

Jiří Stárka:

Tvorba amylolytických enzymů u *Aspergillus oryzae*

(Práce z mikrobiologického ústavu Karlovy university, Praha II, Viničná 5.)

Aspergillus oryzae (Ahlb.) Cohn isoľoval Ahlbürg r. 1878 z rýže při kvašení saké. Tato houba zařazená Thomem a Raperem (1945) do skupiny *Aspergillus flavus-oryzae* byla nejprve pokládána za bezvýznamnou. Vuillemin (1902) o ní pronesl úsudek, že „tato plíseň nenašla v průmyslu žádné uplatnění“, protože prý příliš rychle oxyduje a pomalu zcukřuje. Takový názor však nebyl oprávněný, protože již r. 1894 Takamine ohlásil první patenty, následované v pozdějších letech serií dalších, týkajících se přípravy a použití diastatických enzymů a výroby alkoholu ze zápar zcukřených právě na základě činnosti *Aspergillus oryzae*, který spolu s dalšími aspergily je hlavní součástí koji (kodži), což jest ve východní Asii obdoba našeho sladu, používaná od nepaměti.

Výroba amylolytických enzymů pomocí mikroorganismů a jejich použití při zcukřování škrobu našly své uplatnění v průmyslovém měřítku teprve v první světové válce, když byla hledána vhodná náhrada za slad. Dalšího rozvoje bylo dosaženo ve druhé světové válce, kdy byly zdokonaleny předpisy na provozní výrobu amylolytických preparátů především z *Aspergillus oryzae* a *A. niger* (Feníksova a Segal 1941, Hao, Fulmer a Underkoffler 1943). Protože plísnové amylolytické preparáty mají při výrobě alkoholu řadu předností před obilným sladem (ekonomičtější výroba, dlouhodobé skladování, větší výtěžnost alkoholu), jejich výroba je zaváděna a rozšiřována na celém světě. Též u nás bylo dosaženo slibných výsledků (Sova 1950, 1951) při zcukřování bramborových zápar.

Práci zabývající se průmyslovou produkcí plísnových amylas, vlastnostmi těchto enzymových preparátů a jejich použitím je velká řada (obšírnou bibliografii viz Thom a Raper 1945, Tauber 1949, Prescott a Dunn 1950, Bernhauer 1950 a Redfern 1950). Naproti tomu podmínkám, ovlivňujícím tvorbu těchto enzymů s hlediska fyziologického nebyla věnována zdaleka taková pozornost.

Amylolytická činnost nižších hub vůbec byla studována dosti nesoustavně. Went (1901) zjišťoval vliv živin na tvorbu enzymů u *Monilia sitophila* (Mont.) Sacc. (= *Neurospora sitophila*). Pozoroval, že produkce diastatických enzymů stoupá až do 5 % koncentrace škrobu v prostředí, další zvyšování má brzdivý vliv. Podrobněji sledovali tuto otázku Pantanelli a Bruschi (1910) u blíže neurčených kmenů z rodu *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus* a *Botrytis*. Během růstu docházelo jak ke kvalitativním, tak i kvantitativním změnám ve vylučování amylolytických enzymů do prostředí. Tato

pozorování stejně jako výsledky *Wentovy* potvrdil a doplnil *Kylin* (1914). Měnil zdroje dusíku a uhlíku v syntetickém mediu a stanovil, že k produkci amylasy dochází i za nepřítomnosti škrobu. Velký vliv mají zdroje dusíku a změny pH v prostředí. K podobným výsledkům došel i *Funk* (1923) ve svých pokusech s *Asp. niger*. Zvýšil-li koncentraci zdroje uhlíku (maltosy, glukosy, škrobu) nad 1 %, byla tvorba diastatických enzymů zastavena. Autor vysvětluje tento zjev vznikem „brzdících substancí“. Jestliže tyto substance zmizí, dojde k normální tvorbě diastasy v obvyklém množství. Tvorba amylolytických enzymů u *Asp. niger* a *Asp. oryzae* závisí na řadě vnějších faktorů. Při kultivaci za submersních podmínek (*Kleinzeller* a *Lacko* 1952) jsou to především koncentrace zdroje dusíku, fosfátů a hořčíku. Zvyšování koncentrace substrátu nad určitou mez (15 % škrobu) produkci nezvyšuje. Velmi záleží na poměru obsahu škrobu k obsahu dusíku v mediu, jak ukázali *Bindal* a *Sreenivasaya* (1945) a optimum našli 7 : 1. *Goodmann* (1950) zjišťoval tvorbu amylasy a lipasy u *Asp. flavus*, *A. terreus*, a *Penicillium sp.* a došel k závěru, že oba enzymy jsou tvořeny adaptivně, t. j. v přítomnosti specifického substrátu je tvořeno více enzymu. Zajímavé poznatky přinesla práce *Klimovského* a *Rodzeviče* (1950), kteří srovnávali větší počet jedinců z rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, při čemž konstatovali u aspergilů jednak větší rozmanitost v produkci amylasy, jednak i výskyt kmenů s kvantitativně nejvyšší tvorbou těchto enzymů. Při selekci nových průmyslově užitečných kmenů největší naděje slibují podle nich skupiny *Aspergillus niger* a *Aspergillus flavus-oryzae*. K opodobným závěrům dospěli i *Le Mense* a *spol.* (1947). *Feníksova* a *Dvácátová* (1952) při hledání nových amylolytických kmenů dosáhly nejvýhodnějších výsledků jak ve kvantitě tak i kvalitě produkovaného enzymu aplikací vegetativní hybridisace dvou kmenů *Aspergillus oryzae* a *A. niger*. Výsledný „hybridní“ kmen, získaný kultivací *Asp. niger* na buněčné šťávě z *Asp. oryzae*, měl vlastnosti obou výchozích a v hloubkové kultuře měl nejen vyšší aktivitu, ale i produkoval amylasu déle, rychle ztekucoval a zcukřoval, též aktivita maltasy byla vysoká.

