

Vliv acidity fermentačního média na tvorbu kyseliny itakonové při kultivaci plísně *Aspergillus terreus*

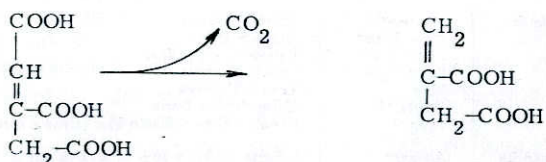
582.282.123.4
663.15:547.462.3

Ing. MOJMÍR RYCHTERA, CSc., katedra kvasné chemie a technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha
Do redakce došlo 20. září 1976

K řadě organických kyselin vyráběných fermentačním způsobem patří, i když jen z části, kyselina itakonová. Jako mikrobiální produkt byla poprvé izolována v roce 1937 *Kinositou* [1] z kultur *Aspergillus itaconicus* a později *Calamem* [2] z glukózových médií, na kterých byly kultivovány některé kmeny *Aspergillus terreus*. Stejně jako u jiných organických kyselin se i v našem případě kladně projevuje konkurence se syntetickou přípravou této kyseliny a vede k systematickému výběru vhodných produkčních kmenů, k optimalizaci fermentačních podmínek a složení fermentačního média. Význam této látky neustále stoupá a s tím souvisí i vzrůstající světová produkce. Její použití je ponejvíce omezeno na oblast chemického průmyslu, např. při výrobě povrchově aktivních látek, ionexů, fungicidů, insekticidů, syntetických mazacích prostředků, syntetických vláken apod. V oboru výroby syntetických vláken se využívá i schopnosti kyseliny itakonové zlepšit procesy barvení vláken. Kromě toho našla uplatnění jako anti-statická složka syntetických vláken. Vlastnosti kyseliny a některých jejích derivátů urychlit biologické procesy při vzniku květů některých rostlin lze rovněž v praxi výhodně využít [3]. Některé kmeny *A. terreus* tvoří kromě kyseliny itakonové i značná množství celulytických enzymů, popřípadě i xylanázu [4].

Výchozí surovinou pro fermentační výrobu kyseliny itakonové je glukóza, sacharóza nebo i přirozená média, např. melasa. Použití pentóz, resp. sulfidových výluhů je rovněž možné, ale je podmíněno zvláštními kmeny *A. terreus*, které by pentózy přeměnily na kyselinu itakonovou [5].

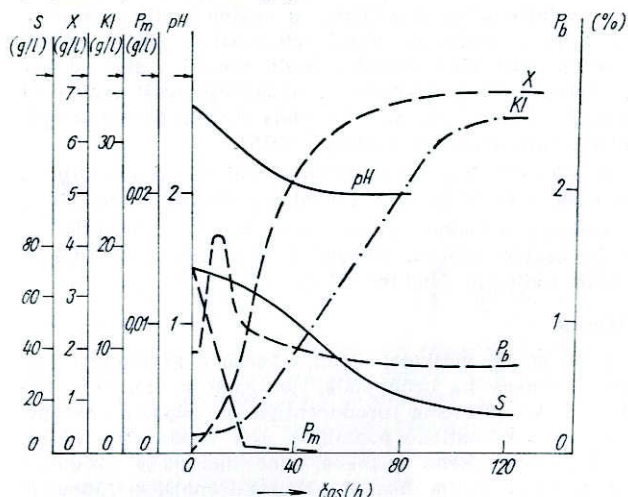
Z biochemického hlediska představuje kyselina itakonová metabolit vznikající změnou dráhy v cyklu kyseliny citrónové, tj. dekarboxylací kyseliny cis-akonitové:



Znamená to regulaci mechanismu reakce kyselina cis-akonitová → kyselina izocitrónová. *Nowakowska* [6] studovala proto vliv některých intermediátů cyklu kyseliny citrónové a na základě četných pokusů se domnívá, že syntéza kyseliny itakonové v *Aspergillus terreus* neprobíhá v cyklu trikarbonových kyselin.

