



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 636

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 14 08 79
(21) PV 5567-79

(51) Int. Cl.³ C 12 P 7/48

(40) Zveřejněno 30 04 80
(45) Vydáno 01 06 83

(75) Autor vynálezu	LOZINOV ALEXANDR BORISOVIČ FINOGENOVA TATJANA VASILJEVNA, MOSKVA ŠIŠKANOVA NADĚŽDA VASILJEVNA, PUŠKINO MOSKOVSKOJ OBLASTI ILLARIJONOVA VALENTINA IVANOVNA, MOSKVA	KARKLINŠ ROMAN JANOVIČ PELCMANE INTA ŽANOVA RAMINJA LIDIA OSKAROVNA LUKA VITA TEODOROVNA KESTERIS BIRUTA JANOVA, RIGA (SSSR)
------------------------	---	--

(54) Způsob výroby kyseliny citronové

1

Vynález se týká způsobu výroby kyseliny citronové.

Dosud se převážná část výroby kyseliny citronové spotřebovávala ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. V poslední době se počalo používat kyseliny citronové a jejích soli rovněž v chemickém průmyslu k výrobě povrchově aktivních látek a pracích prostředků. Nedávno bylo zjištěno, že je možno kyselinu citronovou využít k odstraňování síry z odpadních plynů, a tím čistit prostředí od nečistot.

Jsou známy způsoby výrob kyseliny citronové kultivací mikroorganismů různých taxonomických skupin na médiích s normálními parafíny, popsané například v britských patentech č. 1 187 610 a 1 203 006 a ve francouzských patentech č. 1 573 655, 2 029 689 a 2 078 979.

Nejčastěji se jako producentu používá kvasnic druhu *Candida lipolytica*, jak je uvedeno například ve francouzském patentu č. 2 003 199, v britských patentech č. 1 380 938 a 1 381 047 přihlašovatele Hitachi, ve francouzských patentech č. 2 207 187 přihlašovatele Mitsui Petrochemical Industry a 2 028 886 a 2 078 979 přihlašovatele Takeda Chemical Industry. Dále potom v britském patentu č. 1 353 480, americkém patentu č. 3 801 455 a v britských patentech č. 1 203 006 a 1 285 687 přihlašovatele Pfizera, v sovětských patentech č. 448 652 a 493 979 a ve francouzských patentech č. 2 208 980, 2 209 840, 2 249 950 a 2 271 287 přihlašovatelů ERAP a Inst. Franc. du Pétrole.

202 838

Největšího výtěžku kyseliny citronové se dosáhlo podle sovětského patentu č. 448 652 u firmy Pfizer. Podle tohoto vynálezu se použilo kmene *Candida lipolytica* ATCC č. 20.228, produkujícího kyselinu citronovou při kultivaci v živném médiu, které obsahovalo jako zdroj uhlíku n-alkany a rovněž zdroj dusíku a minerální soli.

Jako výtěžku fermentace se dosáhlo koncentrace kyseliny citronové v množství 225 g na 10^6 mm³ fermentačního bujónu, počítáno na monohydrát. Výtěžek této kyseliny, počítáno na hmotnost vnesených n-alkanů, činil 125 %. Zpravidla se výtěžek vypočítával na bezvodou kyselinu citronovou. V takovém případě činila koncentrace bezvodé kyseliny citronové 205 g na 10^6 mm³ média a výtěžek kyseliny citronové činil 113,9 % hmotnostních. Přesto tento známý způsob výroby žádnou skutečně vynikající výtěžnost kyseliny neznamenal.

Úkolem vynálezu bylo vyvinout takový způsob výroby kyseliny citronové, který by umožnil zvýšit současně koncentraci a výtěžek konečného produktu vhodným výběrem odpovídajícího producentu a jeho fermentací za určitých stanovených podmínek.