Studium podmínek, ovlivňujících produkci amylolytických enzymů má tedy své uplatnění v praxi, ale i po teoretické stránce je zajímavé. Při vlastním řešení této otázky bylo proto dbáno obou hledisek. O výsledcích praktických, týkajících se přípravy enzymových preparátů z *Aspergillus oryzae* na otrubách a jejich použití při odstraňování škrobu z hydrolyzátní při výrobě pektinu byla již podána zpráva (*Stárka* 1952). Zůstávala však otevřena otázka, jak vypadá produkce enzymů během růstu v závislosti na změnách v prostředí a konečně i poměr mezi nahromadováním amylasy v myceliu a jejich exkrecí do media.

Materiál a metodika.

Aspergillus oryzae (Ahlb.) *Cohn*, sbírkový kmen mikrobiologického ústavu Karlovy university byl kultivován na pivovarské sladince podle potřeby doplněné 2 % agaru. Spory byly suspendovány ve sterilní vodovodní vodě obsahující 1 : 10 000 smáčedlo Emulfor a roztřepány se skleněnými kuličkami. Suspense spor byla naředěna a vylévána na Petriho misky a Czapek-Doxovým (CD) agarem se škrobem k izolaci. K dalším pokusům byly vybrány kolonie o největší zóně hydrolysovaného škrobu (roztok J + KJ byl nanášen tyčinkou v radiálním směru od okraje kolonie) a namnoženy na CD agarech. Z těchto misek bylo připravováno inokulum stejně jako při

isolaci. Suspendované spory byly odměřovány pipetou do kultivačních lahví přes filtrační papír, aby tak bylo zajištěno inkulium pokud možno homogenní a zbavené částí mycelia.

Stanovení amylolytické aktivity media. Použito bylo principu Wohlgemuthovy metody, upravené pro práci s mikrobiologickým materiálem: 10 ml tekutého kultivačního media obsahujícího amylasu bylo smíseno s 20 ml 0,2 % škrobového mazu a uloženo v baňce při 30°. Ze směsi byl každých 10 min. (nebo v jiných časových intervalech) odpipetován 1 ml a vpraven do zkumavky s 5 ml jodového roztoku. Vzorek byl pak srovnáván buď se standardním dextrinovým roztokem nebo s 5 ml čistého jodového roztoku + 1 ml vody (achromatický bod).

Zásobní jodový roztok: 11 g jodu + 22 g KJ rozpustíme ve vodě do objemu 500 ml. **Zředěný roztok A** (pro standard): 15 ml jodového zásobního roztoku + 8 g KJ rozpustíme v dest. H₂O do objemu 200 ml. **Zředěný jodový roztok B:** 2 ml zásobního jodového roztoku + 20 g KJ rozpustíme v destilované vodě do objemu 500 ml. Rozdělíme po 5 ml do zkumavek (roztok musí být denně čerstvý). **Standardní dextrinový roztok:** 0,6 g dextrinu p. a. (Merck) suspendujeme v trošce vody, přeneseme do 900 ml vařící vody a po ochlazení doplníme do 1000 ml. Přidáme několik kapek toluenu jako konservans a uložíme v lednici. 1 ml dextrinového roztoku + 5 ml zředěného roztoku A ve zkumavce použijeme jako standard pro srovnání barvy. **Škrobový roztok:** 1 g amylum solubile p. a. smísíme s 10 ml vody a zamícháme do 450 ml vařící destilované vody. Vaříme 2 min., ochladíme na 20°, přidáme 25 ml octanového ústoje a doplníme vodou na konečný objem 500 ml. **Škrobový roztok** má pH 4,35 až 4,5. **Octanový ústoj:** 165 g bezvodého octanu sodného p. a. rozpustíme ve 125 ml ledové kyseliny octové a doplníme vodou do 1000 ml.

Stanovení amylolytické aktivity mycelia. Odvážíme 0,020 g sušiny, přidáme mletého skla a roztíráme s postupně přidávanou vodou (10 ml). Po přelití do baňky třepáme 30 min., potom smísíme se 20 ml škrobového roztoku. Další postup je jako při stanovení amylas v mediu. Vysoušení bylo prováděno při 45°.

Stanovení redukujících cukrů bylo prováděno podle Bertranda (Bernhauer 1939). Zjištění cukrů po hydrolyse: 20 ml vzorku media + 2 ml H₂SO₄ 25 % zahříváme 2½ hod. na vodní lázni při 100°, po ochlazení zneutralisujeme louhem a případně naředíme.

Kultivace. Základní půda byla Czapek-Doxova (CD) se škrobem:

škrob bramborový	20 g
NaNO ₃	2 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01 g
KH ₂ PO ₄	1 g
H ₂ O font.	1000 ml

pH bylo upraveno na 5,0, sterilisováno 3 dni po 30 min. v páře. Sladina používaná k přípravě inokula měla 8° Ballg., pH nebylo upravováno. Kultivace byla prováděna stacionárně v Rouxových lahvích o obsahu 1000 ml, plněných 150 ml živné půdy. Kultivační teplota byla 20 ± 2°. Ke každému odběru byly rušeny 2 až 3 láhve, u nichž bylo zjišťováno pH, úbytek škrobu a redukující cukry, aktivita amylasy v mediu a váha sušiny mycelia, které bylo před vysušením standardním způsobem důkladně propláchnuto destilovanou vodou. Všechna získaná čísla byla přepočtena na 1 láhev, t. j. 150 ml půdy, pokud není uvedeno jinak.

Výsledky.

Při sledování dynamiky vylučování enzymů z mycelia do prostředí byla věnována především pozornost významu koncentrace škrobu, kvalitě zdroje uhlíku a zdroje dusíku a konečně poměru mezi obsahem amylas vázaných v myceliu a uvolněných do media.

Význam koncentrace škrobu.

Připraveny byly čtyři řady pokusů na CD půdě s koncentracemi škrobu 0,5 %, 1 %, 2 % a 4 %. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 1 až 4:

Tabulka 1.

CD půda s 0,5% škrobu (viz též graf č. 4)

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
4	5,75	0,120	—	0	0
6	6,50	0,307	100	—	—
9	7,00	0,285	35	—	—
11	7,25	0,252	20	—	—
15	7,07	0,246	25	—	—

v tabulkách uvedené hodnoty jsou průměry ze 2 až 3 odběrů.

