



GRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262168
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 13 K 1/00

(22) Přihlášeno 17 08 87
(21) (PV 6023-87.Z)

(40) Zveřejněno 15 07 88

(45) Vydáno 15 06 89

(75)
Autor vynálezu

ROSENBERG MICHAL ing., BRNO, ŠTURDÍK ERNEST doc. ing. CSc.,
BRATISLAVA, PÁPAYOVÁ IVETA ing., TRENČÍN, BALÁŽ
ŠTEFAN ing. CSc., MODRA, POLÍVKA LUDOVÍT doc. ing. CSc., TRNAVA

(54) Způsob výroby kyseliny glukónové vedle fruktózy v submerzní kultuře Aspergillus niger

1

2

Řeší se způsob výroby kyseliny glukónové vedle fruktózy v submerzní kultuře *Aspergillus niger* konverzí glukózo-fruktózového sirupu. Výhodou způsobu je, že se pomocí vysokoprodukčního kmene *Aspergillus niger* N-XI připraví z glukózo-fruktózových sirupů vysoce selektivně, s vysokou rychlostí konverze a při vyšších výtěžnostech roztoky kyseliny glukónové a fruktózy s obsahem až 40 % hmot. každé z těchto složek. Kyselinu glukónovou lze po zahuštění odseparovat krystalizací, a připravit tak prakticky čisté fruktózové sirupy.

Vynález se týká způsobu výroby kyseliny glukónové vedle fruktózy v submerzní kultuře *Aspergillus niger* konverzní glukózo-fruktózových sirupů.

Oba produkty mají široké spektrum použití. Fruktóza se používá především jako perspektivní sladidlo v potravinářském průmyslu, kyselina glukónová, její soli i glukono- δ -laktón nacházejí uplatnění ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, při povrchové úpravě kovů, jako deinkrustační činidlo, aditivum v barvířském průmyslu, přísada do betonu a v mnoha dalších oborech.

Produkce kyseliny glukónové mikrobiální konverzí glukózového substrátu je známá již několik desítek let. Vysoký stupeň konverze glukózy i některých jiných sacharidů na kyselinu glukónovou vykazují především vláknité houby rodů *Aspergillus* a *Penicillium* (Moyer, A. J. et al, Ind. Eng. Chem. **29**, 777 /1937/; Bloom, R. H. et al, Ind. Eng. Chem. **44**, 435 /1952/; Ziffer, J. et al, Br. Patent 1 249 347 /1971/) a také bakterie *Glucobacter suboxydans* (Currie, J. N., Carter, R. H., US Patent 1 896 811 /1930/; Oosterhuis, N. M. G. et al, Biotechnol. Lett. **5**, 141 /1983/).

Mezi přednosti fermentační produkce kyseliny glukónové pomocí plísni patří jednoduché fermentační médium, selektivita i rychlost konverze, menší nároky na sterilitu celého procesu a další (Rohr, M. et al, In Biotechnology, (Rehm, H. J., Reed, G. — Eds), Verlag Chemie, Weinheim /1983/).

Na přípravu fruktózy, případně fruktózových sirupů obsahujících také glukózu (většinou ze škrobnatých surovin) se využívají většinou imobilizované enzymy, příp. mikroorganismy (Barrett, S. P. et al, US Patent 4 288 548 /1981/, Heady, R. E., US Patent 4 276 379 /1982/, US Patent 4 317 880 /1982/).

Glukózo-fruktózové sirupy lze získat výhodně i z koncentrovaných roztoků sacharózy při použití kvasničné biomasy s vysokou invertázovou aktivitou. Takto připravené glukózo-fruktózové sirupy obsahují asi 40 až 50 % hmot. fruktózy. Oddělit fruktózu od glukózy běžnými separačními postupy je však, vzhledem na podobné fyzikálněchemické vlastnosti obou sacharidů, mimořádně obtížné.