Úkol byl vyřešen a nedostatky dosavadních známých způsobů výroby byly odstraněny u způsobu výroby kyseliny citronové fermentací produkčních kmenů druhu *Candida lipolytica* na živném médiu, obsahujícím n-alkany jako zdroj uhlíku, a za provzdušňování, podle vynálezu, jehož podstatu spočívá v tom, že jako produkčního kmene se použije kmen *Candida lipolytica*, deponovaného pod číslem CMFM U-184, a fermentace probíhá při hodnotě pH nejvýše 8,0.

Výhodným je provádět fermentaci při koncentraci kyslíku v médiu v rozmezí od 50 do 90 % nasycení a když kultivace probíhá při hodnotě pH od 5,0 do 7,0. Rovněž je výhodné, když alespoň jeden z použitých n-alkanů má 12 až 19 atomů uhlíku.

Použití daného kmene *Candida lipolytica* CMFM U-184 a provádění fermentace za uvedené hodnoty pH umožňuje zvýšení výtěžku konečného produktu - kyseliny citronové - o 33 % ve srovnání s výtěžkem, dosaženým způsobem podle sovětského patentu č. 448 652.

Kmen používaný při způsobu podle vynálezu se liší od ostatních kmenů vysokou stabilitou v tvorbě prakticky pouze kyseliny citronové, neboť poměr citrátu k isocitrátu je 31 : 1. Tím se významně usnadňuje izolace kyseliny citronové z fermentačního roztoku.

Způsobem podle vynálezu se umožňuje nepoužívat jako výchozí látky pro výrobu kyseliny citronové potravinářské suroviny, nýbrž n-alkany, a to s výtěžkem, předstihujícím známé výsledky. Rovněž výrobní náklady na výrobu kyseliny citronové podle vynálezu jsou podstatně nižší, než například při výrobě z melasy.

Způsob podle vynálezu se provádí následovně. Kvasnice *Candida lipolytica* CMFM U-184 se kultivovaly na živném médiu, obsahujícím zdroj dusíku, zdroj fosforu a další soli. Jako zdroje uhlíku se použilo alespoň jednoho alkanu s 12 až 19 atomy uhlíku. Do živného média byla přidána směs stopových prvků kvasnicový autolysát jako zdroj vitamínů. Kultivace se prováděla za provzdušňování při koncentraci kyslíku v médiu od 50 do 90 % nasycení

a při hodnotě pH nejvýše 8,0 po dobu 84 až 144 hodin a při teplotě od 28 do 30 °C.

Očkovací látka byla připravena následujícím způsobem. *Candida lipolytica* CMPM U-184, množená po 3 dny na širokém agaru, byla ve formě suspenze přenesena do živného roztoku a po 48 hodinové inkubaci v kádích na třepačce s 200 ot/min a při teplotě 28 až 30 °C byla použita pro naočkování fermentačního média.

Jako výsledek fermentace bylo dosaženo koncentrace kyseliny citronové v množství 237,3 g na 10^6 mm^3 fermentačního bujónu, počítáno na monohydrát. Výtěžek kyseliny citronové, počítáno na nasazené n-alkany, činil 158 % hmotnostních.

Kmen *Candida lipolytica* CMPM U-184 byl získán působením nitrosomethylmočoviny na buňky *Candida lipolytica* IBFM U-160 (704) a následnou selekcí. Mutační kmen byl deponován 1. února 1978 a je uchován v Muzeu kultur průmyslových mikroorganismů Institutu WNII Genetika.

Kmen *Candida lipolytica* CMPM U-184 má následující charakteristiku.

Mladá kultura má tekuté a agarisované mladiny má okrouhlé oválné a poněkud protáhlé buňky o velikosti 2,0 - 5,0 x 3,0 - 10,0 μm a rovněž řetězce ze 3 až 4 buněk.

Při růstu na tekuté mladiny při teplotě 25 °C se vytváří 8. dne na povrchu média tenký film a na dně zkumavky malá sraženina. 15. a 16. dne se tloušťka filmu zvětšuje a rovněž sraženina.