Tabulka 2

CD půda s 1 % škrobu

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
4	6,67	—	0	0	0
6	7,45	0,626	180	—	—
8	7,14	0,585	90	—	—
10	7,3	0,552	75	—	—
13	7,5	0,498	70	—	—
15	7,55	—	60	—	—

Tabulka 3

CD půda s 2 % škrobu (viz též graf 3)

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
4	6,25	0,341	—	6,0*	26,0*
6	6,50	0,817	120	1,4	9,0
9	7,30	1,004	25	stopy	2,0
11	6,87	1,082	20	stopy	1,0
16	7,55	0,807	20	0	0

* spotřeba $\frac{n}{10}$ KMnO_4 na 10 ml vzorku.

Tabulka 4

CD půda se 4% škrobu

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
4	6,9	—	0	—	—
6	7,35	0,992	0	9,5	46
8	6,31	1,124	0	7,2	24
10	6,08	1,347	0	6,3	15
13	5,14	1,329	0	5,5	8
15	4,9	—	180	5,0	—

Stoupající koncentrace škrobu dávají vždy vyšší maximální množství sušiny, jehož je však dosahováno při koncentraci 0,5 % a 1 % již šestý den, při 2 % již desátý den a při 4 % dvanáctý den. Amylasy je vylučována do prostředí ve stanovitelných množstvích od šestého dne v koncentraci 0,5 %, 1 % a 2 % škrobu a stoupá prudce až do jedenáctého dne u všech těchto koncentrací. U 0,5 % koncentrace následuje mírný pokles amylasy, u 1 % a 2 % škrobu naopak mírný vzestup až do konce pokusu, t. j. do šestnáctého dne, ačkoli v této době již váha mycelia znatelně klesla v důsledku pokračující autolysy. pH u uvedených koncentrací na začátku růstu až do šestého či sedmého dne vystoupí z 5,0 nad 7 a udrží se na této výši až do konce pokusu. Odlišné výsledky byly získány se 4 % škrobovou půdou. V tomto případě se objevují první stanovitelné známky amylasy až třináctý a patnáctý den, pH po dosažení neutrálního bodu v šestém dni opět poklesne ještě pod původní hodnotu na 4,9. Protože redukující cukry jsou v prostředí prokazatelné v celém průběhu růstu, lze usuzovat, že okyselení prostředí je důsledkem jejich neúplné oxydace na kyseliny. U nižších koncentrací mizí poslední stopy redukujících cukrů již čtvrtý až osmý den. Pro maximální exkreci amylasy je tedy nejvýhodnější koncentrace škrobu 1 až 2 %. Vyšší koncentrace nejsou v daném časovém úseku příznivé tvorbě amylasy. To ovšem platí pro neměnnící se koncentraci zdroje dusíku (0,2 % NaNO_3).

Zdroje dusíku.

Pro zjištění významu kvality zdroje dusíku byly vzaty do pokusu NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, z organických pepton (Witte) a otruby. Výchozí koncentrace byla 0,2 % NaNO_3 (0,03296 % N), koncentrace ostatních zdrojů N byla přepočtena na stejné množství dusíku. Peptonu bylo užito 0,2 % pšeničných otrub 1 %, doplněných 0,1 % NaNO_3 . Zdroj uhlíku byl škrob (2 %) ve všech případech, rovněž ostatní složky půdy zůstaly beze změny.

Tabulka 5

CD půda s $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
3	2,72	0,577	0	2,6	30
5	2,36	0,779	0	1,2	18
7	2,04	0,686	0	1,0	17,4
9	2,1	0,839	0	1,0	15,5

Tabulka 6

CD půda s NH_4NO_3 (viz též graf č. 1)

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
4	2,15	0,320	0	2,0	19,6
6	5,10	0,956	60	3,0	4,0
9	5,65	0,975	15	stopy	0
11	5,71	0,774	20	0	—
16	5,76	0,801	20	—	—

Tabulka 7

CD půda s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
3	2,65	0,341	0	2,3	46
5	2,57	0,372	0	2,1	32
7	2,1	0,567	0	1,0	19,4
9	2,1	0,570	0	0,9	19,1

Tabulka 8

CD půda s peptonem 0,2 % (viz též graf č. 2)

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
4	3,2	0,487	140	6	13
6	4,57	0,897	100	2	2,8
9	5,61	1,122	50	0	0
11	5,56	0,701	45	—	—
16	5,68	0,834	50	—	—

Tabulka 9

CD půda s otrubami 1 % a NaNO_3 0,1 %

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
4	6,08	0,358	0	—	39
6	6,11	0,533	0	1,8	21
8	5,81	0,733	130	1,2	11
10	6,75	—	90	stopy	10
13	6,62	0,792	—	0	10
15	—	0,554	75	—	8

Kvalita zdroje dusíku je významným činitelem pro exkreci enzymu. Optimální produkce bylo dosaženo na NaNO_3 (viz tabulka 3), peptonu a otrubách s NaNO_3 . Z amonných solí je částečně vhodný pouze NH_4NO_3 . V půdách s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ nebyly amylasy během pokusu (15 dní) prokázány. Rozhodujícím činitelem se zde jeví fyziologická regulace pH media během růstu. Amonné soli po využití dusíku mikroorganismem uvolňují do prostředí anionty v podobě příslušné kyseliny. Výsledný pokles pH má brzdivý vliv na exkreci amylasy i na přírůstek sušiny a škrob je zužitkován jen zvolna. U NH_4NO_3 je tato skutečnost nejlépe patrna. Z počátku je využíván amoniak a hromadí se NO_3^- okyselují prostředí. Růst je pomalý, amylasa není prokázatelná. Jakmile je však všechen amonný dusík spotřebován, dochází k využití i dusíku nitrátového, pH stoupá, růst se zvyšuje a současně se objeví amylasa v prostředí. Podobná je situace u peptonu. Proteasami a deaminasami uvolněné kyseliny na čas okyselí prostředí, jsou však dále zužitkovány jako zdroj uhlíku.

