ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 6

Přihlášeno 05. 05. 61 (PO 25-61)

Zveřejněno 5. mezinárodní biochemický kongres v Moskvě, 1961
31. 08. 63 (Nature, 199 č. 4896 : 905 až 906)
13 až 17. 04. 64 (Mezinárodní fermentační symposium v Londýně)

Uděleno 01. 08. 66

Vydáno 15. 10. 78

MDT 661.734.1

Autoři objevu: Dr. ZDENĚK FENCL a EMMA VINTROVÁ, prom. biol., PRAHA

Název objevu: **Nový faktor regulující produkci kyseliny citrónové u Aspergillus niger**

Předmět objevu: Nový faktor, regulující produkci kyseliny citrónové u Aspergillus niger, isolovaný při produkci z dobrých produkčních kmenů, který zvyšuje tvorbu kyseliny citrónové u kmenů s produkcí nízkou, přičemž látka je kyselého charakteru, dialysovatelná, thermostabilní, stálá pouze v kyselém prostředí a obsahuje skupinu karboxylovou.

K synthese některých organických kyselin, jako např. kyseliny citrónové, se využívá schopnosti řady plísní přeměňovat cukerný zdroj na organickou kyselinu. Zatímco v některých případech, např. u produkce glukonové kyseliny, je rychlost tvorby kyseliny přímo úměrná množství glukosooxydásy v plísni, není u produkce kyseliny citrónové známo, jaký regulační mechanismus rozhoduje o výši produkce.

Z literatury je známo, (Perlman, D. Dorell, W. W. Johnson, M. J.: Arch. Bioch, 11, 131, (1964); Shu, P., Johnson, M. J.: J. Bacteriol. **56**, 577, 1948), že řada stopových prvků, zvláště železo, zinek a mangan hrají důležitou roli při produkci citrónové kyseliny, ale přímý mechanismus jejich působení není znám. Dále například Leopold se spolupracovníky (Leopold, J. Valtr, Z., Zentrbl. f. Bakt. **114**, 1 : 45—6, 1961) objevil v melase faktor, který ovlivňuje produkci citrónové kyseliny na melasovém médiu. Řada autorů poukazovala již dříve na nutnost inhibovat enzymatické systémy, nutné k odbourání citrónové kyseliny pomocí enzymatických jedů, a soudila například, že přídavek žluté krevní soli do média inhibicí enzymů Krebsova cyklu brzdí odbourání citrónové kyseliny a tím umožňuje její akumulaci v médiu. Práce z posledních let však dokázaly, že přebytkem cukerného substrátu a malým množstvím citrónové kyseliny jsou inhibovány všechny známé enzymatické systémy, účastnící se odbourání citrónové kyseliny. Tak například Täufel a Behnke (Nahrung **4**, 793—815, 1960) dokazují, že malé množství citrónové kyseliny inhibuje akonitasu, citritásu i citrate cleavage enzyme. Ramakrishnan (Ramakrishnan C. V., Steel, R., Lentz, C. O.: Arch. Bioch. Biophys. **55**, 270, 1955) dokazuje, že vyvolá-li se adaptací na citrátovém médiu tvorba akonitásy, ztrácí plíseň schopnost produkovat citrónovou kyselinu. Z těchto nálezů je zřejmé, že inhibice enzymatických systémů, účastnících se odbourání citrónové kyseliny, je nutná k její produkci, ale není podmínkou dostačující.

Při úplné inhibici uvedených systémů může totiž produkce být v jednom případě například 20% citrónové kyseliny z cukru v médiu a v druhém případě 80% i více. Takové rozdíly se pochopitelně nepříznivě odrážejí při řízení výrobního procesu. Stabilizace vysokých výtěžků je proto stálý a dosud nevyřešený problém této výroby. Objevení regulačního mechanismu, řídicího výtěžky, by mohlo, proto podstatně přispět i k ovládnutí produkce citrónové kyseliny. Předpokládaný objev dokazuje, že produkce kyseliny je u Aspergillus niger regulována nově isolovanou, ale zatím neidentifikovanou látkou, která ovlivňuje proces odbourání cukru ve směru synthesy citrónové kyseliny.