Kultivaci plísně *A. terreus* k produkci kyseliny itakonové lze provést jak povrchovým, tak i submerzním způsobem. Většina autorů se shoduje v názoru [7, 8], že obsah fosfátů je limitujícím faktorem zmíněného metabolismu, větší množství způsobuje pokles výtěžnosti produktu. Železo v jakékoliv koncentraci inhibuje produkci kyseliny, zinek a měď ve stopových koncentracích působí na vznik produktu příznivě. Ze znalostí vli-

vu stopových prvků se podařilo zjednodušit složení média, především eliminací peptonu a corn-steepu. *Nakamura et al.* [9] zjistili, že např. kyseliny mravenčí a octové při nízkých koncentracích zvyšují růst plísně, stejně tak i kyselina trans-akonitová. S tím je však spojen pokles výtěžnosti kyseliny. Koncentrace uhlíkatého zdroje se v uváděné literatuře mění v širokém rozmezí 3 až 15 %, v závislosti na použité kultuře *A. terreus* a způsobu fermentace. Hořečnaté ionty zvyšují toleranci plísně k vyšší aciditě [10]. Optimum teploty pro produkci kyseliny itakonové bylo ve většině případů zjištěno 36 °C [8].



Obr. 1. Časový průběh kultivace plísně při pH 2,7

Při plísňových submerzních kultivacích se setkáme za určitých podmínek s kuličkovými formami [11] plísně, které obsahují shluky hyf pevně navzájem spojených. Zdá se, jako by vlákna vycházela ze středu globule a obklopují menší či větší mezprostory vyplněné médiem. Vznik těchto forem závisí na velikosti inokula, přičemž jejich výskyt je větší za nepříznivých podmínek, dále na pH, intenzitě míchání, obsahu stopových prvků aj. Fyzikální faktory ovlivní rovněž jejich tvorbu, např. velikost a tvar kultivačních nádob, viskozita a obsah povrchově aktivních látek. Pro průmyslová měřítka se jeví tato forma až do průměru 0,5 mm daleko výhodnější než disperzní mycelium, např. pro produkci kyseliny citrónové [12]. Výhody lze vidět v těchto bodech: 1. odstraní se nevýhody plynoucí z ulpívání mycelia na míchadle a na stěnách fermentoru, což iniciuje stěnový růst. 2. Větrání média je snadnější, neboť i viskozita je nižší a současně i rychlost spotřeby kyslíku obvykle poklesne. Z tohoto důvodu je možné použít vyšších otáček, aniž by se mycelární kuličky poškodily. Je-li plíseň ve formě disperzního mycelia, příliš vysoké otáčky míchadla způsobí nežádoucí morfologické a tím i fyziologické změny spojené s porušením vláken mikroorga-

nismu, což i v našem případě vede k poklesu produkce kyseliny. 3. Lepší oddělování mikroorganismu z fermentačního média. V případě kyseliny citrónové je fermentace v globulární formě mikroorganismu spojena i s vyššími výtěžky. Ve větších globulích však vzniká uvnitř nedostatek živin, především kyslíku a s tím je spojena i nižší růstová rychlost. Jestliže dojde k tomuto jevu, potom se to někdy projeví změnou metabolismu ve vnitřní části globule, popřípadě i lyzí vláken.

Ve své práci s plísní *Aspergillus terreus* NRRL 1960 (ze sbírky mikroorganismů v Kew) jsme se zabývali vlivem pH na chování kultury při jednorázové („batch“) a kontinuální kultivaci.

pH se za určitých podmínek může projevit:

- tvorbou kuličkových forem,
- stěnovým růstem,
- vznikem vedlejších metabolitů, např. kyseliny jablčné, jantarové, fumarové apod.,
- růstem mikroorganismu s proměnlivou produkcí kyseliny itakonové.

Literatura se v této otázce značně rozchází [13, 14, 15, 7]. Zjištěné rozdíly jsou způsobeny především použitým kmenem a dále složením média a projeví se pozitivní nebo negativní odezvou mikroorganismu na úpravu pH.