Otruby jako komplexní zdroj dusíku, uhlíku a jiných biogenních prvků znamenají zvýšení růstu a produkce enzymu, avšak průběh sledovaných veličin je v celku shodný s růstem na NaNO_3 . U organických zdrojů ovšem nutno počítati i s účinkem růstových faktorů a esenciálních aminokyselin. Bylo-li sníženo množství NaNO_3 z 0,2 % na 0,1 %, projevilo se toto ochuzení znatelnými změnami u všech sledovaných hodnot. Glucidy byly využívány pomaleji a neúplně, což se projevilo jednak nahromaděním redukujících cukrů, jednak kyselin, které opět znamenaly snížení pH. Sušina vykazovala rovněž nižší hodnoty (přibl. o 25 %) a amylasa se nevytvořila v prokazatelných množstvích.

V ý z n a m k v a l i t y z d r o j e u h l í k u .

Význam kvality zdroje uhlíku byl sledován na CD půdě, kde 2 % škrobu byla nahrazována 2 % dextrinu, maltosy, sacharosy, glukosy, arabinosy a galaktosy. Souběžně byla vedena jedna serie baněk s CD půdou bez cukru, doplněnou 0,2 % peptonu jako komplexního zdroje dusíku a uhlíku. Kultivační teplota byla na rozdíl od ostatních pokusů 27°.

Tabulka 10

CD půda s dextrinem

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
6	6,94	0,532	20	2,0	17,5
9	7,43	0,550	10	1,5	12,0
11	7,98	0,596	10	—	—

Tabulka 11

CD půda s maltosou

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
6	6,4	1,005	20	1,1	—
9	7,43	0,934	10	0	—
11	7,8	0,884	5	—	—

Tabulka 12

CD půda se sacharosou

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
6	5,9	0,968	0	3,0	4,0
9	7,2	1,052	40	0	0
11	8,0	0,976	30	—	—

Tabulka 13

CD půda s glukosou

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
6	7,04	0,986	20	0	—
9	7,35	0,931	20	—	—
11	7,68	0,817	15	—	—

Tabulka 14

CD půda s arabinosou

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
6	5,37	0,033	0	19,0	—
9	5,72	0,047	0	16,0	—
11	9,62	0,061	0	15,0	—

Tabulka 15

CD půda s galaktosou

Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
6	6,9	0,880	120	11,0	—
9	7,43	1,060	45	stopy	—
11	7,8	1,046	35	0	—

Tabulka 16

CD půda s peptonem 0,2 % (bez škrobu a NaNO_3)

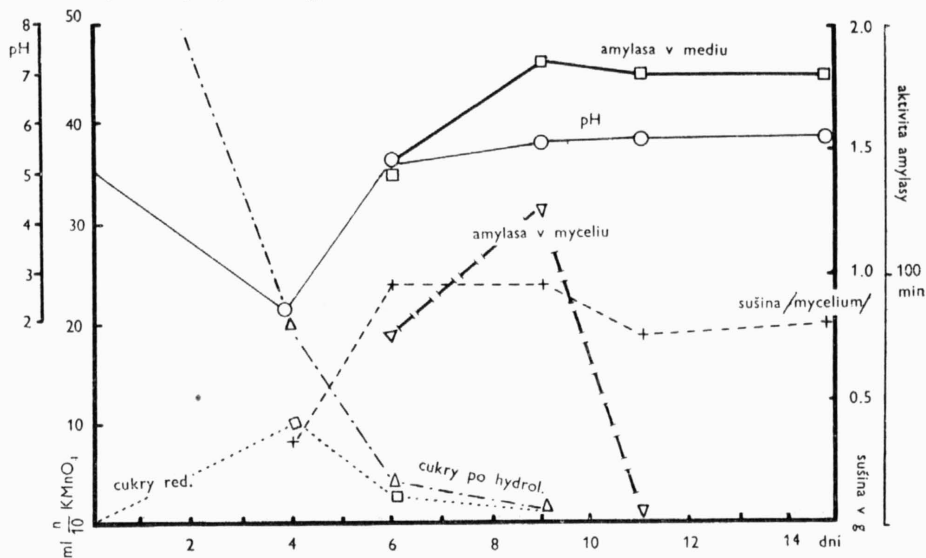
Dni	pH	Mycelium (suš. v g)	Aktivita amylasy v mediu (v min.)	Reduk. cukry	Cukry po hydrolyse
6	7,06	0,181	0	—	—
9	7,4	0,174	0	—	—
11	7,95	0,173	0	—	—

Nejvyšší produkce amylas v mediu bylo dosaženo na škrobu a jeho štěp-
ných produktech dextrinu, maltose a glukose. Na sacharose a galaktose vyža-
doval *Aspergillus oryzae* delší doby přizpůsobení na nezvyklý substrát.
Na arabinose a peptonu nebylo při zjišťování amylas ani za 180 min. dosaženo
achromatického bodu.

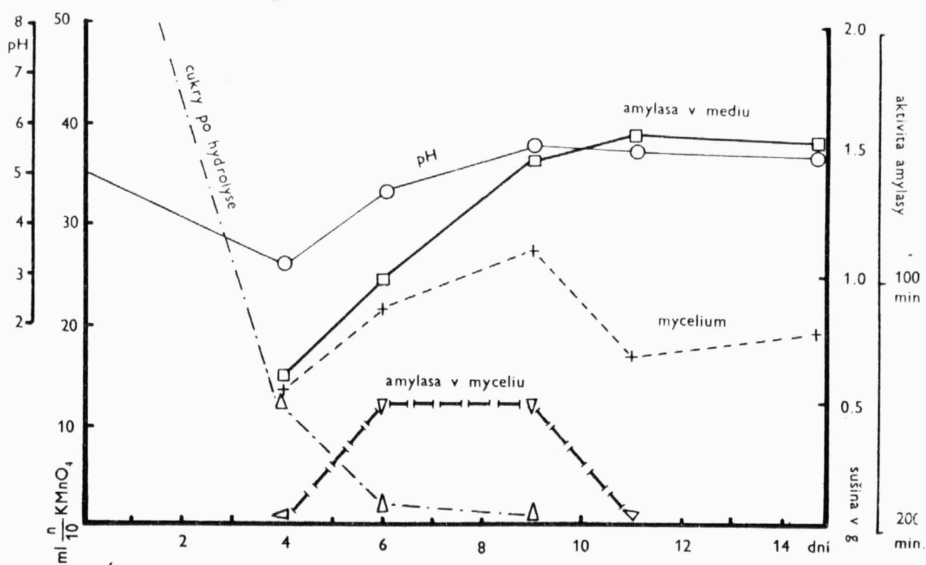
Vztah mezi amylasami uvnitř buněk a v prostředí.

