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 -laktamové 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 anhydrotetracyklinoxygenasy (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 přidáváním 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 blokováním mutanty byla produkce protylonolidu kladovými 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-butyrtovou 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 -laktamových 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 -laktamových 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:

1. Udržování nízké koncentrace amonných iontů v médiu postupným přidáváním po celou dobu kultivace.

2. Izolace mutantů se sníženou citlivostí k inhibičnímu účinku amonných iontů.

3. Přidáváním materiálu, vážícího amonné ionty, do kultivačního média.

V průmyslové praxi se nejčastěji používá 1. způsob, kdy se volí taková počáteční koncentrace zdroje dusíku, která neinterferuje se syntézou sekundárního metabolitu. Pro dosažení maximální produkce se potom v průběhu celé kultivace přidává vhodný dusíkatý zdroj, nejčastěji ve formě amonných iontů, tak, aby nebyla inhibována produkce. Vždy je však nutno experimentálně zjistit citlivost produkčního mikroorganismu k inhibičnímu vlivu amonných iontů.

Literatura

- [1] DULANEY, E. L.: J. Bacteriol. **56**, 1948, s. 305
- [2] AHARONOWITZ, Y. - DEMAIN, A. L.: Can. J. Microbiol. **25**, 1979, s. 61
- [3] CASTRO, J. M. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol. **21**, 1985, s. 32
- [4] DEMAIN, A. L. - BRANA, A. F.: Regulation of Secondary Metabolite Formation, 1. vyd. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1986, s. 77
- [5] BĚHAL, V. et al.: Biotechnol. Lett. **5**, 1983, s. 537
- [6] VANČUROVÁ, I. et al.: FEMS Microbiol. Lett. 1988,
- [7] SHAPIRO, S., VINING, L. C.: Can. J. Microbiol. **31**, 1985, s. 119
- [8] KATZ, E. et al.: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes, 1984, s. 325
- [9] OMURA, S., TANAKA, Y.: Regulation of Secondary Metabolite Formation, 1986, s. 77, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- [10] OMURA, S. et al.: J. Antibiot. **37**, 1984, s. 1362
- [11] VANČURA, A. et al.: FEMS Microbiol. Lett. **48**, 1987, s. 357
- [12] VANČURA, A. et al.: FEMS Microbiol. Lett. **49**, 1988, s. 411
- [13] VU-TRONG, K., GRAY, P. P.: Enzyme Microb. Technol. **9**, 1987, s. 590
- [14] BYRNE, K. M., GREENSTEIN, M.: J. Antibiot. **39**, 1986, s. 594

Lektoroval dr. F. Smékal, CSc.

Vančurová, I. - Vančura, A. - Běhal, V.: Metabolismus dusíku u průmyslově významných streptomycet. Regulace syntézy antibiotik zdrojem dusíku. Kvas. prům., **36**, 1990, č. 6, s. 171—172.

Produkce mnoha průmyslově významných antibiotik je negativně ovlivněna přítomností amonných iontů jako zdroje dusíku v kultivačním médiu. Mechanismus zahrnuje represi a inhibici enzymů účastnících se biosyntézy sekundárních metabolitů a inhibici na úrovni vzniku prekursorů.

Negativní účinek amonných iontů může být odstraněn třemi způsoby: 1. udržováním nízké koncentrace amonných iontů v médiu a postupným přidáváním během celé kultivace, 2. izolací mutant se sníženou citlivostí k inhibičnímu účinku amonných iontů a 3. přidáváním sorbentů vážících amonné ionty do kultivačního média.

Ванчуrowa, И. - Ванчуrowa, А. - Бегал, В.: Метаболизм азота промышленно значительных стрептомицетов. Ре-

гулирование синтеза антибиотиков источником азота. Квас. прум. **36**, 1990, № 6, стр. 171—172.

На продукцию многих промышленно значительных антибиотиков оказывает отрицательное действие присутствие аммониевых ионов как источника азота в культивационной среде. Механизм включает репрессию и ингибирование энзимов, участвующих в биосинтезе вторичных метаболитов, и ингибирование на уровне возникновения прекурсоров.

Отрицательное действие аммониевых ионов может быть устранено тремя способами: 1. поддержание низких концентраций аммониевых ионов в среде и постепенное добавление в течение целого процесса культивации; 2. изолирование мутантов с пониженной чувствительностью к ингибирующему действию аммониевых ионов и 3. добавка сорбентов, связывающих аммониевые ионы, в культивационную среду.

Vančurová, I. - Vančura, A. - Běhal, V.: Nitrogen Metabolism in Production Strains of Streptomycetes. Kvas. prům. **36**, 1990, No. 6, pp. 171—172.

A production of many industrially produced antibiotics is negatively affected by the presence of ammonia ions (nitrogen source) in the culture medium. The mechanism includes the repression and inhibition of enzymes taking part in the biosynthesis of secondary metabolites and the inhibition on the level of precursor formations. The negative effect of ammonia ions can be eliminated in three ways: 1. Keeping a low concentration of ammonia ions in the medium by their gradual addition. 2. Using mutants with the decreased sensitivity to the inhibitory effect of these ions. 3. Using sorbents in the culture medium for the adsorption of these ions.

Vančurová, I. - Vančura, A. - Běhal, V.: Stickstoff-Metabolismus bei industriell bedeutenden Streptomyceten. Regulation der Synthese der Antibiotica mittels Stickstoffquelle. Kvas. prům. **36**, 1990, Nr. 6, S. 171—172.

Die Produktion vieler industriell wichtiger Antibiotica wird in negativer Weise durch die Anwesenheit der Ammonium-Ionen als Stickstoffquelle im Kultivationsmedium beeinflusst. Der Mechanismus enthält die Repression und Inhibition der Enzyme, die sich an der Biosynthese der sekundären Metaboliten beteiligen und die Inhibition auf dem Niveau der Precursoren-Bildung.

Die negative Wirkung der Ammonium-Ionen kann durch drei Maßnahmen beseitigt werden: 1. Erhaltung einer niedrigen Konzentration der Ammonium-Ionen im Medium und fortlaufendes Zugeben während der ganzen Kultivierung; 2. Isolation von Mutanten mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber der Inhibitionswirkung der Ammonium-Ionen und 3. Zugabe von Sorbenten, welche die Ammonium-Ionen binden, in das Kultivationsmedium.

Z výrobních závodů

Současnost i historie

Spolek českých sládků při Plzeňských pivovarech v Plzni

Ustavující schůze Spolku českých sládků v Plzni schválila dne 26. 2. 1990 stanovy a programové zaměření spolku. Byl zvolen devítičlenný výbor, jehož předsedou se stal **Ing. Ivo Hlaváček**. Výbor byl zvolen na dvouleté období.

První odbornou akcí bylo Technologické odpoledne 25. dubna 1990 v pivovaru Gambrinus.

PROGRAMOVÉ ZAMĚŘENÍ SPOLKU ČESKÝCH SLÁDKŮ PŘI PLZEŇSKÝCH PIVOVARECH V PLZNI

Spolek českých sládků (dále Spolek) bude usilovat o odborný růst členů, umožňovat jejich systematický přístup k odborné literatuře a podporovat jejich uplatnění v praxi. Spolek bude zajišťovat zahraniční odborné kontakty svých členů s příp. studijními pobyty a stážemi.

Spolek bude společně s vedením Plzeňských pivovarů zajišťovat i samostatnou vydavatelskou praktickou čin-