Jak jsme již podotkli výše, na základě našich pokusů i literárních údajů je známo, že při produkci kyseliny citrónové jsou inhibovány enzymy Krebsova cyklu a další enzymy, účastnící se odbourání této kyseliny. Proto typické enzymatické jedy pro cyklus, jako je fluoroctová kyselina, nezvyšují produkci citrónové kyseliny. O výtěžku proto musí rozhodovat rychlost její synthesy a ne stupeň brzdění jejího odbourání.

Teoreticky se může jednat buď o stimulaci synthesy citrónové kyseliny, o inhibici v tomto případě „vedlejších" cest metabolismu cukru (dýchání a synthesy) nebo o zrychlení procesu vylučování citrónové kyseliny do média, tedy o záležitost permeace. V prvé fázi jsme ověřovali vliv růstového a produkčního média na produkci citrónové kyseliny a prokázali jsme, že o výši produkce rozhoduje produkční médium, a to i tehdy, když inhibujeme proteosynthesu.

P ř í k l a d

Kmen K 10 produkuje na melasovém médiu (M) kolem 70% citrónové kyseliny na nasazený cukr —

na syntetickém médiu (S) kolem 20% citrónové kyseliny.

Melasové médium (M):

řepná melasa	300,0	g
H_3PO_4 5%	1,3	ml
$K_4Fe(CN)_6$ 5%	14,0	ml
H_2O dest	ad 1000	ml

pH 6,7 s KOH nebo s H_2SO_4

Synthetické médium (S):

NH_4NO_3	2,00	g
$MgSO_4$	1,00	g
KH_2PO_4	0,25	g
$ZnSO_4$	0,025	g
$FeSO_4$	0,025	g
sacharosa	150,00	g
H_2O dest.	ad 1000	ml

pH 4,5

Kmen byl kultivován na

a) M médiu

b) S médiu

po nárůstu mycelia bylo médium odstraněno a produkce citrónové kyseliny sledována opět na těchto médiích. Vysoké výtěžky byly dosaženy, jen byl-li kmen kultivován na vysoce produkčním médiu (M) během produkční fáze Růstové médium bylo prakticky bez vlivu.

médium: růstové	produkční	citrónová kyselina %	sušina g
S	S	18,20	2,00
	M	68,80	2,33
M	S	23,50	2,30
	M	69,70	2,30

Přidá-li se zároveň s výměnou média D-L--p-fluorofenylalanin, růst mycelia se zastaví, zatímco schopnost tvorby citrónové kyseliny zůstává nezměněna.

fluorofenylalanin	médium	citrónová kyselina %	sušina g
—	S—M	68,20	2,42
+	S—M	66,80	1,26

Není tedy regulace produkce spojena s tvorbou nějakého specifického enzymu nebo enzymatického systému. Rozhodující úlohu proto mohla hrát nízkomolekulární látka, jejíž existenci jsme se pokusili prokázat. Extrakcí mycelia jsme získali výluh, jehož přidání v nízkoproduktivní půdě silně stimuluje produkci citrónové kyseliny.

Příklad 2

Kmen	citrónová kyselina % bez přidání faktoru	po přidání faktoru
K 10	17,40	48,50
A 10	30,70	63,20
A 20	50,10	68,50

Účinnost zůstala nezměněna, byl-li extrakt povařen, při dialyse procházela aktivní složka semipermeabilní blanou. To ukazuje na látku o nižší molekulové váze. Aktivita zůstala zachována jen za podmínky, že roztok zůstal slabě kyselý. Při pH vyšším než 6,5 až 7,0 aktivita klesala a mizela irreversibilně. Podařilo se nám zachytit aktivní složku na silně bázický anex a z něho eluovat solnou kyselinou. Po odpaření kyseliny solné ve vakuu zůstává sirupovitá tekutina, která si uchovává uvedenou vlastnost — silně stimulovat produkci citrónové kyseliny jak na půdách neproduktivních, tak na půdách produkčních.

Z literatury (Foster, J. W., Carson, S. F.,: J. Am. Chem. Soc. **72**, 1865, 1950; Mosbach, E. H., Phares, E. F., Carson, S. F.: Arch. Bioch. Biophys. **34**, 435, 1952) je známo, že při produkci citrónové kyseliny je fixován kysličník uhličitý a zabudován do 1,6 karboxylových skupin. Podařilo se nám prokázat s kysličníkem uhličitým, se značeným C^{14}, že fixace za přítomnosti faktoru je silně stimulována.

