

# Povrchová kultivace v plastických vracích a možnosti jejího průmyslového využití

RNDr. JAN KYBAL, CSc., Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii, Praha

*Klíčová slova: povrchová kultivace, kultivační vaky, vláknité houby, námelové alkaloidy, konidiace, inokulum, mykoinsekticidy*

Kultivace aerobních mikroorganismů na hladině kapalného média je nejstarším, a dodnes laboratorně nejběžnějším způsobem množení mikroorganismů. Také první antibiotikum — penicillin, bylo původně vyráběno stacionární kultivací na hladině kapalné živné půdy. Principem technologie, kterou se v Anglii vyráběl penicilin až do roku 1946, byla jen mechanizovaná laboratorní práce, která umožňovala provádět sterilně sériové kultivace na běžících páslech v několika stech tisících lahvích na mléko.

Hlavní překážkou průmyslového využití stacionární kultivace mikroorganismů zůstal až dodnes problém zajištění sterility velkých ploch substrátu.

Faktor kontaminace se tak stal nepřekonatelnou překážkou, která znemožnila průmyslovou přípravu mikrobiálních metabolitů povrchovou kultivací. Bezprostředním důsledkem této skutečnosti, vynuceným především ekonomickými důvody, byl rychlý vývoj do té doby neznámé metody kultivace submerzní v míchaných a vzduš-

ných sterilních fermentorech. V souvislosti s přechodem od stacionární na submerzní způsob kultivace bylo třeba vyřešit nové otázky konzervování průmyslových mikroorganismů, jejich šlechtění, problematiku růstu, množení, příjmu živin a přenosu kyslíku, aby bylo možno optimálně využívat nových a pro mikroorganismy poněkud nepřirozených podmínek, daných submerzní technologií. Submerzní kultivace mikroorganismů se tak stala snad prvním příkladem zásadního ovlivnění biologických věd potřebami průmyslu a obchodu a na dlouhá léta nasměrovala mikrobiologii, která vyústila v bouřlivý rozvoj fermentační biotechnologie. Přirozeně, že tím ustoupil do pozadí zájem o další vývoj metod stacionární kultivace. Je pro to možno s velkou pravděpodobností dedukovat, že by nedošlo k tak rychlému rozvoji technologie submerzní kultivace, kdyby byly v dané době existovaly předpoklady pro průmyslovou realizaci aseptické kultivace stacionární.

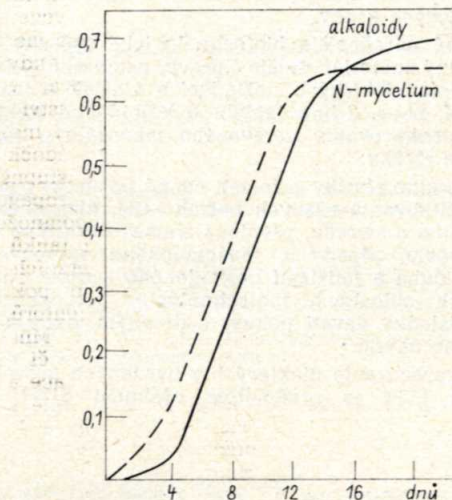
Pro renesanci stacionární kultivace mikroorganismů

nás inspiroval úkol fermentační přípravy peptidových námelových alkaloidů. Hlavním důvodem, který nás přivedl k tomuto rozhodnutí, je zvláštní postavení námelových alkaloidů mezi průmyslově produkovými mikrobiálními metabolity, jako jsou např. aminokyseliny nebo antibiotika. Je obecně známo, že divoké kmeny mikroorganismů, izolované z přírody, neprodukují zpravidla *in vitro* žádané substance buď vůbec, nebo jen výjimečně v nepatrném množství. Průmyslovému využití takových kmenů musí vždy předcházet náročná práce šlechtění a optimalizace technologického postupu, vedoucí ke zvýšení produkce až o několik řádů, což teprve umožňuje průmyslovou přípravu za ekonomických parametrů. V průmyslu tak pracujeme zpravidla s vysoce vyšlechtěnými produkčními kmeny, které jsou co do produkce žádaného metabolitu, ale i obecně svými schopnostmi růstu a množení odkázány vzhledem ke svému změněnému genotypu na danou technologii. Kdybychom se je pokusili vrátit zpět do podmínek přírody, z nichž byly původně odvozeny, přestaly by existovat. Naproti tomu peptidové námelové alkaloidy patří i v přírodě mezi tzv. excesivní metabolity, produkovány i divokými kmeny vždy a často i v překvapivě velkých kvantech. Tak např. sklerocia planě rostoucí na klasech trávy druhu *Molinia coerulea* obsahují až 1,5 % alkaloidů v sušině biomasy. Druhým pro naši argumentaci závažným faktorem je hromadění peptidových námelových alkaloidů v buňkách producenta, na rozdíl od submerzní fermentační přípravy většiny ostatních mikrobiálních metabolitů, které jsou produkujícími buňkami zpravidla vylučovány do produkční pudy. V případě peptidových námelových alkaloidů zůstává tedy, bez ohledu na použitou technologii kultivace, přirozeným limitem produkce hmotnost narostlé biomasy, vztažená na jednotku objemu produkční pudy. Zatímco v případě submerzní kultivace aerobních mikroorganismů startuje produkce sekundárního metabolitu až po ukončení balancovaného růstu, dochází při stacionární kultivaci obecně, a potvrdili jsme to experimentálně i pro případ peptidových námelových alkaloidů, k biosyntéze paralelně se zvětšující s hmotností biomasy (obr. 1, 2).

