



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

196 002

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno

(21)

13 06 77
(PV 7798 - 77)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno

29 06 79

(45) Vydáno

01 3 82

(75)
Autor vynálezu

MUSÍLKOVÁ MARIE RNDr.PhMr.CSc.,

UJCOVÁ EMMA RNDr.CSc.,

SEICHERT LEOPOLD RNDr.CSc. a

FENCL ZDENĚK RNDr.DrSc.,

PRAHA

(54)

Produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger*

1

Vynález se týká nového produkčního kmene pro submersní výrobu kyseliny citrónové.

Citrónová kyselina se vyrábí průmyslově pomocí mikroorganismů již více než 50 let. Spektrum jejího použití je velmi široké, a to od farmaceutického průmyslu až po lehký a chemický průmysl. V poslední době se její uplatnění dále rozšiřuje, neboť se stává základní surovinou pro výrobu biologicky degradovatelných detergentů.

Zatímco pro její aplikaci v chemickém a lehkém průmyslu je zde možnost její výroby pomocí kvasinek z n-alkánů (Ajinomoto Co., Japan: A fermentation process for the production of citric acid. Angl.pat. 1,204.635, 1970), pro potravinářské a farmaceutické účely je nutné, aby výchozí surovinou byl potravinářsky nezávadný produkt, jako je např. sacharosa. V tomto případě se konverse sacharosy na citrónovou kyselinu provádí pomocí plísní, převážně kmen *Aspergillus niger* (Jungbunzlauer Spiritus & Chem.Fabrik : Preparation of citric acid. OE 293 313, pat. 1971, OE 296 194, pat. 1972). Klasický fermentační postup je povrchová fermentace melasových cukerných médií. Tento postup je náročný na čas, fermentační prostor i pracovní síly, a proto se v současné době prosazuje ekonomičtější submersní způsob výroby.

Submersní způsob výroby vyznačuje se zejména možností mechanizace, automatizace, vyšší produktivitou práce a možností standardizace podmínky výroby, čehož nelze dosáhnout

198 002

při povrchovém způsobu. Pro submersní výrobní postup dosud nejsou k dispozici vhodné vysokoprodukční kmeny plísní.

Předmětem vynálezu je nový produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* mutanta NG 233 pro submersní výrobu kyseliny citronové, uložený v mezinárodní sbírce mikroorganismů pod č. CCF 1599.

Morfologická a fyziologická charakteristika produkčního kmene mikroorganismu *Aspergillus niger* mutanta NG 233 (Thom.Ch.Raper, K.B. : A manual of the *Aspergilli*, Baltimore, 1945).

Dobře roste a sporuluje, barva spor a charakter růstu na sladidinovém agaru podobné jako u mutanty 97 A. K dobré sporulaci dochází obvykle 6.dne kultivace. Životnost spor je dobrá. Na sporulačním agaru s pivem tvoří za 4 dny 3 cm kolonie, sporulace hustá, černá, ale pouze ve středu kolonií, okraje kolonií tvoří výrazné bílé vzdušné mycelium ; spodní strana kolonií je hladká, ve středu mírně nažloutlá. Na Raulinově agaru jsou kolonie v průměru 3 cm tvořeny nízkým vzdušným myceliem, ve středu řídká skořicově zbarvená sporulace, střed kolonií z obou stran citronově žlutý a zvrásněný. Na Czapekovi agaru jsou kolonie v průměru 3 cm velké, středy kolonií jsou bez spor, ale okraje hustě skořicově sporulují, kolonie jsou hladké, spodní strana je světle béžová až bílá.

Mikroskopický vzhled : spory jsou chlupaté 4 - 5 μ v průměru, konidiofory 0,6 - 0,8 mm dlouhé, hlavice 0,06 mm. Při submersní kultivaci přeměňuje sacharosu (při 10-20 % koncentraci) z 65 - 75 % na kyselinu citronovou.

Kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* mutanta NG 233 byla získána tak, že se na suspensi protoplastů výchozího kmene mutanty 97 A působí N - methyl - N'-nitro - ~~M~~-nitroseguanidinem (NG). Kultivace hyf, ze kterých byly protoplasty uvolňovány, a vlastní příprava protoplastů byly prováděny postupem uvedeným v práci M. Musílková, Z. Fencel (*Folia microbiologica* 13: 235 - 239, 1968).

Působení NG bylo provedeno tak, že suspense protoplastů byla smíchána s NG v 0,05 M tris-maleinovém pufru pH 6,0. Výsledná koncentrace NG byla 1 mg/l ml, výsledný počet protoplastů 10^5 /ml. Inkubace probíhala čtyři hodiny stacionárně při 30 °C za občasného míchání. Postup působení NG je uveden v práci M. Musílková, Z. Fencel, E. Ujčová, L. Seichert (*Folia microbiologica* 23: 103-107, 1978).

Poté byla suspense rozlita na sladidinový agar v Petriho miskách a ponechána vysporulovat při teplotě 30 °C v termostatu. Z vysporulované kultury byla připravena suspense spor, která byla naředěna tak, aby po dalším rozlití na sladidinový agar vyrostly jednotlivé izolované kolonie.

Tyto kolonie byly hodnoceny fermentačním testem z hlediska produkce kyseliny citronové na rotační třepačce a vybrány nejlepší z nich.

Hlavní výhodou nové mutanty připravené z protoplastů je zvýšená schopnost produkovat

citronovou kyselinu za submersních podmínek kultivace, kdy médium obsahuje 10 - 20 % cukerného substrátu, přičemž až 65 - 75 % dodaného cukru je konvertováno na citronovou kyselinu během 5 až 7 dní fermentace.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* mutanta NG 233 CCF 1599 pro submersní výrobu kyseliny citronové.

O P R A V A

popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 196 002

(51) Int.Cl.² C 12 N 1/14

V popisu vynálezu k výše uvedenému autorskému osvědčení je v záhlaví uvedeno chybné PV.

Správně má být:

(21) PV 7798-78

Úřad pro vynálezy a objevy