Příprava fruktózových sirupů a kyseliny glukónové způsobem podle vynálezu je velice výhodná, protože *Aspergillus niger* mutanta N-XI oxiduje selektivně glukózu na kyselinu glukónovou na jednoduchém minerálním médiu s vysokou rychlostí konverze, přičemž obsah fruktózy v médiu se v průběhu fermentace nemění. Vzniklou příslušnou sůl kyseliny glukónové lze odseparovat z média jednoduchou krystalizací a připravit tak navíc prakticky čisté koncentrované roztoky fruktózy.

Vyselektovaná mutanta N-XI vykazuje vysokou glukózaoxidázovou aktivitu, což umožňuje pracovat s nízkými koncentracemi

biomasy při zachované vysoké rychlosti produkce. Spotřeba glukózy na nárůst biomasy je proto velmi nízká a výtěžky kyseliny glukónové vztažené na počáteční koncentraci glukózy v médiu dosahují 92 až 97 %. Získanou biomasu lze po odseparování z fermentačního média opakovaně použít v dalších fermentacích. Produkční kmen si zachovává vysokou aktivitu i při vyšších koncentracích glukonátových solí, což umožňuje připravit koncentrované roztoky fruktózy a kyseliny glukónové. Při přípravě fruktózových roztoků způsobem podle vynálezu odpadá i izolace a čištění enzymů, jejich imobilizace na vhodný nosič apod.

Podstatou způsobu přípravy směsi fruktózy a kyseliny glukónové podle vynálezu je, že se submerzně kultivuje mutanta plísni *Aspergillus niger* N-XI v roztoku glukózo-fruktózového sirupu, který obsahuje 5 až 40 % hmot. každé z těchto složek, při teplotě 25 až 35 °C a hodnotě pH 5,0 až 7,5.

Základní morfologické a fyziologické charakteristiky mutanty *Aspergillus niger* N-XI, která je uložena v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod označením CCM 8004, jsou podrobně uvedeny v přihlášce vynálezu čs. AO č. 262 877.

Mutanta se kultivuje na jednoduchém minerálním médiu při teplotách 25 až 35 °C a hodnotě pH v rozmezí od 5,0 do 7,5. V průběhu kultivace se hodnota pH udržuje přidáváním hydroxidu nebo uhličitanu alkalického kovu na konstantní hodnotě. Je zřejmé, že kyselina glukónová bude v tomto prostředí vznikat ve formě odpovídající soli s alkalickým kovem, které spadají v tomto textu rovněž do rozsahu výrazu „kyselina glukónová“. Fermentační médium se intenzivně míchá a vzdušní s výhodou od 1 do 1,5 objemu vzduchu na 1 objem fermentačního média. Na zabezpečení maximální koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu je výhodné uskutečňovat fermentace při přetlaku od 0,1 do 0,5 MPa.

Fermentační médium obsahuje glukózo-fruktózový sirup s 5 až 40 % hmot. každé z těchto složek. Výhodně je uskutečňovat fermentaci při počáteční koncentraci glukózo-fruktózového sirupu, 20 % hmot. obou složek, při které dochází k intenzivnímu růstu biomasy s vysokou glukózaoxidázovou aktivitou. V průběhu fermentace je možné přidávat koncentrovaný glukózo-fruktózový sirup, s výhodou kontinuálního přidávku tak, aby aktuální koncentrace glukózy ve fermentačním médiu se pohybovala v rozmezí od 2 do 6 % hmot., při které je konverze glukózy na kyselinu glukónovou nejrychlejší.

Pro zaočkování fermentačních nádob je možné použít jak spórového, tak i vegetativního inokula. Spórové inokulum je možné připravit spláchnutím spór používaného mikroorganismu 0,1% roztokem Tweenu 80

tak, aby počáteční koncentrace spór ve fermentačním médiu byla v rozmezí 1 až $3 \cdot 10^6$ spór v 1 ml média. Vegetativní inokulum se získá 12 až 18hodinovým naklíčením spór v podmínkách snížené aerace a dávkuje se do fermentačního média v množství od 1 do 15 % celkového objemu. Po provedené fermentaci se buněčná hmota mikroorganismu oddělí od fermentačního média a může se použít v novém fermentačním cyklu. Tento způsob vedení fermentace je možné použít i opakovaně.

