

Viabilita spór *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005

663.11

Dr. VALTER VOLLEK, Doc. Ing. BOHUMIL ŠKÁRKA, DrSc., Ing. MARGITA ČANIGOVÁ, Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: spóry, viabilita, *Aspergillus oryzae*, amylolytický enzým, aktivita, fyziológia, resuscitačná fáza

Dopyt nášho potravinárskeho priemyslu po vysokoaktívnych amylolytických enzýmoch a nutnosť ich dovozu zo zahraničia nás pred časom podnietili k skúmaniu možnosti zvýšenia produkcie amyláz u existujúcich producentov a zároveň venovať sa vyhľadávaniu a izolácii amylázy produkujúcich mikroorganizmov, hlavne húb. Za relatívne krátky čas sa nám podarilo izolovať z prírodných substrátov, obsahujúcich škrob, dva kmene húb s vysokou produkciou α -amylázy a glukoamylázy, *Aspergillus niger* IV-123, CCM F 801 a *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005 [1, 2, 3], o ktorých sme referovali v odbornej tlači.

V rámci optimalizácie kultivačného procesu, kultivačného média a stanovenia základných morfológických a fyziologických vlastností kmeňa *Aspergillus oryzae* CCM 8005 sme sledovali aj viabilitu spór a vplyv ich veku na schopnosť klíčiť, rásť na tuhom médiu a produkovať amylolytické enzýmy, hlavne α -amylázu a glukoamylázu pri submerznej kultivácii v produkčnom médiu. O získaných výsledkoch našej práce v stručnosti referujeme v tomto článku.

MATERIÁL A METÓDY

Použitá kultúra

V pokuse sme použili 14; 10; 5; 4; 2 a 1 mesačnú a 2 týždňovú kultúru *Aspergillus oryzae* CCM 8005, udržiavanú na šikmom sladinkovom agare v chladničke pri $+5^{\circ}\text{C}$.

Sledovanie klíčovosti konidií

Na sledovanie klíčenia konidií sme ako médium použili 1% peptónovú vodu (Neopeptón Difco v destilovanej vode), rozplnili po 50 ml do 100 ml baničiek a sterilizovali 20 minút pri 115°C . Médium sme naočkovali dvomi kľučkami spór, 1 hodinu trepali na reciprokej trepačke a uložili do termostatu s teplotou 28°C . Po 24 h inkubácii sme z každej spórovej suspenzie pripravili 5 mikroskopických preparátov. Z každého preparátu sme pri zväčšení 600krát spočítali spóry (zvlášť klíčiace a zvlášť neklíčiace) v 10 zorných poliach, spolu teda v 50 zorných poliach a vypočítali percento klíčiacych spór.

Rýchlosť rastu kultúr na tuhom médiu

Viabilitu konidií sme ďalej sledovali podľa rýchlosti

rastu kultúr na sladinkovom a Czapek-Doxovom agare. Použili sme Czapek-Doxov agar od firmy Imuna, Š. Mičaľany a sladinkový agar podľa predpisu:

sladinový koncentrát	60 g
Oxoid agar N = 3	15 g
vodovodná voda	1 l

pH obidvoch médií sme upravili na 6,8, sterilizovali sme 20 min pri teplote 121°C . Kultivačné média sme rozplnili do Petriho misek o priemere 100 mm. Zo sledovaných kultúr sme pripravili v 1 ml sterilnej destilovanej vody s prídavkom 1 g.l^{-1} Tweenu 80 suspenzie spór, ktoré sme sterilnými kapilármi očkovali do stredu kultivačného média v Petriho miskách. Naočkované misky sme inkubovali v termostate s teplotou 28°C . Rast sme zisťovali meraním priemeru kolónií v 24hodinových intervaloch.

