



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

245107
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/14

(22) Přihlášeno 17 10 83
(21) (PV 7589-83)

(40) Zveřejněno 16 12 85

(45) Vydáno 15 12 87

(75)

Autor vynálezu

ULČ JAROSLAV ing., ČERNICE u Plzně; PAŠEK JAROSLAV;
VALTR ZDENĚK ing.; ČERNÝ VÁCLAV ing., KAZNĚJOV

(54) **Nový kmen houby *Aspergillus niger* CCM-F-749**

1

2

Řešení se týká průmyslového kmene (mutanty) houby druhu (species) *Aspergillus niger* van Thieghem CCM-F-749 s vysokou biochemickou aktivitou, který je schopen zkvašovat melasové substráty připravené běžnými postupy s výtěžkem kyseliny citrónové, který převyšuje produkci kyseliny citrónové při použití dosud užívaných kmenů. Mimo to je schopen s nesníženou aktivitou zkvašovat i vyšší vrstvy a koncentrace kvasného média a z produkovaných kvasných louhů, získaných z kvasného procesu za použití nového kmene, lze získat hotový produkt vyšší kvality a čistoty. Produkční mycelium nového kmene jeví při průmyslové aplikaci vyšší odolnost proti napadení infekční parazitickou houbou rodu *Penicillium*.

Vynález se týká průmyslového kmene (mutanty) houby druhu (species) *Aspergillus niger* van Thieghem s vysokou biochemickou aktivitou, který je schopen zkvašovat melasové substráty připravené běžnými postupy s výtěžkem kyseliny citrónové, který převyšuje produkci kyseliny citrónové při použití dosud užívaných kmenů. Mimo to je schopen s nesníženou aktivitou zkvašovat i vyšší vrstvy a koncentrace kvasného média a z produkovaných kvasných louhů, získaných z kvasného procesu za použití nového kmene, lze získat hotový produkt vyšší kvality a čistoty. Produkční mycelium nového kmene jeví při průmyslové aplikaci vyšší odolnost proti napadení infekční parazitickou houbou rodu *Penicillium*.

Nový kmen produkuje vedle kyseliny citrónové i malé množství kyseliny oxalové v rozmezí 0 až 15 % hmot. na vytvořenou kyselinu citrónovou.

Vedlejší tvorbu kyseliny oxalové možno ovlivnit přípravou a složením kvasného média tak, aby při zachování maximální produkce kyseliny citrónové byla vedlejší tvorba omezena na nezbytné minimum, eventuálně zcela potlačena.

Kmeny *Aspergillus niger*, které se používají při výrobě kyseliny citrónové kvasnou cestou, jsou hodnoceny především z hlediska jejich produktivity, tj. intenzity přeměny nasazené cukerné složky média na žádaný metabolit — kyselinu citrónovou. Dalším předpokladem úspěšného využití zvoleného kmene je možnost získání potřebného množství očkovacího materiálu, tedy dostatečná produkce konidií při kultivaci kmene na vhodné sporulační půdě.

Mezi průmyslově využívanými kmeny jsou význačné rozdíly nejen v intenzitě probíhající biologických procesů (rychlost klíčení, tvorba a charakter myceliární hmoty, metabolická přeměna cukerné složky, tvorba vedlejších kyselin), ale produktivnost kmenů je také výrazně ovlivňována vlastnostmi a složením produkčního média, což se projevuje zvláště u kmenů, které se používají pro kvasné zpracování melasového cukru.

Je známo, že u melas se projevují značné rozdíly jejich vhodnosti pro přípravu produkčního média k výrobě kyseliny citrónové, což je dáno vlivem jejich složení a souvisí s rozdílným obsahem stimulatorů nebo inhibitorů citrónového kvašení. Rozhodující je i způsob přípravy kvasného média, kdy vhodný technologický provozní postup zaručí maximální produkci kyseliny citrónové, odpovídající možnostem použitého kmene.

