tento sterilní roztok se v 5 l fermentační nádobě, obsahující 2,5 l tohoto roztoku smíchá s myceliem, které se získá separací z fermentačního média po skončení fermentace, popsané v příkladu 2. Podmínky fermentace jsou stejné, jako v příkladu 2. Celková doba fermentace je 13 hodin a získá se 200 g glukonátu sodného, což je 97 % teoretické hodnoty.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* CCM 8004, produkující kyselinu glukonovou.