Sledovanie aktivity produkovaných amylolytických enzýmov

Na sledovanie aktivity α -amylázy a glukoamylázy, produkovaných mycéliom vyrasteným z rôzne starých spór, sme spóry inokulovali do média nasledovného zloženia:

NaNO_3	$3,0\text{ g.l}^{-1}$	vodovodnej vody
MgSO_4	$0,5\text{ g.l}^{-1}$	
KCl	$0,5\text{ g.l}^{-1}$	
FeSO_4	$0,01\text{ g.l}^{-1}$	
K_2HPO_4	$1,0\text{ g.l}^{-1}$	
CaCl_2	$0,5\text{ g.l}^{-1}$	
melasa	$2,0\text{ g.l}^{-1}$	
kukurličný šrot	$20,0\text{ g.l}^{-1}$	

pH = $6,8 \pm 0,2$, sterilizovali sme pri 121°C 20 min. Kultivovali sme v 100 ml média v 500 ml bankách na rotačnej trepačke (120 min^{-1}) pri 30°C . Aktivitu α -amylázy a glukoamylázy v kultivačnom médiu sme sledovali po 3, 4 a 5 dňoch kultivácie.

Stanovenie aktivity α -amylázy

Aktivitu α -amylázy sme stanovovali pomocou diagnostického tabletkového Spofa-testu, intenzitu modrého zafarbenia sme merali spektrofotometricky pri 620 nm. Z nameraných absorbancií sme aktivitu enzýmu odčítali z kalibračnej čiary a vyjadrili v nkat.ml^{-1} kultivačného média (výrobca Slovakoфарма Hlohovec).

Stanovenie aktivity glukamylázy

Aktivitu glukamylázy sme stanovovali glukamylázovým diagnostickým Spofa-S-testom po predchádzajúcej inaktivácii prítomnej α -amylázy. Z absorbancií nameraných spektrofotometricky pri 620 nm sme aktivitu glukamylázy odčítali z kalibračnej čiary a vyjadrili v nkat.ml^{-1} média (výrobca Agrogen JZD Slušovice).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Klíčivosť spór

Výsledky, získané pri sledovaní spór uvádzame v tab. 1. Uvedené hodnoty sú počty konídií z 50 zorných poli mikroskopu.

Tabuľka 1. Absolútny počet a percento klíčiacich, rôzne starých spór *Aspergillus oryzae* CCM 8005

Vek spór (mesiace)	Počet klíč. spór	(%)	Počet neklič. spór	(%)
14	0	0	414	100
10	50	15,9	263	84,10
5	89	29,37	214	70,63
4	69	35,75	124	64,25
2	74	39,36	114	60,64
1	156	61,17	99	38,83
0,5	377	80,38	92	19,62

Ako vidno z tabuľky, klíčivosť spór stúpa s ich klesajúcim vekom. Zatiaľ čo zo 414 spór starých 14 mesiacov za podmienok, ako je uvedené v kapitole Materiál a metódy, nezačala klíčiť ani jedna spóra, pri dvojmesačných spórach klíčilo asi 40 % spór a dvojtyždňových vyše 80 % spór. 14mesačné spóry začali klíčiť až po viac ako 48 h inkubácie. Vtedy ale mladšie spóry vytvárali už mohutné zhľuky mycélia, takže nebolo možné vzájomné porovnanie. Klíčivosť spór je jedným z charakteristických fyziologických znakov a závisí okrem iného od množstva vody vo vnútri spóry [4,5]. Je známe, že s vekom spór sa ich schopnosť klíčiť a rýchlosť ich klíčenia znižuje [6]; výsledky tohto pokusu sme viac-menej predpokladali.

Rýchlosť rastu kolónií na tuhých živných médiách

Rýchlosť rastu kultúr z rôzne starých spór sme sledovali meraním denných prírastkov kolónií počas 7 dní kultivácie, ako je uvedené v kapitole Materiál a metódy. Získané výsledky uvádzame v tab. 2 a 3.