Kolonie na mladinovém agaru, starém 10 dnů, jsou bílokrémově zbarveny, v rovině, matné, vyklenuté, střed kolonie je mírně vyvýšen, okraje jsou hladké. Obří kolonie jsou krémové barvy, na okraji žlutozelená, trochu vrásčitá, plochá, střed je zvednut, okraje jsou mírně lopatovité.

Čárový růst je plochý, rovný, matný, krémové barvy, okraje jsou hladké.

Kultura na skle na bramborovém agaru. Pseudomycelium je slabě vyvinuto, silně aerobní. Nezkvasuje cukr, asimiluje glukózu, ethanol, acetát, glycerin. Na galaktóze byl zaznamenán slabý růst.

Neasimiluje laktózu, maltózu, sacharózu, rafinózu, arabinózu, xylózu a škrob.

Jako zdroje dusíku bylo použito $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a NH_4Cl . Neroste na nitrátech. Plně peptonizuje mléko.

Optimální teplota pro růst je 26 až 30 °C, maximální 33 °C.

Uchovává se na agarisovaném médiu podle Riedra s parafinem a ampulích v lyofilisovaném stavu.

Popsaný kmen *Candida lipolytica* CMPM U-184 se vyznačuje schopností, že při růstu na živných s n-alkany produkuje především pouze samotnou kyselinu citronovou a prakticky

282 838

žádnou kyselinu isocitronovou.

Aby se stabilita mutantu *Candida lipolytica* CMPM U-184 uchovala, přeočkovala se během 4 měsíců na čerstvé médium s parafinem - kultovace v bankách na třepáku -, celkem bylo provedeno 40 za sebou následujících pasáží. Během většiny operací nepozbyla kultura schopnost produkovat zejména citrát. Naproti tomu se poměr citrátu k isocitrátu v médiu posunul ještě více na stranu žádané tvorby citrátu.

Uložení mutačního kmene po dobu 6 let na agarisovaném médiu rovněž nezhoršilo vlastnosti této kultury.

Při všech zkouškách zůstala stabilní a z praktického hlediska důležitá hlavní vlastnost mutačního kmene *Candida lipolytica* CMPM U-184, výhodná syntéza citrátu na médiích s n-alkany.

Vynález je dále blíže popsán na konkrétních příkladech způsobu výroby kyseliny citronové.

Příklad 1

Kvasnice *Candida lipolytica* CMPM U-184 byly udržovány konstantní na agarisovaném minerálním médiu podle Readera s normálními alkany s počtem uhlíků 12 až 19. Složení média v g na 10^6 mm^3 činilo:

normální alkany C_{12} až C_{19}	10,0
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	3,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,7
NaCl	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,4
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	0,1
kvasný autolysát	$2 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$
sada mikroprvků podle Burkholdera	
agar-agar	25,0.

Sada mikroprvků podle Burkholdera zahrnuje následující složky v mg na 10^6 mm^3 média. KJ-0,1; B-0,01; Mn^{2+} -0,01; Zn^{2+} -0,01; Cu^{2+} -0,01; Mo^{6+} -0,01; Fe^{2+} -0,05.

Kvasnice se kultivovaly na šikmém agaru po dobu 3 dnů při teplotě 28 až 30 °C. Suspenze buněk byla přenesena z agarisovaného média do buněk o objemu $250 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$, obsahujících $50 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$ očkovacího média.

Médium k získání očkovacího materiálu a k provedení fermentace mělo následující složení v hmotnostních procentech.

n-hexadekan (C_{16})	0,8
$(NH_4)_2 SO_4$	0,03
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,07
NaCl	0,05
$Ca(NO_3)_2$	0,04
KH_2PO_4	0,1
K_2HPO_4	0,01
kvasný autolysát	$2 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$
směs mikroprvků podle Burkholdera.	

Baňky byly třepány v třepačce s 200 ot/min po dobu 48 hodin. Získaný očkovací materiál byl dán v množství 5 % do fermentačního média.