Obecně lze soudit, že kmeny, které vedle kyseliny citrónové tvoří i vedlejší kyseliny (oxalová, glukonová), jsou méně vhodné a mohou působit potíže při dalším zpracování kvasných louhů na hotový produkt. Rozhodující ale pro posouzení vhodnosti kmene je kritérium produkce kyseliny citrónové.

Pokud jeden kmen s vedlejší tvorbou cizích kyselin převyšuje produkci kmen druhý, který sice vedlejší kyseliny netvoří, ale množství a výtěžnost je nižší, volí výrobce v zásadě kmen zaručující vyšší výrobu kyseliny citrónové a upravenou technologií eliminuje nežádoucí obsah cizích kyselin v prokvašeném substrátu v průběhu jeho zpracování.

Dosud používaný nejlepší produkční kmen L-1 tvoří na melasách zpracovaných provozním technologickým postupem 60 až 70 procent hmot. kyseliny citrónové (podle kvality zpracovávané melasy) počítáno na nasazený cukr. Prodloužením doby kvašení není schopen efektivně bez výrazného snížení výtěžnosti prokvasit vyšší vrstvu kvasného média než 9 cm.

Nový produkční kmen U 47 byl získán mutagenním působením UV světla na parentální kmen H 16. Získaná mutanta N 47 se liší od parentálního kmene H 16 v následujících fyziologických vlastnostech:

a) % výtěžku kyseliny citrónové z pokusů s melasovým substrátem (rozptýl výtěžností podle druhu melasy):

H 16 60 až 70 % hmot. KC na nasazený cukr
U 47 85 až 90 % hmot. KC na nasazený cukr

b) tvorba kyseliny oxalové (% hmotnosti na vytvořenou kyselinu citrónovou):

H 16 15 až 20 % hmot.

U 47 3 až 8 % hmot.

c) hmotnost mycelia bez výraznějšiho rozdílu, mycelium kmene U 47 jeví vysokou odolnost proti infekční houbě *Penicillium*,

d) uvedené parametry jasně prokazují rozdílnost ve fyziologických projevech získané mutanty, které jsou výhodnější pro provozní využití tohoto kmene ve výrobě kyseliny citrónové, především zvýšenou výtěžností kyseliny citrónové a potlačením vedlejší tvorby kyseliny oxalové na přijatelnou úroveň.

Pro pěstování kmene U 47 se osvědčila glycerinová sporulační půda tohoto složení: 125 g glycerinu, 45 g sladového extraktu, 15 g NaCl, 0,5 g NH_4NO_3 , 0,06 g MgSO_4 aq, 0,0015 CuSO_4 aq a 30 g agaru na 1 litr půdy. Po 8 dnech růstu na této půdě při kultivační teplotě 32 °C kmen U 47 vytváří souvislý sporulující porůst kultury s délkou konidioforů 2 až 3 mm, konidiální hlavice středně velká, tmavě zbarvená. Po celém obvodu jsou tvořeny primární sterigmata o délce 20 až 30 μm a od třetího dne dochází na kratších (6 až 10 μm) sekundárních sterigmattech k tvorbě řetězců konidií, které jsou kulovitého tvaru o průměru 3 až 4 μm , hladké, tmavě hnědé barvy až černé barvy.

Po pětidenní kultivaci (32 °C) na stejné půdě se vytváří obří kolonie o průměru 60 až 65 mm s nesporelující okrajovou zónou 3 až 5 mm.

Parentální kmen H 16 za stejných podmínek vytváří delší konidiofory 3 až 4 mm, primární a sekundární sterigmata jsou bez rozdílů proti U 47, vývoj řetězců konidií velikosti 3 až 4 μm je bohatší, barva konidií je tmavohnědá. Starší kultury (od 8. dne) na rozdíl od U 47 jeví sklon k vytváření sterilních druhotných hyf (šedivění kultury).

Obří kolonie u kmene H 16 dosahuje vzhledových a rozměrových parametrů U 47 o 20 až 24 hodin dříve.

