

Vplyv kvantitatívnych a kvalitatívnych zmien inokula na aktivitu produkovanej α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005

579 633

NDr. VALTER VOLLEK, Prof. Ing. BOHUMIL ŠKÁRKA, DrSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Chemickotechnologickej fakulty SVŠT, 812 37 Bratislava,

Kľúčové slová: kultivácia, *Aspergillus oryzae*, α -amyláza, inokulum, rast, aktivita

ÚVOD

V roku 1988 sme referovali o izolácii, vlastnostiach a viabilite nami izolovaného kmeňa *Aspergillus oryzae* CCM 8005, producenta enzýmov amylolytického komplexu, hlavne však α -amylázy a glukooamylázy [1, 2]. Pred zahájením štváriprevádzkových a poloprevádzkových pokusov v poloprevádzkovej jednotke Slovenských škrobární, š.p. Trnava, závod Dolná Krupá a v JZD Agro-kombinát Slušovice, závod BIO II Hrobice, kde sme náš produkčný kmeň pokusne kultivovali v 150 l fermentorochoch, sme stáli pred problémom voľby množstva a formy inokula. Urobili sme preto dve skupiny pokusov, pri ktorých sme najprv chceli zistiť vplyv množstva spór v spórovej inokulačnej suspenzii na produkciu a aktivitu α -amylázy. V druhej skupine pokusov sme porovnávali navzájom produkciu a aktivitu α -amylázy pri očkovaní produkčného média spórovou suspenziou a vegetatívnym inokulom.

O výsledkoch našej práce referujeme v tomto článku.

MATERIÁL A METÓDY

1. Produkčný kmeň. Na pokusy sme použili nami izolovaný kmeň *Aspergillus oryzae* IV - 477, CCM 8005.

2. Kultivačné médiá: Na získanie inokulačných konidií sme produkčný kmeň kultivovali na sladinkovom agare [60 g sladínového koncentráta.l⁻¹]. Vegetatívne inokulum sme získali kultiváciou kmeňa v nasledovných médiách:

YD médium:	kvasničný autolýzát	10 g
	glukóza	20 g
	vodovodná voda	1 l
	pH 6,8; sterilizácia 15 min pri 121 °C	
N médium:	NaNO ₃	3 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	KCl	0,5 g
	MgSO ₄	0,5 g
	CaCl ₂	0,5 g
	FeSO ₄	0,01 g
	melasa	2,5 g
	kukurický šrot	20 g
	vodovodná voda	1 l
	pH 6,8; sterilizácia 20 min pri 121 °C	

Na kultiváciu produkčného kmeňa na získanie amylolytických enzýmov sme používali rovnako médium N.

3. Príprava inokula

a) Konidié na inokuláciu sme získali tak, že sme v Petriho miske na 1,5 mm hrubej vrstve sladinkového agaru kultivovali produkčný kmeň až do vytvorenia mycélia s vysporulovanými fruktifikačnými štruktúrami. Z vrstvy agaru s kultúrou sme sterilnými korkovrtmi vyrezali kolieska o ploche 1,3 cm², 0,8 cm², 0,5 cm² a 0,12 cm². Na inokuláciu 100 ml produkčného média N

v 500 ml baňkách sme použili vždy jedno koliesko rôznej veľkosti s vysporulovanou kultúrou. Kultivovali sme na rotačnej trepačke [120 min⁻¹] pri teplote 30 °C. Za účelom porovnania počtu spór sme v Bürkerovej komôrke zráтали počet konidií na jednotlivých kolieskach po ich hodinovom trepaní vo fyziologickom roztoku s prídavkom 0,1 % Tween 80.

b) Vegetatívne inokulum sme pripravovali jednak v YD médiu, jednak v N-médiu. 100 ml média (YD alebo N) v 500 ml baňkách sme inokulovali jedným kolieskom sladínového agaru s vyrastenou a vysporulovanou kultúrou a kultivovali sme 48 a 72 hodín na rotačnej trepačke [120 min⁻¹] pri teplote 30 °C. Takto pripravené inokulum sme pridávali v množstve 5 a 10 ml do 100 ml produkčného média N v 500 ml baňkách a kultivovali sme za rovnakých podmienok ako v bode a. Aktivitu produkovanej α -amylázy sme stanovovali po 72, 96 a 120hodinovej kultivácii.