Na rozdíl od vegetativních hyf mikroorganismů, produkujících v submerzních míchaných a vzdušných kulturách excesivní metabolity, jsou námelové alkaloidy produktem sekundárního metabolismu vysoce diferencovaných, tlustostěnných, vodou relativně chudých sklerociových buněk. Stejně je tomu i při růstu divokých kmenů na jejich přirozeném stanovišti, na klasu hostitelské rostliny.

V submerzní kultuře je možno pěstovat v případě produkčních kmenů druhu *Claviceps purpurea* jen sfaceliové hyfy, které však peptidové námelové alkaloidy nesyntetizují. V intenzivně míchaných a vzdušných fer-

mentorech nikdy k diferenciaci produkce schopných sklerociových buněk nedochází. Submerzní technologie fermentační přípravy peptidových námelových alkaloidů, tak jak byla vypracována některými autory, řeší tento problém použitím mutantních kmenů, které ztratily



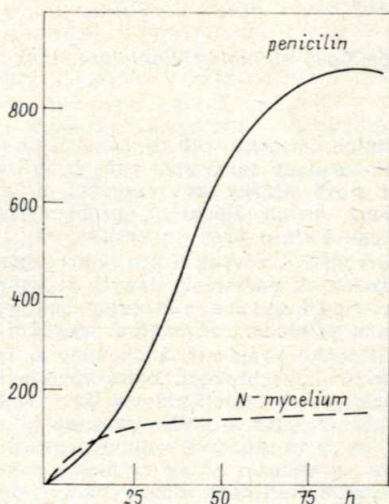
Obr. 2. Růst a biosyntéza alkaloidů v průběhu povrchové kultivace

schopnost sfaceliového prodlužovacího růstu a kultivaci buněk, morfologicky připomínajících skutečné sklerociové buňky, a to za podmínek neobvykle nízké aerace. Produkční kmeny vyšlechtěné s tímto cílem ztrácejí přirozeně schopnost vývoje v parazitní kultuře a zpravidla rovněž nevytvářejí konidie, jejichž diferenciaci je vázána na předchozí růst sfacelie.

Z hlediska fyziologie výživy spatřujeme hlavní rozdíl mezi submerzním a stacionárním myceliem v přijímání a transportu živin včetně kyslíku. Zatímco v podmínkách submerzní vzdušné a míchané kultury přijímá homogenní nepolarizované mycelium z pudy rozpuštěné živiny a kyslík celým aktivním povrchem buněk, vyrůstá ve stacionární kultuře polarizovaná kolonie, přijímající spodní stranou živiny rozpuštěné v puce a svrchní stranou vzdušný kyslík. Alkaloidy produkující sklerociové mycelium přirůstá směrem dolů do živné pudy. Kyslík, resorbovaný ze vzduchu do cytosolu nejsvrchnější vrstvy vzdušných buněk, musí být proto transportován směrem dolů do dělících se a rostoucích buněk sklerocia. V průběhu mnohaletého šlechtění se nám podařilo vyselektovat vysokoprodukční kmeny, schopné vytvářet v povrchové kultuře až 10 % suché sklerociové biomasy s obsahem alkaloidů, vysoce převyšující obsah v droze. získávané polní produkcí námele. Jak jsme předpokládali, neztratily tyto kmeny schopnost parazitovat a na hostitelské rostlině diferencují v morfologicky normální sklerocia (obr. 3).

Zvláštního významu nabývá povrchová kultivace při přípravě spór vláknitých mikroorganismů, používaných jako startovního materiálu pro často víceetapové technologické postupy. Pro konidie druhu *Claviceps purpurea* to platí dvakrát: Slouží totiž nejen a) k přípravě inokula pro fermentační produkci námelových alkaloidů, ale i b) jako infekční očkovací látka při polní produkci námele.

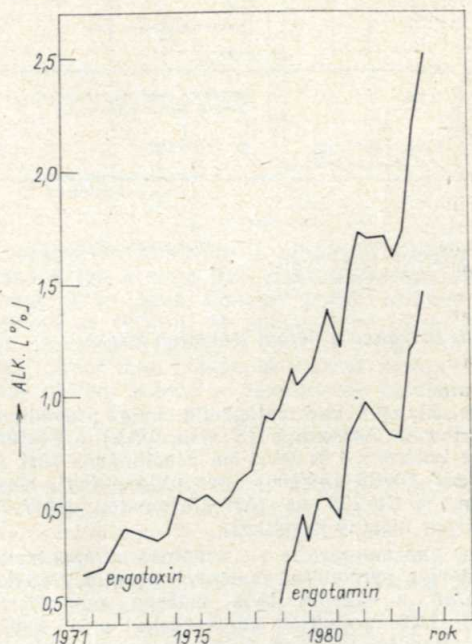
Podobně jako *Claviceps* vytváří většina vláknitých mikroorganismů, využívaných ve fermentačním průmyslu, vegetativní spory, které se odškrubují z konců konidiofor, vyrůstajících ze svrchní vrstvy stacionárního vzdušného mycelia. V submerzní kultuře k diferenciaci konidiogeneze zpravidla nedochází a místo konidií, vznikajících enteroblasticky (jako je tomu např. u rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Sclerotinia*) se vegeta-



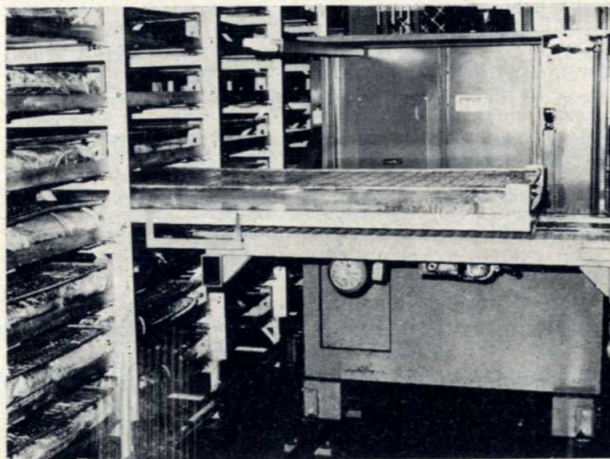
Obr. 1. Růst a biosyntéza penicilinu v průběhu submerzní kultivace (podle: Gailey et al., 1949)

ktivní hyfy v průběhu stárnutí rozpadají za vzniku blastoarthrokonidií. Fyziologická aktivita takových submerzních spór je ve srovnání se vzdušnými konidii výrazně snížena, což je možno jednoduše dokumentovat mimo jiné např. podstatně rychlejší ztrátou klíčivosti v průběhu jejich uchovávání, ale často i sníženou schopností růstu a produkce žádaného metabolitu. Proto se výchozí spórový materiál produkčních kmenů vláknitých mikroorganismů užívaný pro přípravu submerzního vegetativního inokula připravuje výhradně v laboratorním měřítku stacionární kultivací, a to i v těch případech, kdy by bylo možno rychleji a pohodlněji nakultivovat velké množství spór v kultuře submerzní. Malé množství spór postačuje pak jen k přípravě malého objemu inokula v baňkách na třepacím stroji či v malých předočkovacích fermentorech. Pro očkování produkčního stupně va velkoobjemových fermentorech je proto nutno propagovat nediferencované vegetativní hyfy postupným pomnožováním submerzní kultivací v řadě očkovacích tanků postupně vzrůstající velikosti. Ekonomika submerzních fermentačních výrob je s rozvojem technického pokroku stále závislejší na vzrůstajících objemech fermentorů, vyžadujících k zaočkování velké objemy inokula. Množení vegetativního inokula pasážováním je vždy více či méně spojeno se vznikem nehomogenní buněčné populace a de generací produkčního kmene, nehledě na zvýšené nároky na aparaturu a vzrůstající riziko kontaminace. Nadto bývá často hlavní příčinou potíží při převodu výsledků z laboratorního měřítka do výrobních fermentorů.

U většiny fermentačních výrob mikrobiálních metabolitů se uplatňuje vztah mezi množstvím buněk producenta, schopných v produkční fázi kultivace biosyntetizovat žádaný produkt a produktivitou fermentace. Proto je zásadním problémem technologie submerzních fermentačních výrob pokud možno rychlé namnožení co největšího počtu buněk v prvních hodinách kultivace produkčního stupně výroby. V případě inokula, tvořeného nediferencovanými vlákny apikálně rostoucími, jsou jeho účinnou složkou především nejmladší buňky rostoucích konců vláken a jejich větví, zatímco starší, již nerostoucí buňky, vzdálenější od apexu, v podmínkách balancovaného růstu rychle odumírají, vakuolizují a autolyzují. Tzv. „velmi dobře“ narostlé inokulum, tvořené makroskopicky homogenní hustou suspenzí vláken, je proto vždy směsí buněk fyziologicky více či méně aktivních s buňkami



Obr. 3. Průběh šlechtění produkčních kmenů *Claviceps purpurea* pro povrchovou fermentační přípravu námelových alkaloidů



Obr. 4. Detail průmyslového zařízení pro povrchovou kultivaci mikroorganismů. Kultivační vaky jsou zakládány k inkubaci do regálů a po inkubaci vykládány ke zpracování automatizovaným a programovaným zakladačem.

inaktivními. Tyto nepříznivé důsledky postupného stárnutí části populace množených buněk jsou nadto zpravidla doprovázeny i degenerativními změnami, k nimž dochází vždy v průběhu opakovaného pasážování vegetativních vláken produkčních kmenů, ať už jde o degeneraci na úrovni změn fyziologických nebo na úrovni změn genetické informace. Naproti tomu mladé vegetativní mycelium, připravené synchronním vyklíčením spór, představuje homogenní populaci fyziologicky maximálně aktivních buněk.

Prvním případem, kdy se podařilo povrchovou kultivaci ve spolupráci s n. p. Galena vyřešit a průmyslově realizovat přípravu velkého množství spór, jsou konidie produkčních kmenů druhu *Claviceps purpurea*. Z plochy 1 m<sup>2</sup> se tímto postupem získává až 10<sup>14</sup> konidií, jejichž klíčivost převyšuje 90 %.

V průmyslovém měřítku byla povrchová kultivace realizována v plastických vácích o rozměrech 1,2 X 2,4 m. Vaky se připravují příčnými svary z PE-fólie a plní předem vysterilovanou, zchlazenou a inokulovanou půdou. Naplněné kultivační vaky se inkubují v regálech a vzdušní přívodem sterilního vzduchu nad hladinu média (obr. 4).

Zvláštního významu nabývá v současné době problematika přípravy velkého množství fyziologicky vysoce aktivních spór v těch případech, kdy jsou spóry finálním stupněm kultivace. Tak je tomu např. při výrobě bioinsekticidů na bázi entomofágních hub, jimiž se snažíme nahradit vždy více či méně toxické insekticidy chemické. Prvním, v současné době již poloprovozně připravovaným mykoinsekticidním preparátem, je BOVEROL-Spofo. Jde o přípravek, jehož aktivní částí jsou vzdušné konidie druhu *Beauveria bassiana* v množství minimálně 10<sup>10</sup> g<sup>-1</sup>. Boverol je určen k biologickému boji proti různému škodlivému hmyzu, především mandelince bramborové, zavíječi kukuřičnému, můře zelné aj.

Kybal, J.: Povrchová kultivace v plastických vácích a možnosti jejího průmyslového využití. Kvas. prům. 31, 1985, č. 7—8, s. 177—180.

Je popsán průmyslově využitelný postup povrchové kultivace vláknitých hub za sterilních podmínek. Povrchová kultivace v plastických vácích je vhodná pro biosyntézu námelových alkaloidů a k produkci velkého množství spór, sloužících k přípravě inokula či jako aktivní složka mykoinsekticidů.

Кибал, Я.: Поверхностное культивирование в пластмассовых баках и возможности его промышленного использования. Квас. прум. 31, 1985, № 7—8, стр. 177—180.

Описан метод промышленного использования поверхностной культивации волокнистых грибов в стерильных условиях.

Поверхностная культивация в полиэтиленовых мешках может использоваться для биосинтеза алкалоидов спорыньи и для продукции большого количества спор, используемых для приготовления инокулята или в качестве активного компонента микоинсектицидов.

**Kybal, J.: Surface cultivation in plastic bags and their possible utilization on industrial level.** Kvas. prům. 31, 1985, No. 7—8, pp. 177—180.

Industrially acceptable device for stationary surface cultivation of filamentous fungi under sterile conditions is described. Surface cultivation in plastic cushions is especially advantageous for the

biosynthesis of ergot alkaloids and for the production of spores in large quantities, used for inoculation or as active agents of mykoinsekticides.

**Kybal, J.: Die Oberflächenkultivation in Plastiksäcken und Möglichkeiten ihrer industrieller Ausnützung.** Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 7—8, S. 177—180.

Es ist ein industriell verwendbares Verfahren für die Oberflächenkultur der Fadenpilze unter sterilen Bedingungen beschrieben. Die Oberflächenkultur in Plastikbeuteln eignet sich für die Biosynthese der Mutterkornalkaloide, wie auch für die Produktion großer Menge von Sporen, die zur Bereitung des Inokulums oder als aktives Bestandteil der Mykoinsektizide dienen.