

## BIOSYNTENZA WITAMIN I ENZYMÓW

J. JANICKI, E. SOBKOWSKA

Katedra Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu

Jedną z poważnych dziedzin praktycznego zastosowania biochemii, a równocześnie wyrazem nowoczesności w produkcji, jest biosynteza witamin i enzymów na skalę przemysłową. W krajach o wysokiej technice biosynteza mikrobiologiczna stała się wielką gałęzią przemysłu fermentacyjnego i farmaceutycznego. W Polsce przed biochemikami stoi jeszcze ciągle zadanie adaptacji i opracowania laboratoryjnego wielu dziedzin biosyntezy.

W Katedrze Technologii Rolnej prace nad biosyntezą witamin i enzymów prowadzone są już przeszło 10 lat i obejmują z zakresu witamin:

witaminy z grupy B<sub>12</sub>  
beta-karoten  
witaminę B<sub>2</sub>

z zakresu enzymów:

enzymy amylolityczne  
enzymy proteolityczne  
celulazy  
glikooksydazę.

### Biosynteza witamin z grupy B<sub>12</sub>

W 1952 roku w Katedrze naszej zapoczątkowano prowadzone do dzisiaj badania nad witaminą B<sub>12</sub>. Już w pierwszym roku badań uzyskaliśmy po raz pierwszy w Polsce krystaliczny, aktywny preparat witaminy B<sub>12</sub> z hodowli promieniowców z rodzaju *Streptomyces* (7). Przebadano w tym czasie zdolność biosyntezy witamin B<sub>12</sub> pięćdziesięciu szczepów promieniowców izolowanych w naszym laboratorium z różnych gleb. Czterdzieści trzy szczepy wykazywały zdolność wytwarzania witaminy B<sub>12</sub>, 22 odznaczało się stosunkowo dużą wydajnością (0,8—1,0 µg/ml) (10).

Zliofilizowanych szczepów używaliśmy następnie do dalszych badań nad udoskonaleniem metod oznaczania (spektrofotometrycznie i mikrobiologicznie z *Euglena gracilis*) witaminy B<sub>12</sub> w hodowlach drobnoustrojów (8, 9).

Wkrótce po badaniach Lewtona i Hargrove (16) nad zdolnością biosyntezy witamin z grupy B<sub>12</sub> przez bakterie kwasu propionowego stwierdziliśmy na jednym gatunku tych bakterii (*Propionibacterium shermanii*) że wytwarza on obok nieznacznych ilości witaminy B<sub>12</sub>, inny czynnik nazwany przez nas witaminą B<sub>12p</sub> (4). Analog ten pozbawiony ugrupowania nukleotydowego okazał się później identyczny z czynnikiem B Forda (1). W dalszych badaniach wykazaliśmy, że bakterie kwasu propionowego wykorzystują dodany do pożywki 5,6-dwumetylobenzimidazol syntetyzując witaminę B<sub>12</sub> w miejsce „niekompletnej” witaminy B<sub>12p</sub> (5, 17). Dodając do pożywki inne pochodne benzimidazolowe uzyskaliśmy szereg nowych analogów witaminy B<sub>12</sub> (19).

Kierunek biosyntezy witamin z grupy B<sub>12</sub> staraliśmy się zmienić również na innych drogach. Ciekawe rezultaty otrzymaliśmy stosując do pożywek bakterii kwasu propionowego dodatki antybiotyków i sulfatiazolu. Substancje te podobnie jak 5,6-dwumetylobenzimidazol przesuwają biosyntezę w kierunku właściwej witaminy B<sub>12</sub> (3, 11, 12, 18). Rzuca to nieco światła na mechanizm dodatniego działania antybiotyków podawanych młodym zwierzętom w paszach.

Mając na uwadze duże zapotrzebowanie przemysłu fermentacyjnego i paszowego na witaminę B<sub>12</sub> staraliśmy się opracować tanie źródła dużych ilości tej witaminy. W tym celu zajęliśmy się z jednej strony ściekami miejskimi z drugiej natomiast ulepszaniem biosyntezy przez bakterie kwasu propionowego.