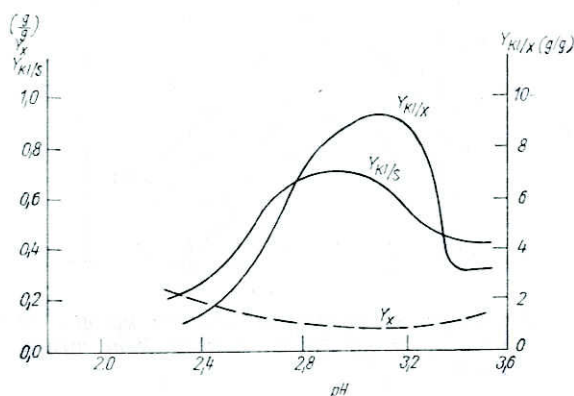
Při práci s kmenem *A. terreus* NRRL 1960 jsme vyšli z navržené syntetické půdy [8], která obsahovala síran amonný, síran hořečnatý, stopové množství síranu měďnatého, fosforečnan draselný, malé množství kyseliny itakonové a deionizovanou vodu. Částečná optimalizace složení média byla provedena třífaktorovou analýzou [16] z hlediska nejdůležitějších parametrů: obsahu fosfátu, pH a koncentrace glukózy. Výsledkem je toto koncentrační rozmezí:

fosfor . . . 6 — 16 mg.l⁻¹,
glukóza . . . 25 — 43 g.l⁻¹,
a počáteční pH . . . 2,8 — 3,1.

Regulace pH při jednorázové kultivaci se projevila ve všech případech negativně, především však v první polovině trvání procesu. Celková doba fermentace se pohybovala v závislosti na podmínkách od 90 do 120 hodin. Horní hranice pro pH byla určena vznikem kuličkových tvarů o průměru větším než 1 mm, které se objevují ve větším měřítku nad pH 3,3.

Za podmínek, kdy převažuje tato forma mikroorganismu, tvoří se málo produktu. Velikost kuliček roste s rostoucím pH a současně roste i množství mikroorganismu na stěnách fermentoru, na míchadle apod. [17]. Kromě toho se tvoří při kultivaci, kdy počáteční pH je větší než 3,3, větší množství nežádoucích metabolitů, z nichž některé způsobují tmavnutí fermentačního média [18].

Vliv pH na tvorbu kyseliny itakonové patří mezi nejvýznamnější faktory. Jelikož tvorba produktu je prakticky spojena s růstem mikroorganismu (s malým zpožděním produkční fáze), je nutné, aby i počáteční pH odpovídalo jeho požadavkům. Je-li pH nízké, nestačí se vytvořit dostatečné množství plísňe. Především však je nutno zdůraznit, že její schopnost tvořit kyselinu klesá s klesajícím pH. Počáteční fáze fermentace je charakterizována rychlou spotřebou fosforu, když mikroorganismus roste, avšak produkt se začne tvořit prakticky po vyčerpání fosforu z média. Tato reakce byla ve všech případech charakterizována konstantní rychlostí tvorby (reakce nultého řádu). S tím souvisí i velmi prudký pokles pH. Tato oblast je pro další průběh závažná a pH nesmí být proto upravováno. Prudký pokles pH se zastaví v závislosti na počáteční hodnotě pH. Tento



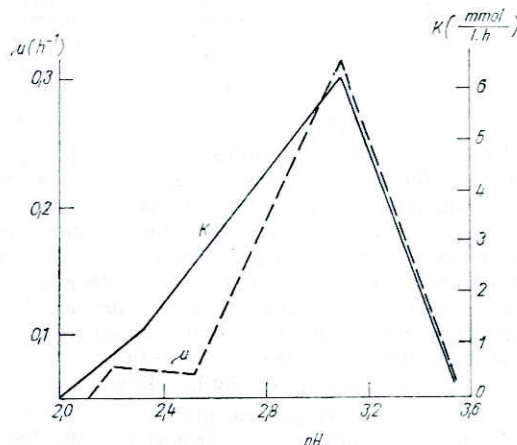
Obr. 2. Závislost výtěžnostních koeficientů na pH (jednorázový systém „batch“)

