



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217928

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 N 1/14

(22) Přihlášeno 08 07 81
(21) (PV 5241-81)

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 12 84

(75)

Autor vynálezu

MUSÍLKOVÁ MARIE RNDr. CSc., SEICHERT LEOPOLD RNDr. CSc.,
UJCOVÁ EMMA RNDr. CSc., SÍKYTA BOHUMIL RNDr. CSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing. DrSc., PRAHA

(54) Produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* CCF 1837 pro
submersní výrobu kyseliny citrónové

Vynález se týká nového produkčního kmene *Aspergillus niger* CCF 1837 pro submersní výrobu kyseliny citrónové. Podstata vynálezu spočívá v tom, že nový kmen dosahuje při submersní fermentaci vysokých výtěžků kyseliny citrónové, které převyšují výtěžky výchozího mateřského kmene a dosahují světových špičkových parametrů.

Výhodou tohoto kmene *Aspergillus niger* 59/34 je, že se odlišuje zbarvením spor jak od výchozího mateřského kmene, tak od většiny kmenů, obvykle používaných pro výrobu kyseliny citrónové. Pro tvorbu kyseliny citrónové je schopen využít nejrozumnější cukerné zdroje, případně jejich směsi.

Vynález se týká nového produkčního kmene mikroorganismu *Aspergillus niger* pro submersní výrobu kyseliny citrónové.

Pro submersní způsob výroby kyseliny citrónové nelze používat produkční kmeny vhodné pro povrchový způsob, ale je nutné vyšlechtit speciální kmeny (AO 196 001, AO 196 002, AO 196 003, AO 201 807). Nové mutanty se obvykle liší morfologicky, dále svými nároky na živiny, na vzdušnost nebo rychlostí tvorby a výší produkce kyseliny citrónové.

Předmětem vynálezu je nový produkční kmen plísňe *Aspergillus niger* 59/34 pro submersní výrobu kyseliny citrónové, uložený v mezinárodní sbírce mikroorganismů GCF č. 182 pod číslem 1837.

Dále je uvedena morfologická a fyziologická charakteristika mutantu *Aspergillus niger* 59/34 (Thom. Ch., Raper, K. B.: A manual of the Aspergilli, Baltimore, 1945).

Mutant *Aspergillus niger* vytváří na sladidlovém agaru kolonie o průměru asi 4 cm s mírně zvrásněným středem. Sporulace je bohatá, spory jsou tmavě skořicově zbarveny. Spodní strana kolonií je bílá. Na Raulinově agaru jsou kolonie menší - průměr 2,5 cm, střed kolonií je bez sporulace mírně zvrásnělý, jinak kolonie rovněž bohatě sporuluje, barva spor je skořicová. Na sporulačním agaru s pivem se tvoří 2,5 cm kolonie, mycelium má tvar drobných jehliček nejprve bez sporulace, později se tvoří hnědé spory. Na Czapekově agaru se tvoří kolonie o průměru 2,5 cm, silně zvrásnělé, spodní strana je citrónově žlutá, sporulace je řídká, skořicově hnědá.

Mikroskopický vzhled: Spory jsou skořicové, chlupaté, v průměru 2,5 až 3,5 μ , konidiofory 0,6 až 0,8 mm vysoké, hlavičky kulaté o průměru 0,1 mm.

Při submersní fermentaci na syntetické půdě s 10 až 20 % cukerných substrátech tvoří 65 až 85 % kyseliny citrónové (počítáno na vnesený cukr).

Mutant *Aspergillus niger* byl získán působením ultrafialového záření na suspenzi spor (přibl. 10^6 /1 ml) kmene *Aspergillus niger* S 59 o intenzitě 5,9 J/m² po dobu 4 minut. Ozářená naředěná suspenze spor (10^6 až 10^7 spor v 1 ml suspenze) byla vylévána na sporulační agarovou půdu a jednotlivé izoláty byly hodnoceny podle svého růstu, sporulace a tvorby kyseliny citrónové.

Vysokoprodukční mutant *Aspergillus niger* 59/34 podle vynálezu se zcela odlišuje od mateřského kmene i příbuzných kmenů *Aspergillus niger*, a to zabarvením spor a mikroskopickou morfologií při zachování vysokých výtěžků kyseliny citrónové.

P ř í k l a d

Inokulační půda (složení: 14 % glukosy, 0,25 % NH_4NO_3 , 0,025 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,1 % rozpustného škrobu, 0,0001 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,0002 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,00056 % FeCO_3) byla očkovaná suspenzí spor kmene *Aspergillus niger* 59/34 nebo mateřským kmenem *Aspergillus niger* S 59 (1 ml na 50 ml média) která obsahovala 2 až $5 \cdot 10^7$ spor/1 ml.

Inokula rostla 48 hodin při 30 °C v 300 ml Erlenmeyerových baňkách na rotační třepačce a pak byla použita k očkování 1 l produkčního média ve 3 l laboratorním skleněném tanku. Produkční médium obsahovala 15 % glukosy, 0,08 % NH_4Cl , 0,1 % močoviny, 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,016 % KH_2PO_4 , 0,007 % KCl , 0,002 % $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,001 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,001 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. Množství inokula 5 %, teplota 30 °C, otáčky míchadla 800/min, vzdušnost 0,5 l/min. K odpěňování byl používán sójový olej. Doba fermentace 7 dní. Výtěžek kyseliny citrónové vztahený na vnesený cukr byl u kmene *Aspergillus niger* 59/34 78 %, u kmene *Aspergillus niger* S 59 67 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Produkční kmen mikroorganismu *Aspergillus niger* CCF 1837 pro submersní výrobu kyseliny citronové.