Tabuľka 2. Rast kolónií *Aspergillus oryzae* CCM 8005 očkovaných rôzne starými spórmi na sladinkovom agare

Vek spór (mesiace)	Priemer kolónií (mm) za dni kultivácie						
	1	2	3	4	5	6	7
14	0	0	9,6	25,0	38,3	52,6	68,0
10	6,1	20,0	34,0	48,6	61,3	75,3	89,0
5	5,5	19,6	33,6	48,0	62,3	76,0	90,0
4	8,5	20,0	34,6	48,0	62,7	76,7	90,0
2	9,0	19,0	33,6	46,6	61,0	75,0	89,0
1	8,3	20,0	34,0	48,0	62,0	76,0	90,0
0,5	7,6	20,0	36,3	49,0	62,7	77,0	90,0

Tabuľka 3. Rast kolónií *Aspergillus oryzae* CCM 8005 očkovaných rôzne starými spórmi na Czapek-Doxovom agare

Vek spór (mesiace)	Priemer kolónií (mm) za dni kultivácie						
	1	2	3	4	5	6	7
14	0	0	13,0	27,0	38,0	52,0	66,0
10	5,3	21,3	36,3	54,3	65,6	80,0	94,0
5	6,6	21,6	38,3	52,0	67,0	80,0	94,0
4	8,3	22,3	39,3	52,6	68,0	80,6	95,0
2	8,0	20,6	37,3	52,3	66,6	77,3	90,0
1	8,3	20,0	34,0	48,0	62,0	76,0	90,0
0,5	9,0	22,3	38,6	53,3	68,0	82,0	96,0

Uvedené výsledky sú priemerom 6 paralelných pokusov. Ako vidno z výsledkov v tabuľkách 2 a 3, nie je rast kolónií, až na kolónie vyrastené zo 14mesačných spór, závislý od veku spór (inokula). Kolónie na obidvoch médiách rástli takmer rovnako rýchlo s priemernými dennými prírastkami $13,8 \pm 1,04$ mm na sladinkovom agare a $14,1 \pm 1,57$ na Czapek-Doxovom agare. Rozdiely v rýchlosti rastu kolónií z rôzne starých spór na obidvoch médiách neboli štatisticky významné ($P < 0,05$). O niečo rýchlejší rast na Czapek-Doxovom agare možno vysvetliť väčším množstvom (vyššou koncentráciou) utilizovateľných zdrojov dusíka a fosforu k množstvu (koncentracii) zdroja uhlíka v Czapek-Doxovej pôde ako v sladinke. Kolónie však mali relatívne riedke vzdušné mycélium a aj sporulácia bola slabšia ako pri kolóniách rastúcich na sladinkovom agare. 14mesačné spóry, ako najstaršie zo spór použitých v pokuse, mali proti ostatným resuscitačnú fázu 48 hodín. Po 48 hodinách spóry začali klíčiť, rýchlosť rastu kolónií dosiahla v ďalšom čase rýchlosť rastu ostatných kolónií a priemerné denné prírastky boli rovnaké.

Produkcia amylolytických enzýmov mycéliom vyrastelým z rôzne starých spór v kvapalnom médiu

Rast kultúr, očkovaných rôzne starými spórmi v kvapalnom kultivačnom médiu a produkciu amyláz sme sledovali meraním aktivity α -amylázy a glukamylázy po 3, 4 a 5 dňoch kultivácie. Získané výsledky, ktoré sú priemerom 6 paralelných pokusov, uvádzame v tab. 4 a 5.

Tabuľka 4. Aktivita α -amylázy produkovanej kultúrami *Aspergillus oryzae* CCM 8005, vyrastenými z rôzne starých spór

Vek spór (mesiace)	Aktivita α -amylázy (nkat.ml^{-1}) za		
	72 h	96 h	120 h
14	54,15	400,13	689,7
10	846,07	1023,18	945,41
5	875,05	857,51	1004,53
4	872,15	874,58	1001,39
2	749,04	859,05	949,11
1	947,26	1050,66	997,8
0,5	1049,04	1039,53	961,17

Tabuľka 5. Aktivita glukamylázy produkovanej kultúrami *Aspergillus oryzae* CCM 8005, vyrastenými z rôzne starých spór

