

# Změny biosyntetické aktivity *Aspergillus niger* vlivem opakované aplikace mutagenů

66.098 582.282.123.4

RNDr. MARIE MUSÍLKOVÁ, CSc., RNDr. EMMA UJCOVÁ, CSc., RNDr. LEOPOLD SEICHERT, CSc., Prof. Ing. VLADIMÍR KRUMPHANZL, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Jedním ze základních předpokladů pro úspěšnou výrobu kyseliny citrónové je izolace vysokovýťažkového produkčního kmene. I když výroba kyseliny citrónové patří mezi první moderní fermentační postupy vůbec, intenzivní šlechtění produkčních kmenů začalo až v době, kdy byly vypracovány metody pro získání kmenů produkujících velká množství antibiotik.

Cílenému šlechtění kmenů je na závalu, že přes dlouhodobé studium není dosud definitivně vyřešeno, co je příčinou vysokého hromadění kyseliny citrónové. Z řady teorií se nejčastěji uvádí inhibice enzymů akonitázy a dehydrogenázy kyseliny isocitrónové (Ramakrishnan aj., 1955) nebo dehydrogenázy kyseliny 2-ketoglutarové (Kubicek a Röhr, 1978). Přes některé nevyjasněné otázky se však podařilo značně zvýšit biosyntetickou aktivitu produkčních kmenů *Aspergillus niger*, a to zásluhou hlavně mutagenních faktorů (Das a Nandi, 1972, Tavares a de Azevedo, 1974). Pokusy využít parasexuálního cyklu byly jen ojedinělé a nepřinesly prakticky významné výsledky (Ilczuk, 1971).

Pro výrobu kyseliny citrónové se doposud většinou používá původní postup povrchového kvašení, avšak v mnoha zahraničních závodech se zavádí moderní postup submersní fermentace. Pro tento způsob je třeba izolovat

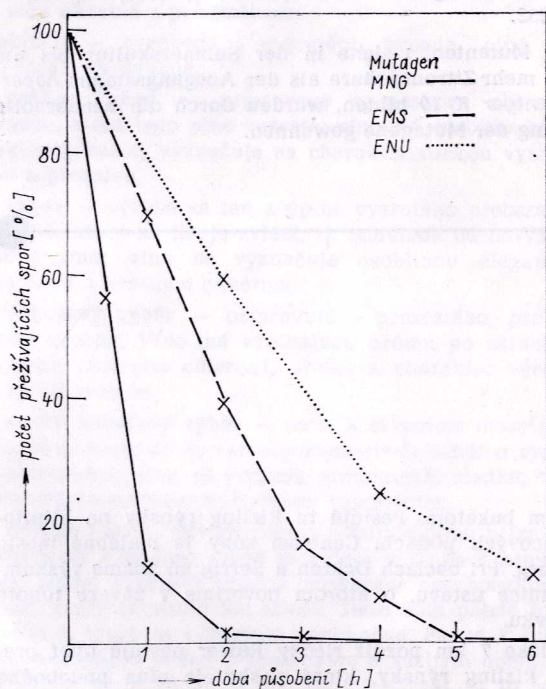
nové produkční kmeny, protože kmeny vyšlechtěné pro povrchový způsob kultivace vykazují nízkou produkci, jsou-li kultivovány submersně. Podobně tomu bylo i v našich začátečních pokusech, kdy jsme při srovnání aktivity kmenů *A. niger*, hromadících 50–60 % kyseliny citrónové při povrchové kultivaci, dosáhli jen 20–25 % při submersní kultivaci na rotační třepačce. Úprava kultivačních podmínek a složení média zvýšila výtěžky u nejlepšího kmene *A. niger* K 10 na 35–40 % (podmínky kultivace a stanovení kyseliny citrónové uvedeny v práci Musílkové aj., 1978).

Za těchto okolností jediným možným postupem pro zvýšení výtěžků bylo získání vhodného produkčního kmene vysoce aktivního za submersních podmínek. Protože podle uvedených literárních údajů největší naději na získání vysokovýťažkových kmenů má aplikace mutagenních faktorů, zaměřili jsme naše pokusy tímto směrem. Podrobili jsme působení mutagenů kmen *A. niger* K 10, který se v předběžném výběru ukázal jako relativně nejlepší. Z mutagenů jsme v první řadě používali UV světlo. Jeho zdrojem byla germicidní lampa Philips, kterou jsme ozářovali suspensi spor *A. niger* ze vzdálenosti 25 cm. Intenzita záření byla za uvedených podmínek 5,9 J/m<sup>2</sup>/s. Vliv UV na spory *A. niger* se projevoval velmi silně: po třiceti