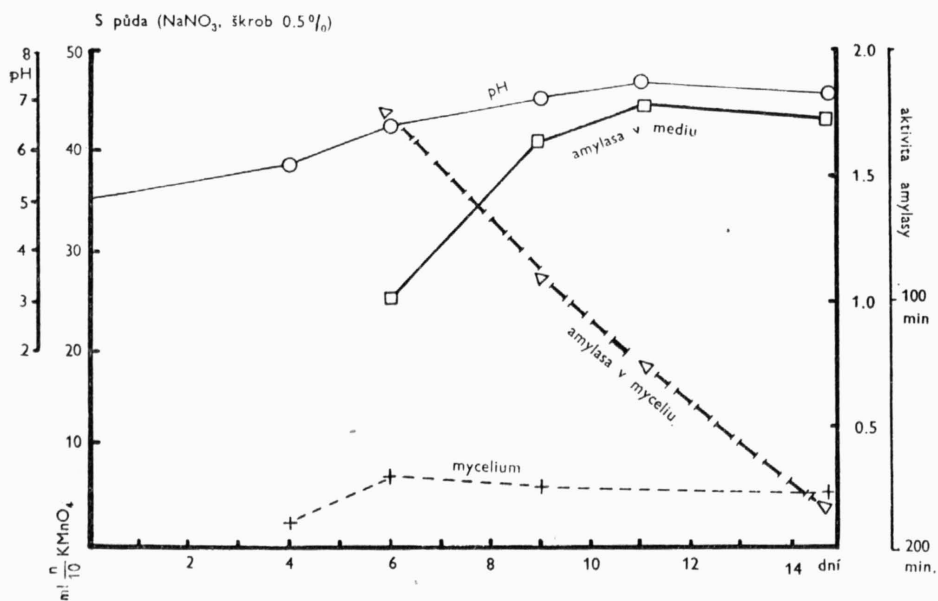
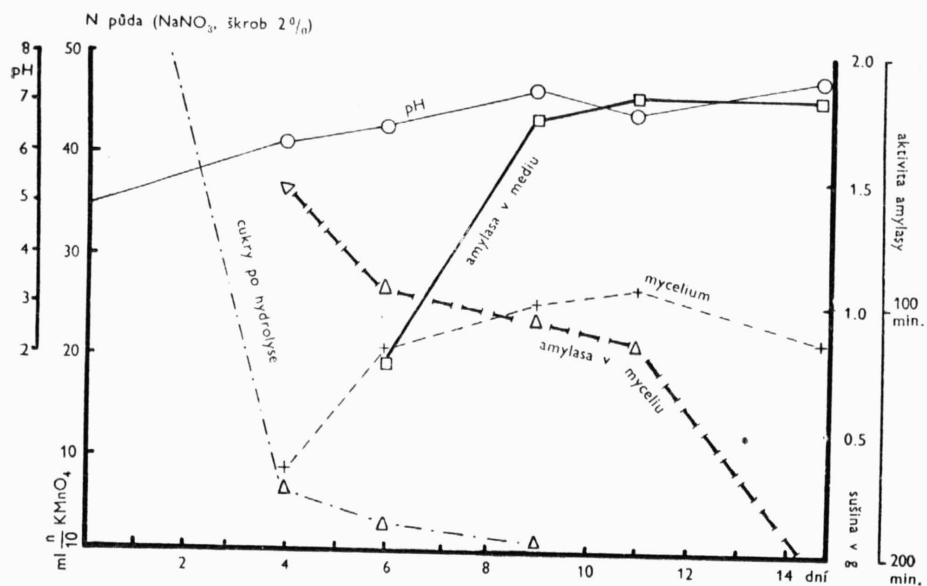
Ačkoli jsou amylolytické enzymy typické „exoenzymy“, jsou přítomny
ve významném množství i v buňkách mycelia. Byl proto proveden pokus,
v němž byla sledována současně exkrece enzymu, jeho obsah v buňkách, váha
sušiny, pH a úbytek škrobu, resp. redukujících cukrů. CD půda byla naočko-
vána ve čtyřech obměnách: A obsahovala 2 % škrobu a 0,095 % NH_4NO_3 ,
P 2 % škrobu a 0,2 % peptonu, N 2 % škrobu a 0,2 % NaNO_3 a S 0,5 %
škrobu a 0,2 % NaNO_3 . Počáteční pH u všech půd bylo = 5.

A půda (NH_4NO_3 , škrob 2%)



P půda (pepton, škrob 2%)