Po dłuższych badaniach opatentowaliśmy metodę otrzymywania koncentratów i krystalicznej witaminy B<sub>12</sub> ze ścieków miejskich poddanych fermentacji metanowej (3, 6), z wydajnością 10 mg witaminy B<sub>12</sub>/100 l ścieków. W toku tych badań opracowaliśmy nową metodę spektrofotometrycznego oznaczania tej witaminy w koncentratkach bez dodatkowego oczyszczania.

W badaniach nad bakteriami kwasu propionowego zastosowaliśmy tanią pożywkę opartą na autolizacie drożdżowym i skróciliśmy czas fermentacji do 96 godzin uzyskując wydajność 8—10 μM witaminy B<sub>12</sub>/1 litr pożywki (2). Metoda ta po weryfikacji w Zakładach Farmaceutycznych w Tarchominie, została opublikowana.

Witamina B<sub>12</sub> odgrywa poważną rolę nie tylko dla młodych organizmów zwierzęcych, lecz również w żywieniu człowieka. Dlatego też zajęliśmy się możliwością wzbogacenia niektórych produktów spożywczych w tę

witaminę. Stwierdziliśmy, że wszystkie badane przez nas gatunki *Propionibacterium* posiadają zdolność biosyntezy witamin z grupy B<sub>12</sub> jednakże w różnej ilości i jakości (20).

Szczepiąc mleko przy produkcji serów edamskiego i tyłzyckiego wybranymi szczepami bakterii (*P. sermanii* 1, *P. freudenreichii* 3, *P. pentosaceum* 13) uzyskaliśmy sery o zwiększonej zawartości witaminy B<sub>12</sub> (13).

Badając mechanizm biosyntezy witaminy B<sub>12</sub> stwierdziliśmy, że dodatek „aktywnej metioniny” (S-adenozyl-L-metionina) zwiększał wydajność tej witaminy przez *Propionibacterium shermanii* (15).

Przedmiotem naszych obecnych badań jest stosowanie mieszanych hodowli bakteryjnych przy biosyntezie witaminy B<sub>12</sub> (14) oraz wydobywanie i charakterystyka kompleksów tej witaminy z białkiem.

### Biosynteza beta-karotenu

Wśród mikroorganizmów największą aktywnością w biosyntezie karotenu odznaczają się pleśnie, jednak tylko nieliczne produkują ten związek w zasługujących na uwagę ilościach. Szczególne znaczenie posiadają te gatunki, które produkują beta-karoten.

Badania nad biosyntezą karotenu rozpoczęto w naszej Katedrze w 1959 roku. Sprawdzone 5 szczepów: *Penicillium sclerotiorum*, *Choanaphora persicaria*, *Choanaphora cucurbitarum*, *Neurospora sitophila* i *Neurospora crassa*. Biosyntezę prowadzono na płynnych pożywkach naturalnych i syntetycznych. Lepsze okazały się pożywki naturalne, a przede wszystkim pożywka brzezkowa oraz przygotowana na ekstrakcie z otrąb pszennych.

Wydajność beta-karotenu dochodziła do 250 mg%. Najwyższe wyniki uzyskiwano dla *Penicillium sclerotiorum*. Stwierdzono dużą zależność tworzenia się karotenów od pH pożywki. Optymalne pH dla *Penicillium sclerotiorum* leżało w granicach wartości 3 do 3,5, dla pozostałych szczepów 4,5 do 6,5.

Maksimum wydajności obserwowano między 10 a 15 dniem biosyntezy w temperaturze 24—26°. Zarówno niższe jak i wyższe temperatury hamowały biosyntezę.

Napowietrzanie hodowli przez jej wytrząsanie w kolbach obniżało u wszystkich szczepów zdolność biosyntezy karotenów. Najlepsze wyniki uzyskiwano w hodowlach bez napowietrzania w kolbach stożkowych o pojemności 750 ml przy warstwie pożywki do 1 cm grubości.

Naświetlanie hodowli w czasie biosyntezy obniżało wydajność beta-karotenu i sprzyjało tworzeniu się barwników ksantofilowych. Przy zaszczepianiu zawieszoną zarodników przestrzegano, by na 1 ml pożywki

ilość zarodników wynosiła około 25 000, gdyż mniejsza zawartość przedłużała czas biosyntezy i obniżała jej wydajność.