Příklad 3

citrónová kyselina mg na 1 ml		aktivita Ca citrátu	
bez faktoru	s faktorem	bez faktoru	s faktorem
0,77	4,90	72	373

Tyto výsledky ukazují, že faktor může aktivovat fixaci kysličníku uhličitého a tím i tvorbu oxaloctové kyseliny jako prekursoru kyseliny citrónové. Protože specifická aktivita vzniklé citrónové kyseliny je v přítomnosti i nepřítomnosti faktoru stejná, lze usuzovat, že veškerý oxaloctan se vytváří fixací kysličníku uhličitého. Tento nález je v dobré shodě s předcházejícími výsledky o inhibici Krebsova cyklu i glyoxalátového bypassu, neboť tato inhibice zastavuje synthesu oxaloctanu těmito dvěma cestami.

Zůstávala otevřená otázka, zda faktor nepůsobí na secernaci kyseliny do média a tím, že snižuje koncentraci citrónové kyseliny v buňce, i umožňuje její další synthesu. Sledovali jsme proto působení faktoru v rozbitých buňkách plísně a potom přímo s bezbuněčným extraktem a prokázali jsme, že je možné pomocí faktoru synthetizovat se sacharosy citrónovou kyselinu in vitro (za pomoci bezbuněčného extraktu). Tím jsme vyloučili možnost permeability citrónové kyseliny buněčnou stěnou jako rozhodující pro regulaci synthesy a prokázali zároveň, že faktor působí přímo ve směru synthesy citrónové kyseliny a snižuje vydechování CO_2. Stimulace synthesy v bezbuněčném extraktu, kdy je vyloučena proteosynthesa, zároveň dokazuje, že rychlost synthesy buněčné hmoty není pro produkci citrónové kyseliny. Proto faktor může zasahovat přímo do procesu synthesy citrónové kyseliny z cukru a s největší pravděpodobností je jeho zásah ve spojení s fixací kysličníku uhličitého při tvorbě oxaloctové kyseliny.

Při pokusech o identifikaci faktoru můžeme uvést tyto údaje: Jedná se o látku, která je dialysovatelná a termostabilní, tzn., že faktor nepatří mezi makromolekuly. Látka je stabilní v kyselém prostředí. V neutrálním a alkalickém prostředí ztrácí aktivitu, zachycuje se na silně bázických měničích iontů, prochází však katexy. Má tedy charakter kyseliny. Při isolaci z ionexů a dalším čištěním na celulóze se po vakuovém odpa-

ření získá sirupovitá tekutina, jejíž infračervené spektrum má charakteristické znaky karboxylových skupin (viz. přiložený spektogram). Podle chromatografické analysy je tento faktor odlišný od kyseliny citrónové, glukonové, šťavelové, pyrohroznové a mléčné, které kromě toho nemají ani shodné účinky ověřené biologickými testy na produkci citrónové kyseliny. Molekulová váha látky zatím nebyla stanovena.

Objevení regulačního faktoru umožňuje osvětlit podmínky, vedoucí k produkci citrónové kyseliny u plísní. Vysvětluje, proč nestačí pouze inhibovat systémy, účastnící se odbourání této kyseliny, ale že pro výši produkce je určující právě regulace, vyvolaná faktorem. Stálost faktoru pouze v kyselém prostředí je ve velmi dobrém souhlasu se známým faktem, že produkce citrónové kyseliny probíhá jen při pH nižším než 5,0. Při vyšším pH se vytvářejí jiné kyseliny, hlavně glukonová a šťavelová. Skutečnost, že některé kmeny jsou schopny faktor synthetisovat při růstu na minerálním médiu se sacharosou a jiné kmeny vyžadují k jeho synthese melasovou půdu, která obsahuje patrně prekursor faktoru, vysvětluje rozdílnost kmenů, schopných produkovat citrónovou kyselinu. Jsou kmeny, které produkují na všech médiích — u těch byla také dokázána schopnost synthetisovat na těchto médiích faktor. Jiné produkují pouze na melase a výtěžky jsou kolísavé podle kvality melasy. Ukazuje se, že výtěžky jsou závislé na tom, jak na které melase kmen produkuje faktor. Je proto produkce faktoru jedním z rozhodujících kriterií pro produkční kmeny. Přitom se zřejmě nejedná jen o specifický problém produkce kyseliny citrónové, ale nález má obecnější charakter. O tom svědčí fakt, že faktor byl nalezen též u Aspergillus terreus, produkující kyselinu itakonovou. Z toho lze usuzovat, že i v tomto případě tvorba oxaloctové kyseliny fixací z kysličníku uhličitého na pyrohroznovou, případně fosfoenolpyrohroznovou kyselinu hraje při synthese itakonové kyseliny roli. Faktor odstraňuje při produkci citrónové kyseliny inhibiční účinky sulfonamidů, které podle Krebse (Krebs, H. A.: Biochem. J. **43**, 550, 1948) zasahují do fixace kysličníku uhličitého. Tento účinek faktoru ukazuje, že se asi jedná o obecně platnější schéma metabolismu cukru a že synthesa oxaloctové kyseliny fixací CO_2 jako výchozí sloučeniny Krebsova cyklu hraje v organismech větší roli, než se většinou předpokládá. Vedle isolace faktoru a jeho chemické identifikace je proto nutné hlavně pomocí bezbuněčných extraktů zjistit první místo působení faktoru a jeho význam z hlediska obecné platnosti v organismech.