Půda N byla považována za standardní. Obsah veškerých cukrů prudce klesal na této půdě do čtvrtého dne, malé zbytky se pak udržovaly až do devátého dne. Váha sušiny dosáhla maxima jedenáctý den, pak se začaly projevovat známky autolysy včetně úbytku sušiny. Od začátku až do konce pokusu pH stejnoměrně stoupalo s původních 5,0 na 7,5. Amylasy v mediu se objevily šestý den a hromadily se až do konce pokusu. Naopak v myceliu obsah amylas přepočtený na váhovou jednotku mycelia byl nejvyšší v nejmladších buňkách a klesal tak, že při posledním odběru šestnáctého dne již achromatického bodu dosaženo nebylo ani za 200 minut. Byl-li snížen obsah škrobu na 0,5 % (půda S), byly cukry spotřebovány daleko rychleji, rovněž váha sušiny byla nižší, dosáhla vrcholu již šestý den. Celkové množství amylas vyloučených do media bylo však prakticky stejné jako u předchozího pokusu právě tak jako obsah amylas ve váhové jednotce sušiny. Poněkud jiný průběh měla půda A, kde přednostním využitím NH_4 pokleslo pH čtvrtý den na 2,15, avšak po postupném odčerpávání nahromaděných NO_3 se vyrovnalo šestý den a do konce pokusu vystoupilo na 5,75. Silný pokles pH měl za následek nejen opoždění v produkci amylas, které se objevily jak v sušině tak i v myceliu až šestý den, ale i nedokonalé využití cukrů, takže došlo k nahromadění redukujících cukrů v mediu. Jakmile bylo pH vyrovnáno, cukry vymizely a enzymatická aktivita amylas se projevila jak v sušině, tak i v mediu. Podobně tomu bylo i na půdě P s peptonem, kde pokles pH byl způsoben nahromaděním kyselin, vzniklých při odbourávání aminokyselin. Z průběhu křivek je jasné patrné, že amylasy v buňkách mycelia přecházejí při autolyse do media a přispívají k dalšímu hromadění tohoto enzymu v prostředí, když už mycelium je v pokročilém stadiu autolysy a jeho schopnost syntetisovat nové enzymy je značně porušena.

Rychlost inaktivace amylas v mediu.

Enzymy vznikající během růstu *Aspergillus oryzae* se nahromadují v mediu, jsou však současně inaktivovány. Aby mohlo být posouzeno, jak vyjadřuje získaná hodnota stanovení aktivity amylas v předchozích pokusech současný stav v kultuře, t. j. v jakém poměru je enzym čerstvě vyloučený k enzymu na př. z předchozích 24 hodin, byla zjišťována rychlost jejich inaktivace v podmínkách kultivačního media.

Kultivační tekutina s aktivní amylasou byla doplněna acetátovým ústojem na pH = 4,2 a v druhé serii fosfátovým ústojem na pH = 7,0. Po přelití hladiny toluenem byly baňky uzavřené skleněnými zátkami inkubovány při 30° a zkoušeny na aktivitu za 60 min., 24 hodin a 48 hodin:

	60 min.	24 hod.	48 hod.
pH 4,2	25 min. achromat.	300 min. červenohnědá	zecla inakt.
pH 7,0	30 min. achromat.	300 min. červenohnědá	zecla inakt.

Závěr.

Při studiu faktorů ovlivňujících dynamiku produkce amylas u *Aspergillus oryzae* nebyla zjištěna přímá závislost mezi množstvím sušiny během růstu a vylučováním enzymu. Byl-li zmenšen obsah škrobu v půdě, znamenalo toto snížení pokles váhy sušiny, nikoli však pokles množství vylučovaného enzymu. Naopak zvýšení obsahu škrobu se projevilo na exkreci amylas nepříznivě, i když sušina dosahovala nejvyšších hodnot. (Tab. 1, 2, 3 a 4, grafy 3 a 4.) Tento zjev není tedy v rozporu s pokusy, které konal F u n k e (1923) a později též K a n i e (1952).

Dalším zajímavým poznatkem bylo porovnání poměru množství sušiny k množství vyloučeného enzymu vzhledem k času, resp. růstu kultury. Ve fázi logaritmického růstu a často až do dosažení vrcholu růstové křivky (vyjádřeno vahou sušiny) byla amylasa přítomna v mediu v množství nedosahujícím hranice citlivosti použité metody na její stanovení a bylo možno předpokládat její výskyt a aktivitu jen podle ztekucování škrobu přítomného v mediu a úbytku cukrů po hydrolyse. Teprve tehdy, kdy byly viditelné první známky autolysy a kdy syntéza nového buněčného materiálu se již neprojevovala váhovým přírůstkem, objevuje se amylasa ve vydatném množství, které pravidelně ještě stoupá, takže dosahuje maxima až několik dní po překročení vrcholu růstové křivky. Protože amylasy v mediu se rychle inaktivují za kultivační teploty, nejedná se tedy o pouhé sčítání množství nahromaděných se enzymů a hodnoty získané stanovením reprezentují aktuální stav poměrně úzkého časového rozpětí.

Doba potřebná k dosažení maxima růstu je závislá na koncentraci škrobu a prodlužuje se se stoupající koncentrací. Současně se časově odsunuje i exkrece enzymu. Nelze tedy uvažovat o nějakých „brzdících substancích“, jak je předpokládal F u n k e (1923), nýbrž je třeba brát v úvahu závislost vylučování amylas na dosažení určité růstové fáze.

Významným činitelem je i zdroj dusíku, který ovlivňuje využití zdroje uhlíku a reguluje pH v kultuře. (Tab. 5, 6, 7, 8 a 9, grafy 1, a 2.) Uplatňuje se zde nejen jeho kvalita, ale i kvantita, t. j. poměr C : N, jak podobně uvádí i B i n d a l a S r e e n i v a s a y a (1945). Stejně i zjištění, že optimálními zdroji uhlíku (tab. 10, 11, 12, 13, 14 a 15.) pro produkci enzymu jsou škrob a produkty jeho hydrolysy, navazuje na výsledky R a o a S r e e n i v a s a y a (1946).

Důkladněji osvětluje dynamiku tvorby amylas současné sledování enzymu v myceliu a v mediu během růstu za různých podmínek (grafy 1, 2, 3 a 4.) Na začátku kultivace, t. j. čtvrtý až šestý den je amylasa přítomna v sušině ve velkém množství, zatím co v mediu je jen ve stopách. Po překročení maxima růstu, t. j. průměrně po devíti dnech se množství amylas v myceliu rychle snižuje, až není stanovitelné. Zatím v mediu se týž enzym silně nashromažďuje. Významné změny v kultivačním mediu (změny zdroje dusíku a koncentrace škrobu) nemají v podstatě na tento vztah vliv. Takovýto poměr enzymu v mediu a myceliu je možno pozorovat i na grafech v práci G o o d m a n o v ě (1950), autor si ho však nevšímá a nepokouší se o jeho vysvětlení. Je to jistě zjev nikterak jedoduchý, při němž může přicházet v úvahu rozdílnost v permeabilitě mladých a starých buněčných blan, propouštějících enzym do prostředí nebo i ta možnost, že právě nedostatek substrátu působí na zvýšení produkce enzymu mikroorganismem, který musí krýti svoji potřebu zdroje

energie z většího prostoru. Konečně zde může hráti svoji úlohu i syntetická úloha amylas, které se v období logaritmického růstu zajisté účastní syntetických procesů při vytváření plasmy a zůstávají vázány na vnitřní strukturu buňky. Když je růst zastaven, enzymy jsou produkovány dále a vycházejí do prostředí, kde mají charakter hydrolas. K podobným závěrům došel i C h a l o u p k a (1952) při studiu proteolytických enzymů u *Streptomyces griseus*.