Vek spór (mesiace)	Aktivita glukamylázy (nkat.ml^{-1}) za		
	72 h	96 h	120 h
14	16,96	88,42	147,83
10	249,67	237,18	232,59
5	192,83	203,52	195,86
4	241,40	224,23	208,44
2	199,80	209,08	231,58
1	203,94	209,43	187,55
0,5	187,69	229,28	232,46

Aktivita enzýmov produkovaných kultúrou zo 14mesačných spór je v zhode s klíčením a rastom týchto spór. V našich pokusoch sme zistili, že ku klíčeniu v peptónovej vode a rastu na tuhých živných médiách dochádza až po 48hodinovej kultivácii. Podobné pomery možno predpokladať v kvapalnom produkčnom médiu, a preto je produkcia enzýmu po 72 h mimoriadne nízka. Tento fakt sa zhoduje s poznámkami viacerých autorov [7,8]. Z ostatných skupín spór vyrastá mycélium, ktorého produkcia enzýmov je za sledovaný čas takmer rovnaká, iba 1mesačné a 0,5mesačné spóry vyrastajú v mycélium, ktoré po 72 h kultivácii produkuje α -amylázu o aktivite asi $1050 \text{ nkat.ml}^{-1}$ kultivačného média. Pri ďalšej kultivácii aj mycélium zo starších spór produkuje amylázu o celkovej aktivite okolo $1200 \text{ nkat.ml}^{-1}$, mycélium z 10mesačných spór produkuje α -amylázu s aktivitou 950 nkat.ml^{-1} , z 5mesačných a 4mesačných spór dokonca vyše $1000 \text{ nkat.ml}^{-1}$. Naproti tomu medzi aktivi-

tou produkovanej glukamylázy a vekom spór, použitých na inokuláciu niet nijakej závislosti (viď tab. 5).

V pokusoch sme zistili, že aj mycélium vyrastené zo spór starších ako 1 mesiac, ktoré sme v pokusoch doteraz vždy používali, produkuje α -amylázu a glukamylázu v pomere 3,5 : 1 až 5 : 1. Tento pomer sme doteraz zistili pri všetkých našich pokusoch [1, 2, 3]. Výnimkou, zistenou v tejto sérii pokusov, je mycélium, vyrastené zo 14mesačných a 10mesačných spór, ktoré produkuje α -amylázu a glukamylázu v pomere 3,3 : 1.

ZÁVER

Záverom možno konštatovať, že spóry ani po 14 mesiacoch udržiavania na šikmom sladinkovom agare pri + 5 °C nestratili schopnosť klíčiť, rásť a tvoriť mycélium schopné produkcie amylolytických enzýmov. 14mesačné spóry však potrebovali 48hodinovú resuscitačnú fázu, ktorá pri ostatných mladších v pokuse použitých spórach nebola potrebná. Okrem už spomenutých 14mesačných všetky zvyšné skupiny spór klíčili a rástli do 24 hodín a mycélium z nich vyrastené produkovalo amylolytické enzýmy o aktivite okolo 1 000—1 200 nkat.ml⁻¹ kultivačného média.

Literatúra

- [1] VOLLEK, V. - MAJERÍKOVÁ, I. - ŠKÁRKA, B.: A new amylases producing strain of *Aspergillus niger*. In: 4th Symposium of the socialist countries on biotechnology 26.—30. may 1986, Varna, Abstracts.
- [2] VOLLEK, V. - MAJERÍKOVÁ, I. - ŠKÁRKA, B.: Prům. potr., 38, 1987, s. 244.
- [3] VOLLEK, V. - ŠKÁRKA, B. - MAJERÍKOVÁ, I. - ČANIGOVÁ, M.: *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005 — nový producent amyláz. Bulletin PV (v tlači).
- [4] ARX, J. A. von: Pilzkunde, 3301, Lehre, 1986, s. 356.
- [5] YODER, D. L. - LOCKWOOD, J. L.: J. Gen. Mikrobiol., 74, 1973, s. 107.
- [6] ALEXANDER, M.: Microbial ecology. J. Wiley and Sons Inc., New York, 1971, s. 511.
- [7] KALAŠNIKOV, E. J. - LIFSČ, D. B. - TRAININA, T. J.: Mikrobiologija, 29, 1960, s. 899.
- [8] KELLY, C. T. - MORIARTY, M. E. - FOGARTY, W. M.: Microbiol. Biotechnol., 22, 1985, s. 352.