sekundách působení UV přežívalo přibližně jen 10 % spor, po 1 min asi 1 %, po 2 min 0,1 %, po 3 min méně než 0,01 %. Po 5 min ozařování přežívaly jen zcela ojedinělé spory. Při sledování schopnosti izolátů hromadit kyselinu citrónovou během kultivace na rotační třepačce jsme zjistili, že zatímco u izolátů získaných bez působení mutagenu se produkce pohybovala většinou mezi 50 až 110 % neselektovaného kmene, po působení UV světla byla nalezena řada izolátů s produkcí podstatně nižší, ale i několik s produkcí nad 110 %. Zajímavé bylo, že jsme nenašli ani jeden izolát, který by vůbec nehromadil kyselinu citrónovou. Většina izolátů měla původní černou barvu spor, jen v ojedinělých případech došlo ke změně barvy.

Z chemických mutagenů jsme používali ethylmethan sulfonát (EMS), N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNG) a N-ethyl-N-nitrosomočovinu (ENU). EMS jsme používali v koncentraci 0,15 M v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,0), MNG v koncentraci 1 mg/ml v 0,1 M tris-maleinonovém pufru (pH 6,0), EMU v koncentraci 25 mg/ml v 0,1 M citrát-fosfátovém pufru (pH 4,0). Porovnání vlivu těchto chemických mutagenů na přežívání spor *A. niger* je uvedeno na grafu 1.

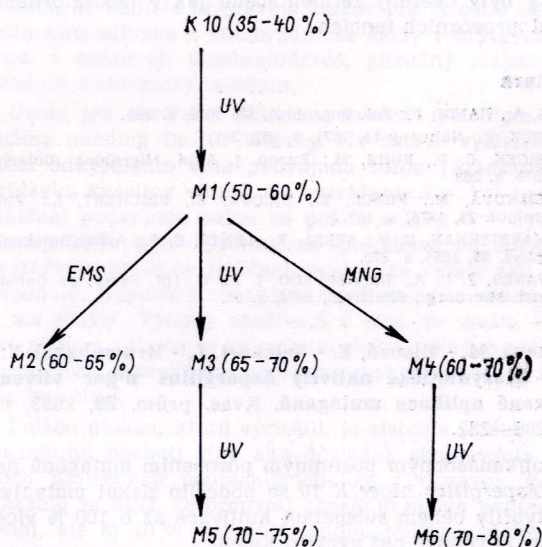


Obr. 1. Vliv chemických mutagenů na přežívání spor *A. niger*

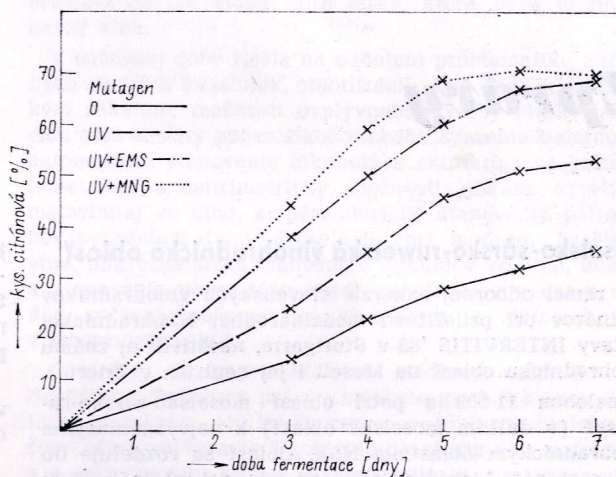
Z grafu 1 vyplývá, že za uvedených podmínek nejrychleji působil na spory *A. niger* MNG. Porovnání s působením UV světla ukazuje, že působení UV po dobu 1 min má tentýž účinek jako působení MNG po dobu 2 h nebo působení EMS po dobu 5 h. U ENU ani po 6 h působení neklesl počet spor pod 10 %. Při testování produkce kyseliny citrónové u jednotlivých izolátů bylo zjištěno, že izoláty s produkcí nad 110 % byly nalezeny jen po působení MNG a EMS, a to převážně v pokusech, kde přežívalo maximálně 1 % spor.

Vysokovýťažkové kmeny nebyly získány jediným zásahem mutagenu, ale bylo třeba působení mutagenů opakovat. Pokusy probíhaly tak, že po opakovaném fermentačním ohodnocení přibližně 150 izolátů byl vybrán

nejlepší z nich a ten podroben pasivní selekci bez působení mutagenu. Izolát s nejvyšší stabilní produkcí kyseliny citrónové byl znovu podroben působení buď téhož nebo jiného mutagenu. Tímto způsobem byly izolovány mutanty s postupně se zvyšující produkcí kyseliny citrónové. Schéma postupu izolace některých vysokovýťažkových mutantů je uvedeno na grafu 2.