4. Stanovenie aktivity α -amylázy. Na stanovenie aktivity produkovanej α -amylázy sme používali α -amylázový Spofa-S-test. Aktivitu sme stanovili v citrát-fosfátovom tmivom roztoku o pH 5,25 pri teplote 44 °C. Intenzitu vzniknutého modrého sfarbenia roztoku sme merali spektrofotometricky pri 620 nm a z nameranej absorbancie sme aktivitu enzýmu odčítali z kalibračnej čiary.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky, získané v 12 paralelných pokusoch so spórovým inokulom uvádzame v tabuľke 1. Ako kontrolu sme zvolili aktivitu α -amylázy vyprodukovanej v médiu naočkovanom kolieskom s najväčším počtom konidií [1,45 . 10⁷] po 72hodinovej kultivácii. Ako vyplýva z výsledkov uvedených v tabuľke, má počet spór, použitých ako inokulum do 100 ml média na produkciu α -amylázy, iba malý vplyv. Je to pravdepodobne spôsobené tým, že α -amyláza tak ako ostatné fungálne enzýmy sú produkované rastúcimi hýfami, pričom nižší počet spór v inokulačnej spórovej suspenzii (v prípadoch použitia koliesok s plochou 0,5 a 0,12 cm²) je kompenzovaný rýchlejšim rastom, prípadne väčšou dĺžkou vyrastených hýf, takže rozdiely medzi aktivitami produkovanej α -amylázy sú malé. Po trojdňovej kultivácii sú rozdiely v aktivite α -amylázy produkovanej mycéliom vyrasteným z 9,8 . 10⁶ a z 4,7 . 10⁶ spór 32 a 20 % oproti kontrole, pri počte 2,5 . 10⁶ spór je aktivita α -amylázy o 25 % nižšia proti kontrole. Po štyroch dňoch kultivácie boli rozdiely oveľa menšie, pričom absolútne stúpla aktivita α -amylázy o 63,2 %.

Pri sledovaní vplyvu vegetatívneho inokula na aktivitu produkovanej α -amylázy sme použili na očkovanie 100 ml produkčného média N jednak 5 a 10 ml inokula vyrasteneho v YD médiu, jednak 5 a 10 ml inokula vyrasteneho v médiu N. V oboch prípadoch sme použili inokulum dvojdnové aj trojdňové. Cieľom pokusu bolo zistiť vhodnosť mladšieho alebo staršieho inokula. V pod-

Tab. 1. Závislosť aktivity α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005 od množstva použitého inokula

Inokulum	Plocha	(%)	Počet	(%)	Aktivita α -amylázy po 72 h		Aktivita α -amylázy po 96 h	
					(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)
1 (K)	1,3	100	1,45 . 10 ⁷	100	970,21	100	1095,17	100
2	0,8	61	9,8 . 10 ⁶	67,5	657,93	67,8	974,54	88,0
3	0,5	38	4,7 . 10 ⁶	32,0	781,04	80,5	994,09	90,77
4	0,12	9,2	2,5 . 10 ⁶	17,0	726,10	74,33	1077,46	98,38

Tab. 2. Vplyv dvojdnového vegetatívneho inokula na aktivitu α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005

Inokulum	Aktivita produkovanej α -amylázy (nkat . ml ⁻¹) za h kultivácie					
	72		96		120	
	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)
K (spóry)	830,42	100	921,22	100	1051,59	100
YD 5	602,30	72,52	718,21	77,96	720,07	68,47
YD 10	498,43	60,02	649,59	70,51	638,92	60,75
N 5	651,45	78,44	649,59	70,51	640,55	60,91
N 10	465,51	56,05	561,49	60,95	667,67	63,49

Tab. 3. Vplyv trojdňového vegetatívneho inokula na aktivitu α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005

Inokulum	Aktivita produkovanej α -amylázy (nkat . ml ⁻¹) za h kultivácie					
	72		96		120	
	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)	(nkat . ml ⁻¹)	(%)
K (spóry)	882,81	100	921,22	100	1051,59	100
YD 5	773,39	87,6	733,97	79,67	816,05	77,6
YD 10	575,40	65,17	606,5	65,83	630,58	59,96
N 5	635,68	72,0	612,03	66,43	619,06	58,86
N 10	555,47	62,92	595,81	64,67	660,26	62,78

mienkach experimentu nebolo možné určiť ani počet buniek ani sušinu biomasy inokula, nakoľko v médiu bol hrubozrnný kukuričný šrot.

Kultivovali sme na rotačnej trepačke (120 min⁻¹) pri teplote 30 °C a aktivitu α -amylázy sme stanovili po 72, 96 a 120 hodinách kultivácie. Ako kontrolu sme použili 100 ml produkčného média N inokulovaného jedným kleskom s vysporulovanou kultúrou o ploche 1,3 cm² (1,45 · 10⁷ konídií).