Ostatnio wyizolowano w Katedrze z materiału roślinnego szczep pleśni przy pomocy którego uzyskiwano wydajność beta-karotenu do 600 mg %. Najlepszą dla tego szczepu okazała się płynna pożywka przygotowana na kwasowych hydrolizatach kazeiny i kukurydzy. W odróżnieniu od poprzednich, wymieniony szczep wzrastał i syntetyzował beta-karoten w warunkach silnego napowietrzania pożywki.

Obecnie prowadzi się prace nad określeniem właściwości morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych tego szczepu.

### Biosynteza witaminy B<sub>2</sub>

Biosyntezę witaminy B<sub>2</sub> prowadziliśmy przy pomocy pleśni *Eremothecium ashbyii*, uzyskując maksymalną wydajność 1—1,6 mg/ml. Stwierdziliśmy, że wydajność ta przy jednakowych warunkach hodowli może wahać się w szerokich granicach, co spowodowane jest występowaniem mutantów o zabarwionej lub bezbarwnej grzybni. Wyselekcjonowaliśmy obydwaj mutanty i stwierdziliśmy, że mutant o zabarwionej grzybni wykazujący wolniejsze tempo wzrostu i mniejszą aktywność procesów oddechowych niż mutant bezbarwny charakteryzuje się intensywną biosyntezą witaminy B<sub>2</sub>. Stabilizację obydwu mutantów uzyskaliśmy przez dodatek penicyliny, przechodzenie mutantu jasnego w ciemny powodował dodatek streptomycyny.

Stwierdziliśmy ponadto, że w odpowiednich warunkach szczep żółty produkuje oprócz wolnej ryboflawiny flawino-adenino-dwunukleotyd w ilości do 10% ogólnej zawartości flawin. Szczep ten może być źródłem otrzymania FAD.

### Biosynteza enzymów amylolitycznych

Biosyntezę enzymów amylolitycznych prowadziliśmy przy pomocy pleśni z rodzaju *Aspergillus* na stałych pożywkach otrębowych. Po wyselekcjonowaniu szczepu *Aspergillus oryzae* o wysokiej aktywności amylolitycznej, badaliśmy aktywność biosyntezy enzymów amylolitycznych w zależności od składu podłoża i warunków hodowli. Opracowaliśmy parametry hodowli pozwalające na otrzymanie taniego preparatu pleśniowego o sile cukrującej przeciętnie wyższej o 40% od siły cukrującej słodu. Zmian aktywności tego preparatu nie obserwowaliśmy w ciągu roku przechowywania przy wilgotności względnej 75% w normalnych temperaturach.



Przeprowadzone doświadczenia na skalę przemysłową wykazały, że wydajność alkoholu przy użyciu tego preparatu nie ustępuje wydajności uzyskiwanej stosując sód jako czynnik scukrzający skrobię ziemniaczaną.

### Biosynteza enzymów proteolitycznych

Badając aktywność proteolityczną 21 szczepów z rodzaju *Aspergillus* wyodrębniliśmy trzy szczepy o wysokiej aktywności. Spośród nich najlepsze wyniki uzyskaliśmy dla szczepu *Aspergillus oryzae*. Stwierdziliśmy, że istnieje zależność między wiekiem hodowli standardowej na skosach brzezkowo-agarowych a aktywnością proteolityczną hodowli produkcyjnej na stałym podłożu otrębowym. Optymalny wiek hodowli standardowej wynosi 5 dni.

Przy użyciu otrzymanego preparatu proteolitycznego badaliśmy parametry hydrolizy żelatyny i kazeiny. Stwierdziliśmy, że preparat wykazuje wysoką aktywność wobec obu badanych białek doprowadzając do daleko posuniętego rozkładu z uwolnieniem ponad 50% aminokwasów. Dobierając odpowiednie pH hydrolizy, otrzymaliśmy hydrolizaty kazeiny pozbawione gorzkiego smaku charakterystycznego przy enzymatycznych hydrolizatach tego białka.

### Biosynteza celulaz

Działając na paszę o dużej zawartości celulozy enzymami hydrolizującymi ten związek można znacznie zwiększyć ich wartość odżywczą. Przy rozkładzie celulozy następuje uwolnienie związków inkrustujących takich jak białka, tłuszcze, witaminy i sole mineralne.

Do biosyntezy celulaz używaliśmy pleśni *Trichothecium roseum*. