Regulace růstu produkčního kmene a biosyntézy penicilinu v počátečních hodinách fermentace

663.1 579

RNDr. VLASTA MATELOVÁ, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Klíčová slova: fermentace, biosyntéza, penicilin, růstová rychlost, regulace, mycelium

Biosyntéza penicilinu, podobně jako většiny sekundárních metabolitů, následuje po počáteční periodě intenzivního růstu. Vztah mezi růstem a tvorbou sekundárních metabolitů byl studován řadou autorů [1, 2, 3, 4, 5]. Podle literárních údajů rychlost růstu v první fázi fermentace je určována především vrozenými schopnostmi organismu, druhá fáze, tj. produkční, která je charakterizována rovnovážným stavem mezi růstem a autolýzou, je snadněji regulovatelná podmínkami fermentace.

Počáteční neprodukční perioda fermentace je důležitá z několika hledisek, jednak v této fázi se již rozhoduje o kvalitě mycelia vzhledem k biosyntetické schopnosti tvorby penicilinu, jednak její délka ovlivňuje ekonomiku procesu. Z těchto důvodů byla námi detailně studována počáteční fáze fermentace, resp. byly hledány podmínky ovlivňující rychlost a intenzitu růstu pro-

dukčního organismu a byly specifikovány podmínky vedoucí ke zkrácení neprodukční vývojové fáze.

Byly sledovány tyto faktory: kvantita a kvalita vegetativního inokula užitého k inokulaci fermentační půdy, výchozí složení inokulační a fermentační půdy, výchozí pH fermentační půdy, podmínky fermentace, resp. intenzita míchání, vzdušnění, teplota atd. Všechny pokusy byly provedeny za laboratorních podmínek na rotačních třepacích strojích.

Graf 1 vystihuje vliv velikosti vegetativního inokula na počáteční růst produkčního organismu a start biosyntézy penicilinu. Nutno poznamenat, že pokusy byly prováděny na semisyntetických fermentačních půdách, obsahovaly jako zdroj dusíku rozpustný sójový pepton, zdrojem uhlíku byla sacharóza, které bylo na počátku fermentace v půdě 0,75 %, ve 24. hodině fermentace bylo přidáno 1,24 % sacharózy ve formě dražé. Množství vegetativního inokula použitého k očkování fermentačních půd významně ovlivňuje rychlost růstu kultury a produkci penicilinu; čím je fermentační půda zaočkována větším množstvím inokula, tím je růst intenzivnější a produkce penicilinu větší, při použití 20 % vegetativního inokula je i zahájení biosyntézy penicilinu urychleno.

Graf 2 vyjadřuje závislost mezi stářím vegetativního inokula a růstem, resp. produkcí. Různě staré vegetativní inokulum bylo zkoncentrováno nebo zředěno na stejný obsah mycelia a takto shodně velkým inokulem bylo provedeno zaočkování fermentačních baněk. Jak je patrné z grafu, nejvhodnější pro dosažení velkého množství biomasy v co nejkratší době a nejrychlejšího nástupu produkce je vegetativní inokulum staré 48 hodin.

Dále bylo sledováno, jak růstovou fází ovlivňuje složení fermentační půdy resp. koncentrace zdroje uhlíku v půdě (graf 3). Tvorba biomasy byla největší při koncentraci sacharózy 1,5 %, biosyntéza penicilinu byla nejintenzivnější při 0,75 % sacharózy v půdě. Důležité je zjištění týkající se alternativy, při které v půdě nebyla na počátku fermentace žádná sacharóza, růst měl ob-

Obr. 1. Vliv velikosti vegetativního inokula na růst a produkci penicilinu

Obr. 2. Vliv stáří vegetativního inokula na růst a produkci penicilinu

Obr. 3. Vliv koncentrace sacharózy v půdě na růst a produkci penicilinu

Obr. 4. Vliv složení inokulační půdy na růst a produkci penicilinu

vyklý průběh, i když na nižší úrovni (zdroj uhlíku byl saturován z degradovaných aminokyselin), ale po přidání sacharózy ve 24. hodině kultura již v růstu nebyla schopna pokračovat, poškození růstové schopnosti buněk je trvalého charakteru. Obdobná situace nastala, byl-li jako zdroj uhlíku použit sójový olej. Pro dosažení maximálního růstu je třeba 1,5 % sójového oleje, biosyntéza penicilinu je nejdříve zahájena při 1,0 % sójového oleje v půdě.

Zásadní změna v rychlosti růstu na počátku fermentace nastala při změně složení inokulační půdy použité k zaočkování fermentačních půd. Při doposud uváděných pokusech bylo inokulum připravováno na půdě typu kuřičný extrakt (CSL), sacharóza, soli a v pokusech

uvedených v grafu 4 bylo inokulum připraveno na půdě, ve které zdrojem dusíku byla sójová mouka, zdrojem uhlíku zůstala sacharóza a půda dále obsahovala soli. Shodného růstu s kontrolou bylo dosaženo na půdách se sójovou moukou o 12 hodin dříve, rovněž biosyntéza penicilinu byla vyšší. Tato změna rychlosti růstu je dána enzymovým vybavením kultury, které získá v průběhu růstu v inokulační půdě. Při použití sójové mouky jako zdroje dusíku vzniká v inokulační půdě tím více proteáz, čím půda obsahuje méně sacharidů. V inokulační půdě obsahující 4 % sacharózy vznikne za 48 hodin 0,25 kaseinových jednotek na ml proteáz, neobsahuje-li inokulační půda žádnou sacharózu, vznikne proteáz za stejnou časovou jednotku 7krát více. Inokulum takto vybavené pak tvoří při vlastní fermentaci proteázy bezprostředně po zaočkování a podstatně intenzivněji. Ideální z hlediska růstu ve fermentační půdě by bylo připravovat inokulum v půdě se sójovou moukou bez zdroje uhlíku, dalším studiím však bylo zjištěno, že takto připravené inokulum je velice citlivé k vnějším vlivům a že snadno podléhá mechanické destrukci. Z tohoto důvodu se jeví jako optimální inokulační půda obsahující sójovou mouku v kombinaci s minimálním množstvím sacharózy.

Růst mycelia a biosyntéza penicilinu jsou v počátečních hodinách fermentace shodně ovlivňovány výchozím pH fermentační půdy, přídavky stopových prvků jsou zcela bez vlivu, přídavky fosfátů zvyšují růst kultury, ale zpomalují tvorbu penicilinu, zvýšení teploty o 3° nad optimum, tj. na 28 °C zrychluje růst, ale pouze do 15. hodiny fermentace, pak se vyrovnává s růstem kultury, která je kultivována při 25 °C, začátek tvorby penicilinu však zvýšením teploty urychlen není.

Významným činitelem ovlivňujícím intenzitu růstu v počátečních hodinách fermentace jsou podmínky fermentace, tj. míchání, resp. počet otáček za minutu, velikost výstředníku rotačního třepacího stroje, zarážkování fermentačních baněk a objem půdy. Nejmarkantnější difference v intenzitě růstu podmíněné změnami podmínek fermentace jsou uvedeny v grafu 5. V zásadě

Obr. 5. Vliv mechanických faktorů na růst

lze říci, že čím je míchání šetrnější, tím je dosaženo intenzivnějšího růstu, s výjimkou nejnižších otáček, při kterých je třeba pro dosažení maximálního růstu zvýšit intenzitu míchání použitím zarážkovaných baněk. Bylo prokázáno, sledováním uvolněných nukleotidů z mycelia, že při intenzivním míchání, jsou-li k fermentaci použity třízarážkové baněky, je mycelium poškozeno nejvíce. Pokud jde o start tvorby penicilinu, je situace protichůdná s růstem. Biosyntéza penicilinu, a to i ve sledovaných počátečních hodinách fermentace, je striktně závislá na dostatečném přenosu kyslíku. Není-li zajištěn intenzivní přísun kyslíku, vznikající mycelium, byť mělo vyhovující růstové parametry, produkuje penicilin minimálně (graf 6). V těchto pokusech bylo rozdílného přenosu kyslíku dosaženo změnou počtu otáček, výstředníku a objemu fermentační kapaliny.

Na závěr lze říci, že byly nalezeny podmínky, které ovlivňují růstovou rychlost mycelia a biosyntézu penicilinu.

linu v průběhu počáteční fáze fermentace. Téměř všechny poznatky lze prakticky využít při fermentacích v tančích.

Obr. 6. Vliv přenosu kyslíku na biosyntézu penicilinu

Literatura

- [1] LURIE, L. M. et al.: *Artibiotiki* 22, 1978, č. 1, s. 3—7
- [2] STOUTHAMAR, A. H.: *GIM 3rd Int. Symp. Genet. Industr. Microorg.*, Madison, USA, June 4—9, 1979, Proc., p. 71—76, 1979
- [3] BAIJAI, R. K. a REUSS, M.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 39, 1980, č. 6, s. 332—344
- [4] CAIAM, CH. a ISMAIL, B.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 39, 1981, č. 5, s. 249—262
- [5] MARTIN, J. P. a DEMAINE, A. L.: *Microbiol. Rev.* 44, 1980, č. 2, s. 220—251

Matelová V.: Regulace růstu produkčního kmene a biosyntézy penicilinu v počátečních hodinách fermentace. *Kvas. prům.* 31, 1985, č. 9, s. 206—208.

Autorka zjistila podmínky, kterými lze řídit růstovcu rychlost mycelia a biosyntézy penicilinu v počátečních hodinách fermentace.

Мателова, В.: Регулирование роста продукционного штамма и биосинтеза пеницилина в начальные часы процесса ферментации. *Квас. прум.* 31, 1985, № 9, стр. 206—208.

Найдены условия, при помощи которых можно управлять скоростью роста мицелия и биосинтеза пеницилина в начальные часы процесса ферментации.

Matelová, V.: Control of Growth and Penicillin Biosynthesis of Production Strain During Initial Hours of Fermentation. *Kvas. prům.* 31, 1985, No. 9, pp. 206—208.

The author found conditions by which a growth rate of mycelium and biosynthesis of penicillin during the early hours of fermentation can be controlled.

Matelová, V.: Regulierung des Wachstums des Produktionsstammes und der Biosynthese des Penizillins während der Anfangsstunden der Fermentation. *Kvas. prům.* 31, 1985, Nr. 9, S. 206—208.

Die Autorin erörtert aufgrund experimentaler Arbeit die Bedingungen, durch die man die Wachstumsgeschwindigkeit des Myzeliums und der Biosynthese des Penizillins in den ersten Fermentationsstunden regulieren kann.