И. С т а р к а:

Образование амилолитических ферментов у *Aspergillus oryzae*.

В ы в о д ы.

При изучении факторов, действующих на динамику продукции амилаз у *Aspergillus oryzae* не была обнаружена прямая зависимость между количеством сухого веса в процессе роста и выделением энзима. Уменьшение содержания крахмала в среде обозначало понижение количества выделяющегося энзима. Наоборот, повышение содержания крахмала действовало неблагоприятно на выделение амилаз, хотя сухой вес достиг максимума. (Таблица № 1, 2, 3, 4, графики № 3 и 4). Это явление соответствует опытам, которые сделал Funke (1923) и опыту, как приводит K a n i e (1923). Далее интересно было бы сравнить соотношение количества сухого веса и количества выделенного энзима к времени или росту культуры.

Во время фазы логарифмического роста и часто впрямь до достижения максимума кривой роста (выражено в разнице сухого веса) была амилаза в среде только в количестве, которое не достигало границы чувствительности использованного метода определения и можно было предполагать ее существование и активность только в виду разжижения крахмала в среде и убытка сахаров после гидролиза. Только тогда, когда были обнаружены первые признаки автолиза и когда синтез нового клеточного материала не проявлялся повышением веса, обнаруживается амилаза в значительном количестве, которое обыкновенно еще повышается до той степени, что достигает максимума лишь несколько дней после превышения кульминационного пункта кривой роста. Так как амилазы в среде скоро инактивируются при культивиционной температуре дело здесь не в сосчитывании количества накаплиющихся энзимов; стоимость полученная при определении представляет актуальное состояние сравнительно небольшого промежутка времени.

Срок нужный к достижению максимума роста зависит от концентрации крахмала и удлинняется с растущей концентрацией. Выделение энзима наступает позже. Поэтому невозможно учитывать какие-либо «тормозящие субстанции», как предполагал F u n k e (1923), но надо учитывать зависимость выделения амилаз от достижения определенной фазы роста.

Очень важное место занимает и источник азота, который оказывает влияние на использование источника углерода и регулирует pH в культуре. (Таблица 5, 6, 7, 8 и 9, графики 1 и 2). Большое значение имеет не только его качество, но и количество, то есть отношение C : N как тоже указывает B i n d a l и S r e e n i v a s a y a (1945). Установление крахмала и продуктов его гидролиза как источников углерода (таблицы №№ 10, 11, 12, 13, 14, 15) выделения энзима тоже навязывает на результаты R a o и S r e e n i v a s a y a (1946). Тщательно освещает динамику образования амилаз одновременное исследование энзима в мицелии и в среде в процессе роста в различных условиях (графики 1, 2, 3, 4). В начале культивации, то есть 3—6 дней, амилаза имеется в сухом весе в большом количестве тогда как в среде она только в следах. После превышения максимума роста, то есть обыкновенно через 9 дней количество амилаз в мицелии уменьшается впрямь до времени, когда становится определение невозможным. Между тем тот самый энзим в среде значительно накапливается. Важные изменения в среде (изменения источника азота и концентрации крахмала) не оказывают существенного влияния на это явление. Это отношение энзима в среде и мицелии можно наблюдать тоже и на графиках в работе G o o d m a n (1950). Но автор не обращает на это внимания и не старается объяснить это. Это явление наверно сложное и при нем можно

учитывать различную проницаемость молодых и старых клеточных оболочек, пропускающих энзим в среду или возможность, что именно отсутствие субстрата действует на повышение продукции энзима микроорганизма, который должен удовлетворять свою потребность в источнике энергии из большого пространства. Наконец может здесь играть роль тоже синтетическая задача амилаз, которые в процессе логарифмического роста участвуют в образовании плазмы и остаются прикреплены к внутренней структуре клетки. С окончанием роста энзимы продолжают выделяться и выходят в среду, где приобретают характер гидролаз. К выводам подобного рода пришел тоже Ч а л о у р к а (1952) при изучении протеолитических энзимов у *Streptomyces griseus*.

J i ř í S t á r k a:

The formation of amylolytic enzymes by *Aspergillus oryzae*.

S u m m a r y.

In studying the effect of different factors upon dynamics of amylase production by *Aspergillus oryzae* in stationary cultures on Czapek-Dox starch medium, no direct relation between growing mycelium (dry weight) and enzyme excretion was found. When the concentration of starch in medium was diminished, weight of mycelium was lower, but quantity of excreted enzyme, estimated by modified Wohlgemuth's method showed no change. On the other hand the increase of starch content exhibited an unfavourable effect on amylase excretion, although weight of mycelium reached highest values. (Table 1, 2, 3, and 4, Figs. 3 and 4). These results are in full agreement with experiments of F u n k e (1923) and K a n i e (1952).

Correlations between weight of mycelium and quantity of enzyme excreted, studied during growth of the culture, showed following characteristics. In the logarithmic phase and often after reaching maximum of growth, amylase was present in medium in amounts below the limits of sensibility of method used for its estimation. Presence and activity of this enzyme was presumed only according to the liquefaction of starch present in the medium and decrease of sugar after hydrolysis. Only when the first signs of autolysis were noted and when the synthesis of cellular material was not represented by increase of weight, abundant quantity of amylase in the metabolic fluid appeared. The amount of enzyme still regularly increased and reached maximum few days after maximum of growth curve. Because amylases were quickly inactivated in medium total quantity of enzyme was not result of permanent accumulation and addition. These values obtained by iodine test represented an actual situation of a short growth period.