Obr. 2. Postup izolace vysokovýťažkových mutantů



Obr. 3. Časový průběh biosyntézy kyseliny citrónové u mutantů *A. niger*

Jak z grafu 2 vyplývá, podařilo se tímto postupem zvýšit za laboratorních podmínek výťažek kyseliny citrónové z původních 35–40 % až na 70–80 % [počítáno na vnesený cukr]. Časový průběh biosyntézy kyseliny citrónové u tří mutantů izolovaných po působení mutagenů je uveden na obr. 3. Mutant vzniklý po působení UV světla vykazoval výťažky přibližně o 60 % vyšší než původní kmen, mutant po postupném působení UV a EMS a mutant po postupném působení UV a MNG téměř o 100 %, přičemž u mutantu vzniklého po působení UV a MNG bylo vysoké produkce dosaženo v kratším časovém intervalu. Uvedené mutanty měly černé spory, ale podařilo se



izolovat i vysokoprodukční mutant se skořicově zbarvenými sporami. Zvýšení výtěžků kyseliny citrónové u mutantů bylo trvalé.

Na základě uvedených výsledků lze souhrnem říci, že při izolaci kmenů *A. niger*, produkujících značné množství kyseliny citrónové za submerzních podmínek se osvědčil postup mutagenese. Nejlepší produkční kmeny byly získány po opakovaném působení mutagenů. Vysoké výtěžky byly ověřeny fermentacemi jak v laboratorních, tak poloprodučních tancích.

#### Literatura

- [1] DAS, A., NANDI, P.: *Fol. microbiol.* 17, 1972, s. 248.
- [2] ILCZUK, Z.: *Nahrung* 15, 1971, s. 251, 381.
- [3] KUBICEK, C. P., RÖHR, M.: *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 5, 1978, s. 283.
- [4] MUSÍLKOVÁ, M., FENCL, Z., UJCOVÁ, E., SEICHERT, L.: *Fol. microbiol.* 23, 1978, s. 103.
- [5] RAMAKRISHNAN, C. V., STEEL, R., LENTZ, C. P.: *Arch. Biochem. Biophys.* 55, 1955, s. 270.
- [6] TAVARES, F. C. A., DE AZEVEDO, J. L.: II. Int. Symp. on Genet. Indust. Microorg., Sheffield, 1974, s. 86.

**Musílková, M. - Ujcová, E. - Seichert, L. - Krumphanzl, V.: Změny biosyntetické aktivity *Aspergillus niger* vlivem opakované aplikace mutagenů.** *Kvas. prům.* 29, 1983, č. 10, s. 230—232.

Několikanásobným postupným působením mutagenů na kmen *Aspergillus niger* K 10 se podařilo získat mutanty, které tvořily během submersní kultivace až o 100 % více kyseliny citrónové než výchozí kmen.

**Мусилкова, М., Уйцова, Е., Сейхерт, Л., Крумпханзл, В.: Изменения биосинтетической активности штамма *Aspergillus niger* над действием повторного применения мутагенов.** *Квас. прум.* 29, 1983, № 10, стр. 230—232.

После многократного последовательного влияния мутагенов на штамм *Aspergillus niger* K 10 удалось получить такие мутанты, которые в течение глубинного культивирования образовали лимонную кислоту в количестве превышающем 100 % количество, образованное первоначальным штаммом.

**Musílková, M. - Ujcová, E. - Seichert, L. - Krumphanzl, V.: Changes in Biosynthetic Activity of *Aspergillus niger* Due to Repeated Treatment with Mutagens.** *Kvas. prům.* 29, 1983, No. 10, pp. 230—232.

The mutants producing about 100 % more of citric acid than the original strain *Aspergillus niger* K 10 under submerged cultivation conditions were obtained by the repeated action of the mutagens.

**Musílková, M. - Ujcová, E. - Seichert, L. Krumphanzl, V.: Änderungen der biosynthetischen Aktivität von *Aspergillus niger* unter Einwirkung der wiederholten Applikation von Mutagenen.** *Kvas. prům.* 29, 1983, No. 10, S. 230—232.

Die Mutanten, welche in der Submerskultur bis um 100 % mehr Zitronensäure als der Ausgangsstamm *Aspergillus niger* K 10 bilden, wurden durch die wiederholte Wirkung der Mutagene gewonnen.