Oblasti možného využití

Produkce citrónové kyseliny pomocí plísní je ekonomicky závažná, neboť spotřeba citrónové kyseliny neustále stoupá a pohybuje se již asi kolem 100 000 tun. Přitom se výrobní postup tají, neboť nejsou známy objektivní podmínky, které jsou podkladem vysoké přeměny cukru na citrónovou kyselinu. Všeobecně se ví, že výtěžnost kolísá a nejsou jasné důvody. Nedostatek tkví v tom, že se málo ví o mechanismu regulace produkce citrónové kyseliny. Zatím, co se soudilo, že rozhodující pro produkci je inhibice enzymů účastňujících se odbourání citrónové kyseliny, objev faktoru ukazuje, že vedle inhibice odbourání, které je nutné, je stejně nutnou podmínkou regulace katabolismu cukru ve směru synthesy citrónové kyseliny. Prakticky to znamená, že při vyhledávání kmenů, respektive při šlechtění, je nutno orientovat se na kmeny, schopné produktovat faktor z minerálního média a z cukru. U kmenů, které k produkci faktoru vyžadují prekursory nebo zvláštní podmínky z hlediska organických látek (melasa), je nutno počítat vždy s kolísáním výsledků v závislosti na přítomnosti prekursorů (tj. například i v závislosti na kvalitě použité melasy). Je možné, že by se melasy daly oceňovat podle množství faktoru, které je na nich plíseň schopna produkovat.

Otevřená zůstává otázka submersní fermentace. Faktor není na vzduchu stabilní a je otázkou, do jaké míry hraje roli jeho případné odbourávání kyslíkem při submersní fermentaci. Tyto otázky jsou předmětem našeho dalšího studia.

Teoreticky je závažný vztah mezi antagonistickými účinky faktoru a sulfonamidů. Z literatury (Krebs, H. A., Biochem. J. **43**, 550, 1948, Rajagopalan, K. V., Radhakrishnamurthy, R., Sarma, P. S.: Nature **7**, 184, 461, 1959) je známo, že sulfonamidy inhibují anhydrásu kyseliny uhličité a brzdí produkci citrónové kyseliny. U faktoru jsme prokázali pozitivní vliv na stimulaci fixace CO_2. Tyto výsledky naznačují, že fixace kysličníku uhličitého je hlavním zdrojem tvorby oxaloctové kyseliny u plísní a experimentální důkazy této hypothesy by jednoznačně prokázaly mechanismus regulace její produkce. Důkazy v tomto směru mají přinést experimenty s bezbuněčným extraktem a intermetabolity. Rovněž u jiných mikroorganismů (u bakterií) jsme prokázali obdobný antagonistický účinek (sulfonamidy — faktor). Potom by asi cesta tvorby oxaloctové kyseliny fixací CO_2 měla obecnější význam, dokonce základní pro životní funkce mikroorganismů. V každém případě, obecná platnost antagonismu faktor — sulfonamidy ukazuje, že existence faktoru má obecný význam v metabolismu mikroorganismů, i když vedle výše uvedených hypothes (fixace CO_2) zatím nemáme jiné představy. Cílem další práce je proto přesně definovat místo působení faktoru a do jaké míry je jeho působení zúženo na několik plísňových mikrorganismů, a do jaké míry má platnost obecnou. To znamená, zda hraje zásadní roli při metabolismu cukrů a získávání energie vůbec.

Severografia, n. p., provozovna 32 Most