Fermentace se provádí až do dosažení žádaného výtěžku. Např. za a) 28 až 30 hodin lze připravit 25 % hmot., za b) 35 až 40 hodin 35 % hmot. roztoky fruktózy a kyseliny glukónové, vzhledem na počáteční koncentraci glukózy je výtěžnost kyseliny glukónové a) 90 až 95 %, resp. b) 93 až 97 procent, v případě fruktózy 100 %. Koncentrace biomasy ve fermentačním médiu nepřesahuje 1,2 g suché hmotnosti na 1 litr média. Je třeba ovšem počítat s určitými odchylkami v reakčních dobách i výtěžcích v závislosti na použitém zařízení, ve kterém se kultivace uskutečňuje.

Vzniklou sůl kyseliny glukónové lze odseparovat od fruktózy po zahuštění jednoduchou krystalizací samovolně, případně po přidávku malého množství rozpouštědla, ve kterém není uvedena sůl rozpustná, a získat tak fruktózový koncentrát. Kyselinu glukónovou je možné připravit z její soli působením zředěné minerální kyseliny a pak např. katexy (sulfónová pryskyřice, Dowex 50, či jinými průmyslově běžně používanými katexy). Z roztoku kyseliny glukónové lze připravit glukono- δ -laktón krystalizací supernasyceného roztoku při teplotách od 36 do 57 °C, jak to popisuje např. japonský patent č. 75 123 674.

Vynález ilustrují následující příklady provedení, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

Příklad 1

Připraví se fermentační médium, které obsahuje glukózo-fruktózový sirup s 25 % hmot. každé z těchto složek a další chemikálie (% hmot.):

0,05 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,
0,03 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,
0,025 KH_2PO_4 a
0,022 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

Fermentace se provádí v nerezovém tanku s centrálně umístěným mechanickým míchadlem. Jako inokulum se použije suspenze spór plísňe *Aspergillus niger* N-XI kultivované na šikmém sladidlovém agaru 6 dní při 30 °C, kterou připravíme tak, že spóry jsou spláchnuty příslušným množstvím 0,1% roztokem povrchově aktivní látky (Tween 80). Takto připravenou spórovou suspenzi zaočkujeme 3 dm³ sterilního fermentačního mé-

dia takovým množstvím spórového inokula, aby počáteční koncentrace spór ve fermentačním médiu byla od 1 do $2 \cdot 10^6$ spór v 1 cm³.

V první fázi kultivace klíčí spóry při teplotě 30 °C, míchání 150 min.⁻¹, vzdušnění 0,2 objemu vzduchu na 1 objem fermentačního média, pH fermentačního média je kontinuálně upravované v průběhu celé fermentace přidávkem 30 % hmot. roztoku NaOH na hodnotu 6,2.

Po 12 až 15 hodinách začíná vlastní fermentace. Zvýší se míchání na 400 min.⁻¹ a vzdušnění na 1 objem vzduchu na 1 objem fermentačního média, přičemž ve fermentační nádobě je udržován přetlak 0,1 MPa, teplota 30 °C a hodnota pH 6,5. Celková doba fermentace včetně klíčení spór činí 45 až 50 hodin. Výsledným produktem je směs fruktózy a kyseliny glukónové (ve formě sodné soli), přičemž výtěžky glukonátu sodného dosahují 91 až 96 % vzhledem na vloženou glukózu, výtěžky fruktózy jsou 100 %. Ke tvorbě dalších organických kyselin či pigmentů v průběhu fermentace nedochází.