Kmen U 47 nevyžaduje speciální přípravu kvasného melasového média a k jeho aplikaci lze použít běžně používaných technologických postupů přípravy (2, 3, 4, 5). Pro

kmen U 47 se osvědčila sporulační glycerinová půda, používaná pro současný provozní kmen L-1.

Všeobecně používaná praxe je srovnávat získaný nový kmen buď s parentálním kmenem, ze kterého byl získán, pro provozní aplikaci a využití je vhodnější srovnání s dosud používaným kmenem ve výrobě.

Nový kmen U 47 předčí produkci kyseliny citrónové jak současný provozní kmen L-1 (o 10 až 15 % hmot. výtěžnosti), tak parentální kmen H 16 za současného snížení vedlejší tvorby kyseliny oxalové. Přednosti kmene U 47 vyplývají z následující tabulky číslo 1.

Kmen	Laboratorní podmínky kvašení		Provozní podmínky kvašení	
	výtěžek KC (% hmot.)	kyselina oxalová/ /kyselina citrónová (% hmot.)	výtěžek KC (% hmot.)	kyselina oxalová/ /kyselina citrónová (% hmot.)
L-1	70,2	0	68,3	0
H-16	65,0	6,4	61,9	17,1
U 47	89,3	2,7	82,8	8,1

Množství vytvořené kyseliny oxalové možno ovlivnit složením kvasného média, např. změnou dávky kyseliny fosforečné, hexakvanoželeznatanu draselného nebo změnou v postupu přípravy melasového média. Kmen pracuje spolehlivě v rozmezí při substrátu 6 až 7 a širokém rozmezí dávek hexakvanoželeznatanu draselného.

Nový kmen je schopen prokvasit melasový substrát s obsahem 14 % hmot. cukru

ve vyšší výšce než obvyklých 9 cm, s vyšší efektivností než současně používaný kmen L-1. Vedle této schopnosti se jeví i jako vhodnější pro zkvašování substrátů s vyšší koncentrací cukru, než je obvyklých 14 % hmot.

Vlastnost nového kmene v průběhu stejné doby kvašení (9 dnů) zkvašovat vyšší vrstvy melasového substrátu vyplývá z výsledků uvedených v tabulce č. 2.

a) Výtěžnost kyseliny citrónové v % hmot.

Výška substrátu (cm)	9	10	11	12
kmen L-1	63,6	61,2	57,0	55,5
kmen U 47	75,1	74,2	68,0	66,0

b) množství vytvořené kyseliny citrónové (g/m² za 1 den)

výška substrátu (cm)	9	10	11	12
kmen L-1	953	1 023	1 053	1 110
kmen U 47	1 126	1 240	1 257	1 320

Na sporulační půdě (4) roste nový produkční kmen U 47 při teplotě 32 až 35 °C velmi dobře a po 8 až 9 dnech kultivace vytváří hustý koberec sporulujícího mycelia s bohatou tvorbou konidií, které lze snadno mechanickým seškrabáním nebo odsátím oddělit. Konidie lze konzervovat buď ve sterilním písku, nebo ve vypraném sterilním karborafinu. V průběhu růstu na začátku kultivace ještě nesporulující mladé myce-

lium je zbarveno žlutým pigmentem, který je secernován i do kultivační půdy.

Konidiofory kmene jsou 2 až 3 mm dlouhé, konidiální hlavice středně velké, černé. Kulaté vesikly nesou paprskovitě po celém obvodu primární sterigmata o délce 20 až 30 μm , na kratších sekundárních sterigmattech (6 až 10 μm) se vytváří řetězce konidií, které jsou kulovité, hladké, tmavě hnědé až černé, o průměru 3 až 4 μm .

Nový produkční kmen CCM-F-749 byl získán mutagenním působením UV světla v dávce 20 000 argů/mm² na spory parentálního kmene. Po provedených selekcích a pro-

dukčních testech monosporických kultur byla získána nejaktivnější mutanta a označena jako kmen U 47.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Nový kmen *Aspergillus niger* van Thieghem CCM-F-749 vhodný pro průmyslovou produkci kyseliny citronové.