Lektoroval dr. František Směkal, CSc.

Vollek, V. — Škárka, B. — Čanigová, M.: Viabilita spór *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005. Kvas. prům., 34, 1988, č. 5, s. 138—140.

Sledovali sme viabilitu spór produkčnej kultúry *Aspergillus oryzae* CCM 8005 a vplyv veku spór na aktivitu amylolytických enzýmov, produkovaných mycélium, vyrasteným z týchto spór. Sledovali sme vlastnosti 14; 10; 5; 4; 2; 1 a 0,5mesačných spór. Zistili sme, že všetky, s výnimkou 14mesačných spór, majú zachované všetky fyziologické vlastnosti, klíčia a rastú na tuhých kultivač-

ných médiach a produkujú amylázy o celkovej aktivite 1 000—1 200 nkat.ml⁻¹ kultivačného média. 14mesačné spóry majú oproti ostatným sledovaným skupinám 48hodinovú resuscitačnú fázu.

Воллек, В. — Шкарка, Б. — Чанигова, М.: Виабильность спор *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005. Квас. прум., 34, 1988, № 5, стр. 138—140.

Авторы исследовали виабильность спор штамма *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005 и влияние возраста спор на активность амилолитических энзимов производимых мицелием, выращенным из этих спор. Изучались свойства 14, 10, 5, 4, 2 и 0,5-месячных спор. Было найдено, что все они (за исключение 14-месячных спор) сохранили все физиологические свойства, всходят и растут на твердой культуральной среде и выделяют амилазы с суммарной активностью 1000—1200 нкат.мл⁻¹ культуральной среды. 14-месячные споры в отличие от остальных изучаемых групп имеют двусуточную фазу ресусци- тации.

Vollek, V. — Škárka, B. — Čanigová, M.: Spores Viability of *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005. Kvas. prům., 34, 1988, No. 5, pp. 138—140.

The spore viability of the production strain of *Aspergillus oryzae* CCM 8005 and the effect of the spore age on the activity of amylolytic enzymes produced by mycelium grown from these spores were studied. The age of spores tested was: 14, 10, 5, 4, 2, 1 and 0,5 months. Except of the 14 month's age, all other spores kept all their physiological properties and were able to grow on solid culture media and produced amylases of the whole activity of 1000—1200 nkat.ml⁻¹ of the cultivation medium. With the spores of 14 month's age a 48 h resuscitative phase was needed in comparison to other spores tested.

Vollek, V. — Škárka, B. — Čanigová, M.: Viabilität der Sporen von *Aspergillus oryzae* IV-477, CCM 8005. Kvas. prům., 34, 1988, Nr. 5, S. 138—140.

Die Autoren verfolgten die Viabilität der Sporen der Produktionskultur *Aspergillus oryzae* CCM 8005 und den Einfluß des Sporenalters auf die Aktivität der Enzyme, die durch das aus diesen Sporen ausgewachsene Myzelium produziert wurden. Es wurden die Eigenschaften der Sporen im Alter von 14, 10, 5, 4, 2, 1 und 0,5 Monate verfolgt. Es wurde festgestellt, daß mit Ausnahme der 14monatlichen alle Sporen ihre sämtliche physiologische Eigenschaften behalten, keimen, auf festen Kultivationsmedien wachsen und Amylasen mit einer Gesamtaktivität von 1000—1200 nkat.ml⁻¹ des Kultivations-Mediums produzieren. Die 14monatliche Sporen haben eine 48-stündige Ressuszitationsphase.