

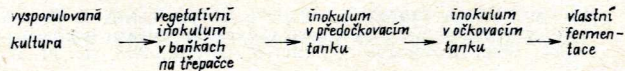
# Způsob přípravy inokula pro submerzní produkci kyseliny citronové

663.15:661.734.1  
663.13 57.083.132

RNDr. MARIE MUSÍLKOVÁ, CSc., RNDr. LEOPOLD SEICHERT, CSc., RNDr. EMMA UJCOVÁ, CSc., Prof. Ing. VLADIMÍR KRUMPHANZL, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

**Klíčová slova:** inokulum, příprava, kyselina citronová, submerzní produkce, technika očkování

Kyselina citronová se vyrábí zkvašováním cukerných roztoků pomocí houby *Aspergillus niger* buď klasickým povrchovým způsobem, nebo novějším postupem submerzní kultivace. Odlišné způsoby kultivace vyžadují i odlišný způsob očkování fermentačního média. Při stacionární kultivaci se očkuje rozprášením spor na povrch média proudem sterilního vzduchu, při submerzní kultivaci se zařazuje před vlastní fermentaci zvláštní stupeň přípravy vegetativního očkovacího materiálu. Pro získání dostatečného množství vegetativního inokula pro velkoobjemové fermentory se tato první fáze dělí na několik postupně se zvětšujících stupňů, jak udává toto schéma:



Toto postupné převádění inokula do stále větších objemů představuje časově dlouhý cyklus a zvýšené provozní náklady. Kromě toho několikanásobná vegetativní pasáž skrývá nebezpečí, že by mohlo dojít k vyštěpení a pomnožení méně produkční varianty a tím ke snížení výtěžků.

Cílem této práce bylo zjistit možnost zkrácení fáze přípravy vegetativního inokula pro fermentory. Pracovali jsme s kmenem *Aspergillus niger* S 59, popř. A. n. NG 233, pro fermentační pokusy jsme používali syntetické médium se sacharózou jako zdrojem uhlíku [Sánchez-Marroguin, 1970]. Při pokusech jsme vycházeli z vysporulované kultury na sladidlovém agaru, kterou jsme kličkou přenášeli do 50 ml inokulačního média

v 300 ml Erlenmeyerových baňkách a kultivovali 48 h na rotační třepačce (3,7 Hz, radius 25 mm). Laboratorním inokulem jsme očkovali inokulační půdu v 3 l laboratorním skleněném fermentoru s 1,5 l média (600 obr., 750 ml vzduchu/min) a po dalších 48 h jsme očkovali inokulační médium v 50 l nerezocelovém tanku s 24 l média (400 obr., 8 l vzduchu). Tímto inokulem bylo očkováno médium pro vlastní fermentaci v 250 l tanku (152 l média, 400 obr., 30 l vzduchu).

Pro snížení počtu operací jsme zkoušeli vypustit první dva stupně a očkovat inokulační tank přímo sporami *A. niger*, a to buď suspenzí spor, nebo sporami na nosiči (Muslíková aj. 1982). Suspenze spor byla připravena smytím vysporulované kultury na agarové půdě pomocí 0,01 % tweenu 80 a třepána na třepačce, aby se jednotlivé spory oddělily a aby se urychlilo klíčení spor ve fermentoru. Množství spor po naočkování inokulační půdy se pohybovalo mezi  $5 \cdot 10^6$  —  $1 \cdot 10^7$  spor/ml. Kvalitu tohoto inokula jsme porovnali s inokulem připraveným obvyklým způsobem (tab. 1).

Z uvedených výsledků je zřejmé, že inokulum, které rostlo v očkovacím tanku přímo ze spor, odpovídá kvalitou inokulu očkovanému laboratorním vegetativním inokulem. Tento postup však lze použít maximálně pro

poloproduční tanky, k očkování inokulačního tanku pro velkoobjemové fermentory by bylo třeba velkého množství vysporulovaných kultur.

Inokulum pro velké objemy v jediném stupni jsme připravovali tak, že k očkování inokulačního tanku jsme použili spory produkční houby na nosiči. Jako nosič jsme používali semena, zejména obilovin, která jsme povařili, vysterilovali a očkovali suspenzí spor *A. niger*. Během inkubace v termostatu obrostla houba jednotlivá zrna a vytvořila velké množství spor na celém povrchu zrn. Zkoušeli jsme hlavně 3 druhy obilí: prosa, pšenici a kukuřici. Výsledky udává tab. 2.