bod je pro fermentaci charakteristický a má hodnotu 2,1 až 2,3, do této doby se od začátku vytvoří podle okolností jen 5 až 20 % celkové kyseliny. Při tomto pH se plíseň dostává do stacionární fáze růstu, ale produkce kyseliny pokračuje stejnou rychlostí dále. Konečné pH je 1,8—1,9. Průběh fermentace je znázorněn na obr. 1 (pH 2,7). Obrázek 2 ukazuje závislost výtěžnosti kyseliny itakonové

$$Y_{KI/S} = \frac{\text{přírůstek produktu}}{\text{úbytek substrátu}}, \text{ výtěžnosti plísňe } Y_X = \frac{\text{přírůstek plísňe}}{\text{úbytek substrátu}}$$

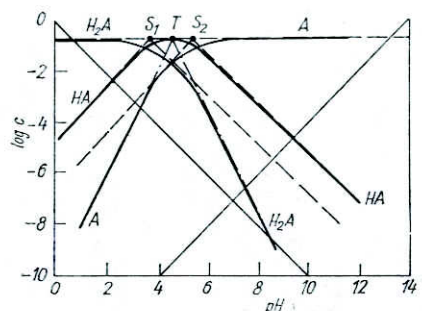
a výtěžnosti kyseliny, vztažené na jednotku narostlého mikroorganismu ($Y_{KI/X} = Y_{KI}/Y_X$) na pH. Obrázek 3 znázorňuje závislost hlavních kinetických parametrů, tj. rychlostního koeficientu tvorby kyseliny $K = dKI/dt$ a specifické růstové rychlosti $\mu = 1/X \cdot dX/dt$ na pH.

Z těchto závislostí je jasné vidět, že pH 3—3,1 jsou optimální jak pro výtěžnost kyseliny, tak pro rychlost vlastní reakce. Růst plísňe je limitován nejen pH, ale především množstvím fosforu [19]. Maximum pro výtěžnost plísňe neleží ve zkoumaném rozmezí pH.



Obr. 3. Závislost kinetických parametrů fermentace na pH (jednorázový systém „batch“)

Kyselina itakonová je dvojsytná kyselina o disociačních konstantách $k_{21} = 1,40 \cdot 10^{-4}$ a $k_{11} = 3,56 \cdot 10^{-6}$, kterou lze srovnat z hlediska její síly s kyselinou citrónovou ($k_{31} = 3,25 \cdot 10^{-4}$, $k_{21} = 2,65 \cdot 10^{-5}$ a $k_{11} = 1,48 \cdot 10^{-6}$). Koncentrace jednotlivých forem kyseliny itakonové jsou dány pH roztoku a koncentrací celkové kyseliny. Pokud jde o roztok kyseliny v destilované vodě, závisí jeho pH na koncentraci kyseliny. Velmi názorně vyjadřuje tento acidobázický systém obr. 4.



Obr. 4. Vliv pH na rovnovážný systém: kyselina itakonová — voda, 25 °C, celková koncentrace 0,2 mol/l

Průběhy závislosti byly odvozeny ze soustavy rovnic popisujících protolytické rovnováhy systému kyselina itakonová — voda. Přímka procházející počátkem o směrnici -1 vyjadřuje obecný vztah $\log [H^+] = -pH$. Podobně je konstruována i druhá základní přímka $\log [OH^-] = pH - pK_v$, kde K_v je iontový součin vody. Body S_1 , S_2 , resp. jejich souřadnice na ose pH, odpovídají hodnotám pK_{21} a pK_{11} . Z nich vycházejí přímky o směrnících $+1$ a -1 , které představují limitní případy. Z bodu T [$1/2(pK_{21} + pK_{11})$, $\log c_{H_2A}$] vycházejí přímky o směrnících $+2$ a -2 . V oblasti $pH = S_1 \pm 1,3$ a $S_2 \pm 1,3$ neplatí aproximační vztahy a závislost $\log [X] = f(pH)$ musí být znázorněna křivkou. Podobně, je-li pK menší 3,2 (náš případ), je nutno křivky v rozmezí $pH = pK_{21}$ až pK_{11} konstruovat použitím hodnot vypočtených z rovnic [20]. Průsečík 1 křivek $\log [HA]$ a $\log [H^+]$ udává na ose souřadnic hodnotu pH čisté kyseliny, c označuje koncentraci jakékoli formy kyseliny.