Výsledky pokusov, získané pri inokulácii produkčného média vegetatívnym inokulom sú priemerom z dvanásť paralelných pokusov a uvádzame ich v tabuľkách 2 a 3.

Pri porovnaní výsledkov, uvedených v tabuľkách 2 a 3 s výsledkami v tabuľke 1 jednoznačne vyplýva, že aktivita α -amylázy v médiu očkovanom vegetatívnym inokulom je všeobecne nižšia ako v prípade očkovania spórovým inokulom. Na základe opakovaných pokusov je možné pokúsiť sa tento jav vysvetliť tak, že kultúra, použitá ako inokulum má 48, resp. 72 hodín, a teda fyziologicky staršia ako mycélium vyrastajúce zo spór a je menej schopná rásť a produkovať enzým ako mycélium vyrastajúce priamo z konídií [3]. Druhá možnosť je, že spolu s inokulom, pripravenom v YD médiu, sa do produkčného média prenieslo určité množstvo glukózy, ktorá spočiatku (až do spotrebovania) pôsobí na produkciu α -amylázy inhibične [4]. Je však pravdepodobné, že na nižšej produkcii enzýmu v prípade očkovania vegetatívnym inokulom participujú obidva tieto faktory. V tejto sérii pokusov sme najlepšie výsledky dosiahli pri použití trojdňového vegetatívneho inokula vyrasteného v YD médiu a síce v množstve 5 ml. Rozdiel medzi aktivitou enzýmu v tomto pokuse a v kontrole je len 12,4 %, zatiaľ čo pri použití 10 ml inokula je rozdiel už takmer 25 %. Tento fakt hovorí v prospech inhibície produkcie α -amylázy glukózou (zistili sme, že v inokulu počas trojdňovej kultivácie poklesne obsah glukózy z 2 % na 0,05 %). V ostatných pokusoch sme dosiahli aktivitu α -amylázy od 56 do 79 % hodnoty kontroly. Z výsledkov ďalej vyplýva, že na prípravu vegetatívneho inokula je vhodnejšie YD médium ako produkčné médium N.

Literatúra

- [1] VOLLEK, V. et al.: Bulletin PV 27 (7) 1—2, 1988, s. 113
- [2] VOLLEK, V., ŠKÁRKA, B., ČANIGOVÁ, M.: Kvas. prům. 34, 1988, s. 138
- [3] ALEXANDER, M.: Microbial ecology. J. Wiley and Sons Inc. New York 1971, s. 511
- [4] KOSARIK, N. et al.: Etanol fermentation. In: Biotechnology, Weinheim, 1983, s. 257

Lektorovala doc. Ing. K. Demnerová, DrSc.

Vollek, V. - Škárka, B.: Vplyv kvantitatívnych a kvalitatívnych zmien inokula na aktivitu produkovanej α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Kvas. prům., 36, 1990, č. 6, s. 169—171.

V práci sme sledovali vplyv rôzneho množstva spórového inokula a rôzneho množstva a kvality vegetatívneho inokula na produkciu α -amylázy *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Zistili sme, že produkcia α -amylázy je jednoznačne vyššia pri očkovaní spórovým inokulom. Po 96hodinovej kultivácii bol rozdiel aktivity α -amylázy, produkovanej maximálnym a minimálnym inokulom iba 1,4 %. Pri použití vegetatívneho inokula sme dosiahli najlepšie výsledky s trojdňovým inokulom pripraveným v YD médiu, a síce 87,6 % kontroly po 72hodinovej kultivácii. V ostatných pokusoch bola aktivita produkovanej α -amylázy od 56 do 79 % kontroly.

Воллек, В. - Шкарка, Б.: Влияние количественных и качественных изменений инокулы на активность образующейся α -амилазы *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Квас. прум. 36, 1990, № 6, стр. 169—171.

В работе нами исследовано влияние разного количества инокулы спор и разного количества и качества вегетативной инокулы на продукцию α -амилазы *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Нами установлено, что продукция α -амилазы однозначно более высока при инокуляции инокулой спор. После 96-часовом культивировании наблюдались разницы активности α -амилазы, производимой максимальной и минимальной инокулой, составляющие только 1,4 %.

Vollek, V. - Škárka, B.: Effect of Quantitative and Qualitative Changes of Inoculum on the Activity of α -Amylase Produced by *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Kvas. prům., 36, 1990, No. 6, pp. 169—171.