Fermentace se prováděla po dobu 5 dnů v baňkách o objemu $250 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$ vždy s $50 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$ média a při různých hodnotách pH média od 3,0 do 8,0. Potřebná hodnota pH byla udržována konstantní přidáváním sterilních roztoků NaOH a H_2SO_4 .

Získané výsledky možno zhodnotit podle následující tabulky I.

Tabulka I

Hodnota pH média	Kyselina citronová $g/10^6 \text{ mm}^3$	Kyselina isocitronová $g/10^6 \text{ mm}^3$	Výtažek kyseliny citronové, vztaženo na hmotnost vnese- ného alkanu v % hmotnostních
3,0	stopy	0	-
4,0	3,7	0,4	46,3
5,0	9,3	1,0	116,3
6,0	12,4	1,4	155,0
7,0	11,3	1,3	141,3
8,0	10,5	1,2	131,3

Příklad 2

Kvasnice se pomnožovaly na šikmém agaru, obdobně jak je uvedeno v příkladě 1. Suspenze buněk se s agarisovaným médiem přenesla do baňky o objemu $750 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$, kde bylo $50 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$ očkovacího média následujícího složení v $g/10^6 \text{ mm}^3$

normální alkany (C_{12} až C_{19})	24,0
$(NH_4)_2 SO_4$	1,2
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,7
NaCl	0,5
$Ca(NO_3)_2$	0,4

202 638

KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	0,1
kvasný autolysát	$2 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$
směs mikroprvků podle Burkholdera.	

Kultivace se prováděla po dobu 72 hodin v třepačce o 200 ot/min při teplotě 28 až 30 °C. Do fermentační nádoby se vpravilo $0,5 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$ oškovací kultury.

Fermentace probíhala v přístroji o zdvihovém objemu $5 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$, obsahujícím $4,5 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$ hlavního média následujícího složení v $\text{g}/10^6 \text{ mm}^3$.

normální alkany (C_{12} až C_{19})	72,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,9
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,4
NaCl	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,8
KH_2PO_4	2,0
K_2HPO_4	0,2
kvasný autolysát	$2 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$
směs mikroprvků podle Burkholdera	dvojnásobné množství.

Hodnota pH média byla udržována konstantní na 5,5 až 6,5 přidáváním 10 %ního roztoku NaOH .

Koncentrace kyslíku - 25 %, 50 % a 75 až 90 % nasycení - se udržovala konstantní na stále úrovni od počátku až do konce fermentačního procesu, čehož se dosáhlo změnou rychlosti otáček třepačky a objemu vzduchu, zaváděného do fermentační nádoby za jednotku času.

V následující tabulce II jsou uvedeny výsledky maximálního obohacení kyselin podle nasycení média kyslíkem.

Tabulka II

% nasycení média kyslíkem	Doba fermentace v hodinách	Kyselina citronová $\text{g}/10^6 \text{ mm}^3$	Kyselina isocitronová $\text{g}/10^6 \text{ mm}^3$	Výtěžek kyseliny citronové, vztáže- no na použitý parafin % hmot.
25	108	40,6	3,0	56,4
50	108	48,0	4,0	66,6
75 až 90	84	81,0	7,5	112,5

Příklad 3

Kvasnice byly množeny na šikmém agaru po dobu 3 dnů při teplotě 28 až 30 °C. Suspenze buněk byla přenesena do banky o objemu $750 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$ s $50 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$ očkovacího média.

Složení očkovacího média v $\text{g}/10^6 \text{ mm}^3$:

normální alkany (C_{12} až C_{19})	48,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,7
NaCl	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,4
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	0,1
kvasný autolysát	$4,0 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$
směs mikroprvků podle Burkholdera.	

Po 48 hodinové inkubaci v třepáku byla získána očkovací kultura přenesena do nové sady baněk s očkovacím médiem. Objem inokula činil 6 %, počítáno na objem média.

Druhá sada baněk byla rovněž umístěna na třepák a kultivována při teplotě 28 až 30 °C po dobu 50 hodin. Hodnota pH média byla udržována konstantní na 6,0 až 6,5 přidáváním sterilního 10 %ního roztoku NaOH .