Tabulka 1

pH	Forma kyseliny itakonové	Celková koncentrace kyseliny (mol.l ⁻¹)	
		0,04 (± 5 g.l ⁻¹)	0,1 (13 g.l ⁻¹)
3,5	H ₂ A	0,0220	0,0600
	HA	0,0160	0,0400
	A	0,0002	0,0005
1,7	H ₂ A	0,038	0,1
	HA	0,0002	0,0006
	A	$5 \cdot 10^{-8}$	$1,6 \cdot 10^{-7}$

V tabulce 1 jsou znázorněny závislosti koncentrací jednotlivých komponent kyseliny na pH a celkové její koncentraci, kde H₂A je nedisociovaná kyselina, HA je disociovaná do 1. stupně a A je úplně disociovaná forma kyseliny itakonové. Při počátečním pH 3,5 je poměr H₂A:HA roven 1,5:1. Na konci fermentace je nutno prakticky počítat jen s nedisociovanou formou. Při fermentaci, kdy počáteční pH bylo nastaveno na 3,1, byla zaznamenána maximální hodnota výrazu

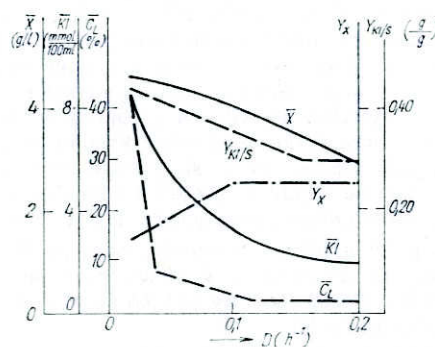
rychlost přírůstu kyseliny

rychlost poklesu pH

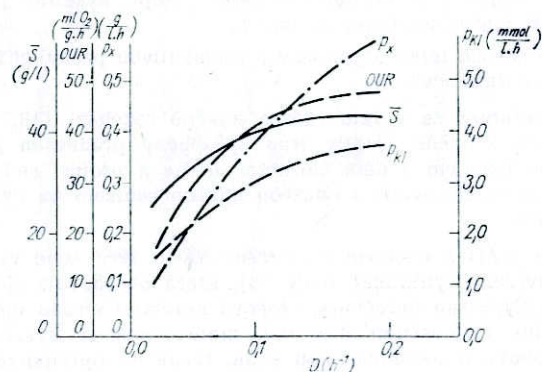
v druhé fázi fermentace, tj. v rozmezí pH 2,2—1,85.

V tomto optimálním případě se při poklesu pH ze 3,1 na 2,2 vytvoří jen 7,5 % celkové kyseliny, tzn., že hlavní produkční fáze spadá do stacionární růstové fáze mikroorganismu. V oblasti pH 2,2—1,85 lze již i pH regulovat bez negativního ovlivnění syntézy kyseliny. Nejhorší výsledky se ukázaly při pH 2, a to jak pro regulované, tak i pro neregulované pH. Mycelium při těchto nízkých pH neroste.

Kontinuální kultivace byla uskutečněna v jednom stupni chemostatu. Na obr. 5 a 6 je znázorněna závislost jednotlivých veličin na zředovací rychlosti při pH 2,7.