Z tohoto porovnání vyplývá, že při očkování sporami na zrnech různých druhů obilí jsme získali prakticky totožné výsledky. Z praktických důvodů jsme pro další práci zvolili pšenici, která má menší zrna než kukuřice a tím i větší povrch pro sporulaci. U prosa, které by se zdálo z hlediska povrchu nejvhodnější, srůstala během kultivace zrna ve shluky, takže se tato výhoda ztrácela. K očkování 24 l média (pro očkování 250 l fermentoru) stačil obsah 50 ml Erlenmeyerovy baňky, tj. 15 ml vysporulovaných zrn. Při kultivaci se spory postupně uvolňovaly ze zrn a neusazovaly se na stěnách fermentoru, jak tomu bylo někdy při použití suspenze spor. Inokulum očkované sporami na zrnech rostlo velmi homogenně ve formě malých pravidelných lehce sbalených pelet a jednotlivých vláken, zatímco při očkování suspenzí spor nebo vegetativním inokulem byly pelety nehomogenní, různě velké. Průběh růstu kultury a tvorby kyseliny citrónové ve fermentoru o obsahu 250 l při použití spor *A. niger* S 59 na pšenici udává graf 1.

Použití spor na nosiči mělo řadu výhod. Inokulační fáze se zkrátila na jeden stupeň, zkrátila se i délka kultivace inokula (z 48 na 42 h), v důsledku zlepšené kvality inokula bylo možné snížit jeho množství (z 5 % na

Tab. 1. Výťažky kyseliny citrónové po očkování suspenzí spor (v % na vnesený cukr)

Označení kmene	NG 233	S 59
Inokulum vegetativní	61,7	67,9
inokulum očkované sporami (1. tank)	62,5	68,4
inokulum očkované sporami (2. tank)	62,9	66,7

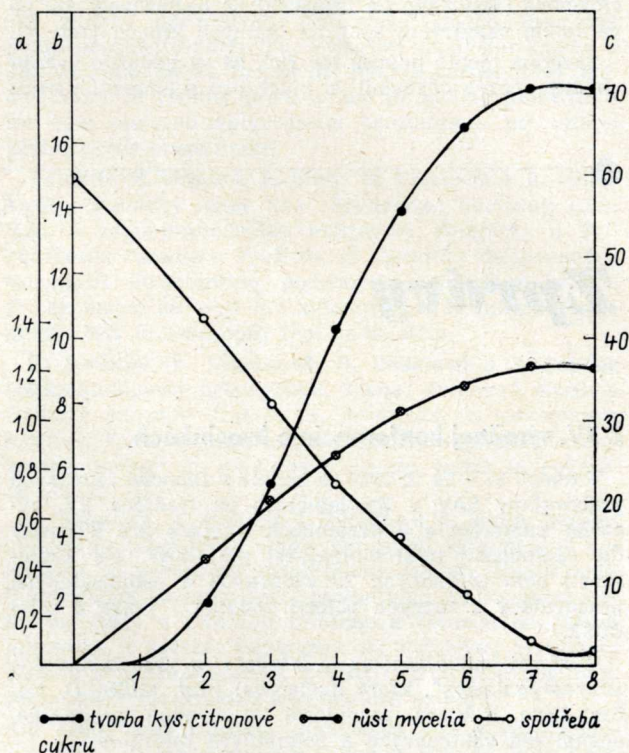
Tab. 2. Výťažky kyseliny citrónové při očkování sporami *A. niger* S 59 na nosiči (v % na vnesený cukr, průměr 4 pokusů)

Vegetativní inokulum	68,5 %
Spory na prosu	69,2 %
Spory na kukuřici	69,8 %
Spory na pšenici	70,5 %

Tab. 3. Vliv různého způsobu očkování *A. niger* S 59 na produkci kyseliny citrónové

Pokus	Očkování suspenzí spor		Očkování sporami na nosiči	
	Výtěžnost % na vnesený cukr	Sušina mycelia g/100 ml	Výtěžnost % na vnesený cukr	Sušina mycelia g/100 ml
1	67,3	0,83	69,5	0,78
2	58,8	0,98	68,8	0,82
3	62,4	0,95	70,3	0,79
4	57,6	1,24	72,4	0,80
5	69,4	0,85	71,5	0,80
6	65,3	1,15	68,0	0,82
7	54,8	1,35	71,8	0,79
8	59,2	0,74	72,4	0,81
průměr	61,8	1,01	70,6	0,80

Vhodnost tohoto způsobu očkování jsme ověřili i pro kmen *A. niger* NG 233.



Graf 1. Tvorba kyseliny citrónové kmenem *A. niger* S 59 při použití spor na nosiči

Osa x: čas (dny), osa y: a) sušina mycelia g/100 ml, b) cukr g/100 ml, c) množství kyseliny citrónové v % na vnesený cukr

Tab. 4. Výtěžky kyseliny citrónové při očkování různě starými sporami *A. niger* S 59 na nosiči

Rok přípravy spor	Označ. baňky	Výtěžky kyseliny citrónové [% na vnesený cukr]
1983	1	68,4
1983	2	69,1
1982	1	70,5
1982	2	68,8
1981	1	69,3
1981	2	67,9
1980	1	70,7
1980	2	68,3
1979	1	66,9
1979	2	67,8
1978	1	69,6

2—3 %) a dosáhlo se standardních výtěžků jednotlivých šarží (tab. 3).

Spory *A. niger* S 59 na pšenici jsme použili i pro přípravu inokula pro 5 000 l fermentor. Inokulační tank obsahoval 300 l média a byl očkován 120 ml vysporulovaných zrn pšenice (dvě 250 ml Erlenmeyerovy baňky s 60 ml zrn).

V průběhu pokusů se ukázalo, že kultury *A. niger* S 59 i NG 233 vysporulované na pšenici lze při uložení při 5 °C používat k očkování po velmi dlouhou dobu, aniž by došlo ke ztrátě klíčivosti nebo snížení tvorby kyseliny citrónové. Provedli jsme porovnání se sporami *A. niger* S 59 na pšenici připravenými v r. 1978—1983, přičemž jsme použili vždy dvě kultury z každého roku. Pokus ukázal, že spory z r. 1979 klíčily pomaleji a z r. 1978 vyklíčily už jen z jedné ze zkoušených konzerv. Pokud se týče produkce kyseliny citrónové, lze říci, že — pokud spory byly schopny růstu — výtěžky kyseliny citrónové (testováno na třepačce) se nesnižovaly ani po pětiletém skladování spor na obilných zrnech (tab. 4).

Závěrem těchto pokusů lze říci, že se podařilo vyřešit vhodný způsob očkování *A. niger* pro submerzní výrobu

kyseliny citrónové a podstatně zkrátit fermentační cyklus přípravou vegetativního inokula v jediném stupni. Sporový materiál připravený tímto způsobem je možno i dlouhodobě skladovat při +5 °C.

#### Literatura

- [1] MUSÍLKOVÁ, M., SEICHERT, L., UJCOVÁ, E., FENCL, Z.: AO 209715, 1982
- [2] SÁNCHEZ - MARROQUIN, A., CARRONO, R., LEDEZMA, M.: Appl. Microbiol. 20, 1970, s. 888.

**Musílková, M. - Seichert, L. - Ujcová, E. - Krumphanzl, V.: Způsob přípravy inokula pro submerzní produkci kyseliny citrónové.** Kvas. prům., 30, 1984, č. 5, s. 110—112.

Vysoké výtěžky kyseliny citrónové byly dosahovány při použití vegetativního inokula, připraveného očkováním spor *Aspergillus niger* na vhodném přírodním nosiči.

Мусилкова, М. — Сеихерт, Л. — Уйцова, Е. — Крмпханцл, В.: Метод приготовления посевного материала для погруженного культивирования лимонной кислоты. Квас. прум. 30, 1984, № 5, стр. 110—112.

Высокие выходы лимонной кислоты были обнаружены при применении вегетативного инокула, полученного посевом удобного природного носителя со спорами *Aspergillus niger*.

**Musílková, M. - Seichert, L. - Ujcová, E. - Krumphanzl, V.: Inoculation method for the submerge production of citric acid.** Kvas. prům. 30, 1984, No 5, pp. 110—112.

High yields of citric acid were achieved when using vegetative inoculation of an adequate natural carrier with the spores of *Aspergillus niger*.

**Musílková, M. - Seichert, L. - Ujcová, E. - Krumphanzl, V.: Die Vorbereitung des Inokulums für die Zitronensäurebildung durch submerses Verfahren.** Kvas. prům. 30, 1984, No 5 S. 110—112.

Die hohe Ausbeute der Zitronensäure wurde bei der Anwendung des mit *Aspergillus niger*-Sporen auf dem Träger geimpften vegetativen Inokulums erreicht.