The time necessary for reaching maximum growth depends on concentration of starch and is longer with increasing concentration. Simultaneously the excretion of enzyme is delayed. Presumption of F u n k e (1923) of some "inhibiting substances" is therefore not well-founded, but the dependence of amylase excretion on definite growth phase must be taken into account.

Another important factor influencing utilisation of carbon and regulating pH in medium is the nitrogen source. (Table 5, 6, 7, 8 and 9, Figs. 1 and 2) acting on enzyme formation not only with his quality, but also quantity, i. e. C : N ratio. (See also B i n d a l and S r e e n i v a s a y a 1945). Similarly

determination of starch and products of starch hydrolysis as optima carbon sources (Table 10, 11, 12, 13, 14 and 15) corresponds with results of Rao and Sreenivasaya (1946).

Dynamics of amylase formation is more distinctly elucidated by parallel examination of enzyme present in mycelium and medium during the growth and under different conditions. (Figs. 1, 2, 3 and 4). On the forth and sixth day of cultivation is amylase present in great quantity in mycelium, but only traces of it are found in medium. Passing over the maximum of growth (i. e. average after nine days) amylase content in mycelium becomes quickly lower and soon disappears. At the same time in medium the enzyme accumulates. Not even important changes in medium (changes of nitrogen sources and concentration of starch) do influence substantially this relation. This ratio of enzyme in medium and in mycelium may be seen also on figures in the paper on Goodman (1950) unfortunately without further comment or explanation. It is of course a phenomenon quite complicated and influenced probably by differences in permeability of young and old cell membranes through which enzymes diffuse. Shortage of substrate enhancing enzyme production by microorganism, which is forced to cover his demand on energy source in greater volume, is another eventuality, which should be taken in consideration. Finally an important role may be played by the synthetic action of amylases, which doubtless participate during logarithmic growth in synthetic process of plasma formation and which are bounded on the inner structure of the cell. After growth ceases production of enzymes continues. This time amylases diffuse into the medium with their known character of starch- splitting enzymes. Similar conclusions from the study of proteolytic enzymes of *Streptomyces griseus* are announced by Chaloupka (1952).

Literatura.

- Bernhauer K. (1939): Gärungschemisches Praktikum, Berlin.
- Bernhauer K. (1950): Fortschritte der mikrobiologischen Chemie in Wissenschaft und Technik, VI. Enzyme der Mikroorganismen. Ergebn. d. Enzymforschung 11 : 304—310.
- Bindal A. N. a. Sreenivasaya M. (1945): Current Sci. 14 : 21; Ref. Chem. Abstr. 39: 3032.
- Feniksova R. V. i Segal R. B. (1941): Primenenije Aspergillus oryzae dlja osacharivanija krachmalistogo syrja v spirtovom proizvodstve. Mikrobiologija 10 : 873.
- Feniksova R. V. i Dvadcatova E. A. (1952): Polučenie novych ras plesnevych gribovs povyšenoj aktivnostju amilolitičeskich fermentov. Izv. Akad. Nauk SSSR s. biol. (2) : 56—65.
- Funke G. L. (1923): Onderzoekingen over de vorming van diastase door Aspergillus niger van Tiegh. s'Gravenhage (1922). Ref. Zbl. f. Bakt. II. Abt. 59 : 162.
- Goodman J. J. (1950): Adaptive production of amylase and lipase by three species of Fungi. Science 112 : 176—179.
- Hao L. Ch., Fulmer E. J. a. Underkofler L. A. (1943): Fungal amylases as saccharifying agents in the alcoholic fermentation. Ind. Eng. Chem. 35 : 814—818.
- Chaloupka J. (1952): Přednáška na sjezdu čs. mikrobiologů v Brně 1952.
- Kanie M. (1952): Diastase formation by Aspergillus. Memoirs of the Fac. Agric. Kagoshima Univ. 1 : 87—112.
- Kleinzeller A. a. Lacko L. (1952): Tvorba amylolytických enzymů v Aspergillus niger a A. oryzae. Chemické listy 46 : 679—682.
- Klimovskij D. N. i Rodzevič V. Z. (1950): Amilolitičeskije fermenty aspergillov. Mikrobiologija 19 : 60—64.
- Kylin H. (1914): Über Enzymbildung und Enzymregulation bei einigen Schimmelpilzen. Jahrb. wissenschaft. Bot. 53 : 465—501.

- Le Mense E. H., Corman J., van Lanen J. M. a Langlykke A. F. (1947): Production of mold amylases in submerged culture, *J. Bact.* 54 : 149.
- Pantanelli E. a Bruschi (1910): Ricerche preliminari su la secrezione dell'amilasi. *Annali di Botanica* 8 : 133—174.
- Prescott S. C. a. Dunn C. G. (1949): *Industrial microbiology*. New York.
- Rao M. R. R. a Sreenivasaya M. (1946): *Current Sci.* 15 : 249; *Ref. Chem. Abstr.* 41 : 1278, 1947.
- Redfern S. (1950): Recent developments in amylase chemistry. *Wallerstein Labs. Comm.* 13 : 89—114.
- Stárka J. (1952): Příprava plísňových amylytických preparátů na pšeničných otrubách. *Průmysl potravin* 3 : 488—489.
- Sova V. (1950): Náhrada obilních lihovarských sladů amylytickými preparáty plísňovými. *Průmysl výživy* 1 : 261—266.
- Sova V. (1951): Provozní výroba a praktické použití zeukřujících plísňových prostředků. *Průmysl potravin* 2 : 458—460.
- Tauber H. (1949): *The Chemistry and Technology of Enzymes*. New York.
- Thom Ch. a Raper K. B. (1945): *A Manual of the Aspergilli*. Baltimore.
- Vuillemin P. (1902): Über die chinesischen Hefen und über die zuckerbildenden Pilze. (*Ref.*) *Zbl. f. Bakt.* II, Abt. 8 : 409—412.