Příklad 2

Připraví se fermentační médium, jehož složení je uvedeno v příkladě 1, ale které obsahuje glukózo-fruktózový sirup s 10 % hmot. každé z těchto složek. 2 dm³ tohoto média se zaočkuje suspenzí spór *Aspergillus niger* N-XI postupem uvedeným v příkladě 1. Kultivuje se 20 hodin při 30 °C, pH 6,0, míchání 150 min.⁻¹ a vzdušnění 0,7 objemu vzduchu na 1 objem fermentačního média. Příslušný podíl takto připravené kultury, postačující k dosažení 5 až 15 % obj. inokula, se vnese do 20 dm³ fermentačního tanku, který obsahuje 12 dm³ produkčního média, jehož složení je uvedeno v příkladě 1. Doba fermentace nepřesahuje 28 až 32 hodin. Všechny ostatní parametry při fermentaci i výtěžnost jsou stejné jako v příkladě 1.

Příklad 3

Postup přípravy inokula i podmínky fermentace jsou stejné jako v příkladě 1. Po skončení fermentace se buněčná hmota mikroorganismu odseparuje a vnese se do sterilního glukózo-fruktózového sirupu o obsahu 35 % hmot. každé z těchto složek. Podmínky fermentace jsou analogické jako v příkladě 1. Výtěžky glukonátu sodného, resp. fruktózy, dosahují 94 až 98 %, resp. 100 %, vzhledem na vloženou glukózu, resp. fruktózu. Tento postup je možné 5krát opakovat bez ztráty aktivity mycélia.

Příklad 4

Inokulum můžeme připravit postupem uvedeným v příkladech 1 a 2. Připraví se

10 dm³ sterilního média, které obsahuje glukózo-fruktózový sirup s 20 % hmot. každé z těchto složek, dále 0,6 % hmot. (NH₄)₂SO₄ a ostatní chemikálie v množství, jak je uvedeno v příkladě 1. Fermentace se uskutečňuje ve fermentoru o objemu 20 dm³ za podmínek, které jsou uvedeny v příkladě 1. Po poklesu koncentrace glukózy ve fermentačním médiu na 3 % hmot. je aktuální koncentrace glukózy udržována v rozmezí

od 1 do 5 % hmot. kontinuálním přidavkem koncentrovaného roztoku glukózo-fruktózového sirupu. Tímto způsobem lze připravit za 45 až 50 hodin 35 až 45 % hmot. roztoky kyseliny glukónové a fruktózy, přičemž výťažky kyseliny glukónové, resp. fruktózy se pohybují okolo 94 až 98 %, resp. 100 % vztaženo na vnesenou glukózu, resp. fruktózu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby kyseliny glukónové ve dle fruktózy v submerzní kultuře *Aspergillus niger* konverzí glukózo-fruktózového sirupu vyznačující se tím, že se spórová suspenze mutanty tohoto kmene N-XI buď zaočkuje do inokulačního tanku, v němž se připraví vegetativní inokulum, kterým se zaočkuje produkční fermentor, nebo se použije přímo na inokulaci produkčního fermentoru a potom se mutanta kultivuje při 25 až 35 °C, hodnotě pH 5,0 až 7,5 v glukózo-fruktózovém roztoku o koncentraci 5 až 40 % hmot. každé z těchto složek, přičemž po skončení kultivace a separaci buněčné

hmoty mikroorganismu se oddělí kyselina glukónová od fruktózy krystalizací.

2. Způsob výroby podle bodu 1 vyznačující se tím, že koncentrace glukózy se v průběhu fermentace udržuje kontinuálním přidavkem koncentrovaného glukózo-fruktózového sirupu v rozmezí od 2 do 5 % hmot.

3. Způsob výroby podle bodu 1 vyznačující se tím, že se po skončení fermentace buněčná hmota mikroorganismu odseparuje od fermentačního média a opakovaně se použije pro konverzi glukózo-fruktózového substrátu.