The production of α -amylase formed by *Aspergillus oryzae* CCM 8005 was measured with the different quantity of different inoculum types. The different inoculum used were: the vegetative one and spores. Using spores for the inoculation a higher quantity of α -amylase was achieved. The difference in the quantity of α -amylase observed with the maximum or minimum inoculation after 96 h of the culture was 1,4 %. The best results obtained with the vegetative inoculum were achieved in the YD medium after 72 h of the culture. The inoculum proper was cultured three days. The quantity of α -amylase was 87,6 % of the standard value. In other experiments the activity of α -amylase produced was in a range of 56 and 79 % of the standard value.

Vollek, V. - Škárka, B.: Einfluß der quantitativen und qualitativen Veränderungen des Inoculum auf die Aktivität der produzierten α -Amylase bei *Aspergillus oryzae* CCM 8003. Kvas. prům. 36, 1990, Nr. 6, S. 169—171.

Die Autoren studierten den Einfluss von verschiedenen Mengen eines Sporeninokulums und verschiedenen Mengen und Qualität zwei und drei Tage alten vegeta-

tiven Inokulums auf die Produktion und Aktivität der produzierten α -Amylase bei *Aspergillus oryzae* CCM 8005. Es wurde festgestellt, dass der Unterschied in der Aktivität der α -Amylase bei allen benützten Konzentrationen des Sporeninokulums maximal 12 % ist. Bei der Impfung mit dem vegetativen Inokulum erreichten Autoren die besten Resultate bei der Benutzung des 5 % dreitägigen Inokulums aus dem YD Medium.

Metabolismus dusíku u průmyslově významných streptomycet

579 663

Regulace syntézy antibiotik zdrojem dusíku

Ing. IVANA VANČUROVÁ, Ing. VLADISLAV BĚHAL, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV

Ing. ALEŠ VANČURA, Vysoká škola chemickotechnologická, katedra kvasné chemie a bioinženýrství, Praha

Klíčová slova: kultivace, antibiotika, katabolická regulace, metabolismus dusíku, sekundární metabolismus, streptomycety, amonné ionty

Stejně jako rychle utilizovatelné zdroje uhlíku a anorganický fosfát, tak také rychle utilizovatelné zdroje dusíku inhibují u streptomycet biosyntézu mnoha sekundárních metabolitů. Vliv zdroje dusíku na mikrobiální producenty sekundárních metabolitů je mnohostranný. Kromě regulace rychlosti růstu a s tím spjatých dějů (proteosyntéza, syntéza nukleových kyselin, vznik energie) působí na syntézu enzymů podílejících se na vzniku prekursorů sekundárních metabolitů i na syntézu vlastních enzymů sekundárního metabolismu.

Klasickým příkladem je biosyntéza streptomycinu u *Streptomyces griseus*, kde se jako nejlepší zdroj dusíku ukázal být pomalu utilizovaný prolin [1]. Inhibice amonnými ionty byla prokázána též u *S. clavuligerus*, produkujícího β -laktámové antibiotikum cefalosporin [2]; inhibice produkce cefalosporinu však byla zaznamenána pouze tehdy, jestliže byly amonné ionty přidány do kultivačního média do 24 h kultivace, ještě před začátkem syntézy cefalosporinu. Proto se zřejmě nejedná o inhibici enzymů syntetizujících dané antibiotikum, ale o represii jejich syntézy již na samém začátku kultivace. K represii enzymů syntetizujících β -laktámy amonnými ionty docházelo i v případě biosyntézy cefamycinu u *S. lactamdurans* [3] a u *S. clavuligerus* [4]. Žádný z těchto enzymů však nebyl amoniakem inhibován *in vitro*, což svědčí pro mechanismus represe na transkripční či translační úrovni. Inhibice enzymu sekundárního metabolismu amonnými ionty byla pozorována v případě anhydrotetracyklinoxigenasy (EC 1.13.12) [5], předposledního enzymu tetracyklinové biosyntetické dráhy u *S. aureofaciens*. Také biosyntéza tetracyklinu je reprimována zvýšenou koncentrací amonných iontů v kultivačním médiu [6].