$500 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$ vzrostlé kultury bylo přeneseno do fermentačního média. Objem média činil $3,5 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$.

Složení fermentačního média v gramech:

normální alkany (C_{12} až C_{19})	600,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,8
NaCl	1,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,6
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	0,4
kvasný autolysát	$8,0 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$
směs mikroprvků podle Burkholdera.	

Fermentace se prováděla ve fermentačním aparátě o obsahu 10^6 mm^3 , při teplotě 29 až 30 °C, za intenzivního míchání a provzdušňování. Hodnota pH média byla udržována konstantní na 6,0 až 6,5 přiváděním roztoku NaOH .

Po 144 hodinové kultivaci bylo dosaženo koncentrace kyseliny citronové $217 \text{ g}/10^6 \text{ mm}^3$. Současně se vytvořila v médiu kyselina isocitronová v koncentraci $6 \text{ g}/10^6 \text{ mm}^3$.

202 838

Celkový obsah bezvodé kyseliny citronové v aparatuře činil 868 g nebo 949,2 mono-hydrátu. Výtěžek bezvodé kyseliny citronové, počítáno hmotnostně, činil 145 % a monohydrátu 158 %, vztaženo na nasazené n-alkany.

Příklad 4

Očkovací materiál, připravený obdobně jako v příkladě 3, byl pěstován postupně ve fermentačních tancích o objemu $63 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$ a $400 \cdot 10^6 \text{ mm}^3$ na médiu následujícího složení v $\text{g}/10^6 \text{ mm}^3$.

normální alkany (C_{12} až C_{19})	48,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,7
NaCl	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,4
KH_2PO_4	1,0
K_2HPO_4	0,1
kvasný autolysát	$2,0 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$
směs mikroprvků podle Burkholdera.	

Doba fermentačního procesu v každém tanku činila 48 hodin při teplotě 28 až 30 °C a při hodnotě pH od 5,0 do 5,5.

Hlavní fermentace potom proběhla v tanku o objemu $3,0 \text{ m}^3$. Koeficient naplnění aparátu byl 0,6. Očkovací materiál byl vnesen do fermentačního tanku v množství 10 %, počítáno na objem média.

Složení fermentačního média v $\text{g}/10^6 \text{ mm}^3$:

normální alkany (C_{12} až C_{19})	100,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,4
NaCl	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,8
KH_2PO_4	2,0
K_2HPO_4	0,2
kvasný autolysát	$4,0 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$
směs mikroprvků podle Burkholdera.	

Fermentace proběhla při teplotě 28 až 30 °C. Hodnota pH média byla udržována konstantní na 5,6 až 6,0 přidáváním sterilního 20 %ního roztoku NaOH .

Koncentrace kyslíku ve fermentačním médiu byla udržována konstantní na 50 až 80 % nasycení.

Během fermentačního procesu byly 2. a 4. dne v odstupu 24 hodin přidány do fermentačního média normální alkany, přičemž každá část činila 2 %, počítáno na objem média.

Hlavní fermentace trvala 120 hodin. Na konci fermentace činil celkový obsah kyseliny citronové v aparatuře 368 kg. Výtěžek fermentace na bezvodé kyselině citronové byl 128 %, počítáno na hmotnost nasazených parafinů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby kyseliny citronové fermentací produkčních kmenů druhu *Candida lipolytica* na živném médiu, obsahujícím n-alkany jako zdroj uhlíku, a za provzdušňování, vyznačující se tím, že se jako produkčního kmene použije kmene *Candida lipolytica*, deponovaného pod číslem CPM U-184, a fermentace probíhá při hodnotě pH nejvýše 8,0.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že fermentace probíhá při koncentraci kyslíku v médiu v rozmezí od 50 do 90 % nasycení.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že kultivace probíhá při hodnotě pH od 5,0 do 7,0.
4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použije alespoň jeden z n-alkanů s počtem uhlíků od 12 do 19.