Obr. 5. Vliv zředovací rychlosti na charakteristické veličiny procesu v ustálených stavech kontinuální fermentace (pH 2,7)

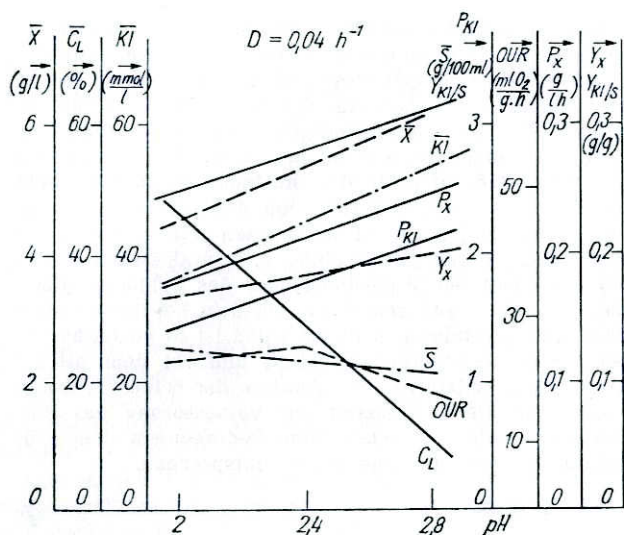


Obr. 6. Vliv zředovací rychlosti na charakteristické veličiny procesu v ustálených stavech kontinuální kultivace (pH 2,7)

S rostoucí zředovací rychlostí sice klesá koncentrace plísň v médiu, ale na druhé straně roste specifická rychlost spotřeby kyslíku, což rezultuje již při $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ praktickým vyčerpáním obsahu rozpuštěného kyslíku (C_L). Tím je zvyšování průtoku právě z tohoto důvodu silně omezeno. Médium je silně viskózní a nelze zvyšováním frekvence otáčení míchadla zajistit vyšší dodávku potřebného vzduchu do média. Obsah kyseliny itakonové (K_I) rovněž s rostoucí zředovací rychlostí klesá, což naráží na problém její izolace z média. Výtěžnosti jak mycelia, tak i produktu se mezi $D = 0,1$ až $0,15 \text{ h}^{-1}$ ustálí na konstantních hodnotách. Maxima obou produktivit nebyla nalezena. pH bylo udržováno konstantní čpavkem, což je výhodnější než úprava louhem sodným. Kontinuální systém v jednom stupni musí vyjít z jednorázové kultivace a s přítokem může být započato až po prudkém poklesu pH, jinak je prakticky nemožné získat maximální výtěžky kyseliny. Jednostupňový systém není z těchto důvodů výhodný, neboť neodpovídá přirozenému procesu. Vliv pH je znázorněn na obr. 7, a to při zředovací rychlosti $D = 0,04 \text{ h}^{-1}$, kdy kyslík nebyl limitujícím faktorem. S rostoucím pH vzrůstá i rychlost procesu a při tom koncentrace cukru mírně klesá.

Nejpozoruhodnější je však prudký pokles obsahu rozpuštěného kyslíku, který při hodnotách kolem pH 3 se dostane do oblasti limitace. Zvyšování pH je výhodnější pro syntézu produktu než pro růst plísň. Srovnáme-li produktivitu syntézy kyseliny itakonové jednorázového a kontinuálního systému, dostáváme tabulku 2. Systém kontinuální je z tohoto hlediska účinnější.

Stejně jako v jednorázové, tak i v kontinuální kultivaci se při pH větším než 3,3 objevuje velké množství kuličkových forem o průměru větším než 1 mm a fer-



Obr. 7. Vliv pH na charakteristické veličiny kontinuálního procesu

Tabulka 2

Typ kultivace (D)	pH	Produktivita D(pKI) mmol KI.l ⁻¹ .h ⁻¹
Jednorázová (0)	2,7 (počáteční)	3,0
Kontinuální (0,2 h ⁻¹)	2,7 (regulované)	3,86

mentační médium výrazně mění barvu ze slabě růžové do nahnědlé, což svědčí o změně metabolismu, která se projeví především větším množstvím nežádoucích kyselin.

Oba dva systémy mají ještě mnoho možností ke zlepšení, tak např. prodloužením jednorázového systému („fed-batch“) s přidávkou fosfátů a glukózy, čímž lze dosáhnout lepších výsledků než v kontinuálním jedno-
stupňovém uspořádání. Vícetupňové systémy kontinuální slibují na druhé straně velké a dosud neověřené možnosti.

Literatura

- [1] KINOŠITA K.: Acta Phytochim. Japan **9**, 1937, 159—187
- [2] CALAM C. T., OXFORD A. E., RAISTRICK H.: Biochem. J. **33**, 1939, 1488—1495
- [3] KARANOV E. N., CHRISTOVA L. N.: Dokl. Bolg. Akad. Nauk **28** (8), 1975, 1097—1100
- [4] CHOCHLOVA Y. M., ISMAILOVA D. Y.: Prikl. Biochim. Mikrobiol. **9** (2), 1973, 203—8
- [5] NOWAKOWSKA-WASZCZUK A.: Zesz. Nauk. Politech. Lodz. Chem. Spozyw. **24**, 1974, 21—32
- [6] NOWAKOWSKA-WASZCZUK A.: J. Gen. Microbiol. **79**, 1973, 19
- [7] ELNAGHY M. A., MEGALLA S. E.: European J. Appl. Microbiol. **2**, 1975, 159—172
- [8] CHARI S. N.: Ph. D. Thesis, University of Birmingham, UK, 1971
- [9] NAKAMURA I., NAKAGAWA M., KOBAYASHI T.: Hakko Kogaku Zasshi **53** (7), 1975, 435—442
- [10] LOCKWOOD L. B., REEVES M. D.: Arch. Biochem. **6**, 1945, 455—569
- [11] WHITAKER A., LONG P. A.: Process Biochem. **8** (11), 1973,
- [12] SNELL R. L., SCHWEIGER L. B.: US Pat 2, 492, 667, 1949
- [13] LOCKWOOD L. B., NELSON G. E. N.: Arch. Biochem. **10**, 1946, 365—374
- [14] MOYER A. J., COGHILL R. D.: Arch. Biochem. **7**, 1945, 167—178
- [15] LARSEN H., EIMHJELLEN K. E.: Biochem. J. **60**, 1955, 135
- [16] W. E. DUCKWORTH: Statistical Techniques in Technological Research, Methuen Co. Ltd, London 1968
- [17] RYCHTERA M.: Sborník vysoké školy chem. technol. v Praze, E 41, 1974, 89—110
- [18] OJIMA N., TAKENAKA S., SETO S.: Phytochemistry **12** (10), 1973, 2527—9
- [19] RYCHTERA M., WASE D. A. J.: Přípravená práce

Přehled použitých symbolů

- c koncentrace jednotlivých forem kyseliny itakonové, HA, H₂A a A (mol/l),
C_L koncentrace rozpuštěného kyslíku (% nasycení),
D zředovací rychlost, tj. poměr průtoku kapaliny k objemu kapalné fáze ve fermentoru (h⁻¹),
K rychlostní koeficient tvorby kyseliny, = dKI/dt (mmol/l.h),
KI koncentrace kyseliny itakonové (g/l, mmol/l, mmol/100 ml),
OUR specifická rychlost spotřeby kyslíku (ml/g.h),
P_{KI} produktivita kyseliny itakonové (mmol/l.h),
P_X produktivita biomasy plísně (g/l.h),
P_b obsah fosforu v biomase plísně (% sušiny),
P_m obsah fosforu v médiu (g/l),
S koncentrace glukózy (g/l, g/100 ml),
x koncentrace sušiny plísně (g/l)
Y_X výtěžnost biomasy plísně, = $\frac{\text{přrůstek plísně}}{\text{úbytek substrátu}}$, (g/g)
Y_{KI/S} výtěžnost kyseliny, = $\frac{\text{přrůstek produktu}}{\text{úbytek substrátu}}$, (g/g)
Y_{KI/X} celková aktivita kultury, = Y_{KI/S}/Y_X (g/g)
μ specifická rychlost růstu, = 1/X · dX/dt (h⁻¹)

Rychtera, M.: Vliv acidity fermentačního média na tvorbu kyseliny itakonové při kultivaci plísně *Aspergillus terreus*. Kvas. prům. **23**, 1977, č. 7, s. 154—162

V článku je podán stručný přehled problematiky fermentační výroby kyseliny itakonové použitím plísně *Aspergillus terreus*. Práce se zaměřila na jeden z faktorů, který ovlivní rychlost produkce kyseliny, na pH. Bylo experimentálně dokázáno, že pro maximální výtěžnost produktu je nutné při jednorázové kultivaci upravit pH média na hodnotu 2,8—3,1 a během fáze největšího poklesu pH, tj. prakticky během exponenciální fáze růstu plísně, pH neupravovat. Při kontinuálním způsobu v jednom členu je výhodnější pracovat při nižším průtoku a při pH 2,7—2,9. Analýzou obou procesů se naskytá možnost zlepšení produkce způsobem, který lépe vyhovuje produkčnímu mikroorganismu.

Рихтера, М.: Влияние кислотности сбраживаемой среды на образование итаконовой кислоты при культивировании плесени *Aspergillus terreus* Квас. прум. **23**, 1977, № 7, стр. 154—162.

В статье рассматривается проблематика производства итаконовой кислоты методом сбраживания с помощью плесени *Aspergillus terreus*. Подробно объясняется роль одного из факторов, влияющих на скорость образования кислоты, т. е. pH. Путем экспериментов было установлено, что в случае применения установок периодического действия максимальный выход продукта получается при условии поддержания pH в пределах 2,8—3,1, причем в период фазы максимального снижения pH, т. е. в фазе показательного роста плесени, pH не следует регулировать. В установках непрерывного действия лучшие результаты получаются при меньшем дебите потока и pH от 2,7 до 2,9. Знание хода процессов дает возможность интенсификации производства посредством создания условий, полностью отвечающих требованиям применяемых микроорганизмов.

Rychtera, M.: Effects of the Fermentation Medium Acidity Upon the Formation Rate of Itaconic Acid Produced by Cultivated *Aspergillus terreus* Mould. Kvas. prům. **23**, 1977, No. 7, pp. 154—162

The article deals briefly with some problems of fermentation method used to produce itaconic acid by

cultivating *Aspergillus terreus* mould. The author analyses in detail the influence of pH this being one of the factors determining the rate of acid formation. The results of experiments show, that in installations for batch processing pH should be held for maximum yield in the 2,8 — 3,1 range. In the phase of the most rapid pH decrease, i. e. in the exponential phase of the mould growth, pH must not be adjusted. In installations for continuous processing low flow rate can be recommended and pH from 2,7 to 2,9. Through better understanding of all relevant factors production of itaconic acid can be intensified owing to creating optimum conditions for the activity of microorganisms.

Rychtera, M.: Einfluß der Azidität des Fermentationsmediums auf die Bildung der Itakonsäure bei der Kultivation des Schimmelpilzes *Aspergillus terreus*. Kvas. prům. 23, 1977, No. 7, S. 154—162

In dem Artikel wird die Problematik der Itakonsäureproduktion auf fermentativem Wege bei Anwendung des Schimmelpilzes *Aspergillus terreus* zusammenfassend beschrieben. Die Arbeit war auf einen der Faktoren gerichtet, der die Geschwindigkeit der Säureproduktion beeinflusst, und zwar auf das pH. Es wurde experimentell bewiesen, daß man für die maximale Produktausbeute bei der einschlägigen Kultivation das pH des Mediums auf den Wert 2,8 bis 3,1 aufbereiten und während der Phase der größten pH-Abnahme, d. h. praktisch während der exponentialen Wachstumsphase des Schimmelpilzes, das pH nicht regulieren sollte. Bei dem kontinuierlichen Produktionsverfahren in einem Glied ist es vorteilhafter, bei einem niedrigeren Durchfluß und bei dem pH 2,7 bis 2,9 zu arbeiten. Aus der Analyse der beiden Prozesse ergibt sich die Möglichkeit der Verbesserung des Produktionsverfahrens, sodaß seine Bedingungen dem Produktionsmikroorganismus besser entsprechen.