Jiným mechanismem, jakým amonné ionty mohou ovlivňovat biosyntézu sekundárních metabolitů, je regulace syntézy prekursorů pro biosyntézu daného antibiotika. To bylo prokázáno v případě chloramfenikolu u *S. venezuelae* [7] a aktinomycinu D [8], jehož biosyntéza je inhibována prostřednictvím represe syntézy tryptofanu amonnými ionty. Rovněž produkce veterinárního antibiotika tylosinu u *S. fradiae* je inhibována přidáním amonných iontů do fermentačního média [9—12]. Bylo zjištěno, že amonné ionty působí na syntézu stavebních jednotek, avšak nepůsobí na jejich kondenzaci za vzniku protylonolidu, aglykonu tylosinu, ani na konverzi protylonolidu na tylosin. Při studiích s blokovými mutanty byla produkce protylonolidu klidovými buňkami *S. fradiae* na médiu s valinem nebo sukcinátem mnohem nižší, než když buňky byly předtím nakultivovány na médiu s vyšším obsahem amonných iontů. Avšak inhibice tvorby protylonolidu byla odstraněna přidáním acetátu, propionátu a butyrátu. Vzhledem k tomu, že protylonolid obsahuje n-butyřátovou stavební jednotku, která je odvozena z metabolismu L-valinu, byl v této souvislosti studován vliv amonných iontů. Bylo zjištěno, že syntéza valindehydrogenasy (EC 1.4.1.8) je reprimována amonnými ionty a že se tento enzym pravděpodobně podílí na zprostředkování inhibičního účinku amonných iontů na biosyntézu tylosinu. S těmito

údaji je v souladu zjištění Vu-Tronga a Graye [13], že amonné ionty inhibují syntézu tylosinu pouze tehdy, jsou-li přidány do kultivačního média na začátku fermentace; jsou-li přidány až v produkční fázi, jsou neúčinné.

Také biosyntéza oligoketidového antibiotika gilvokarcinu V, produkovaného *S. arenae* 2064 [14], je reprimována amonnými ionty v koncentraci vyšší než 1,5 mmol. Na druhé straně, syntéza tohoto antibiotika je stimulována kyselinou asparagovou a glycinem, glykogenními aminokyselinami, které mohou snadno poskytovat acetyl-CoA. Je tedy možné, že i v tomto případě se jedná o inhibiční účinek amonných iontů založený na represii vzniku prekursorů.

V této souvislosti může být zajímavé srovnání inhibičního účinku amonných iontů na biogeneticky rozdílné typy antibiotik. Zatímco u *S. clavuligerus* [2] je maximální produkce cefalosporinu dosaženo při koncentraci amonných iontů 20 mmol a při koncentraci 40 mmol je produkce cefalosporinu inhibována pouze o 10 %, je optimální koncentrace amonných iontů pro produkci gilvokarcinu V u *S. arenae* 1,5 mmol a při koncentraci 10 mmol dochází již k 60 % inhibici [14]. Také produkce tylosinu u *S. fradiae* je při koncentraci amonných iontů 20 mmol inhibována přibližně o 50 % [13]. Tuto rozdílnou citlivost β -laktámových a oligoketidových antibiotik k represii amonnými ionty lze vysvětlit buď působením na různé regulační úrovni nebo na úrovni syntézy jejich prekursorů — aminokyselin v případě β -laktámových antibiotik a ketokyselin v případě oligoketidů. Rovnováha mezi aminokyselinami a jejich ketoderiváty je v prostředí s vyšší koncentrací amonných iontů posunuta ve prospěch příslušné aminokyseliny. To může mít v případě oligoketidových antibiotik za následek nedostatek ketokyselin potřebných pro syntézu acyl-CoA, a tím i značně sníženou tvorbu daného oligoketidu, zatímco u β -laktámů lze některé aminokyseliny přímo použít pro biosyntézu antibiotika, což do určité míry může zmírnit negativní účinek amonných iontů. Rovnováhu mezi některými aminokyselinami a příslušnými ketokyselinami (alanin — 2-ketopropanoát, valin — 2-keto-3-methylbutanoát, leucin — 2-keto-4-methylpentanoát, isoleucin — 2-keto-3-methylpentanoát, 2-aminobutanoát — 2-ketobutanoát) v intracelulárním prostředí zajišťují jejich NAD-dependentní dehydrogenasy (alanindehydrogenasa [EC 1.4.1.1] a valindehydrogenasa — EC 1.4.1.8).

Vzhledem k tomu, že k průmyslové výrobě antibiotik a dalších sekundárních metabolitů se používají komplexní média, obsahující různé moučky a extrakty rostlinného i živočišného původu, je zapotřebí modelovat složení těchto médií i s ohledem na obsah a formu zdroje dusíku. V každém případě je však nutno počítat s tím, že s těmito přírodními materiály se do kultivačního média dostává i značné množství amonných iontů.

Z hlediska průmyslové výroby sekundárních metabolitů existují 3 obecné přístupy k eliminaci nebo zmírnění negativního účinku amonných iontů: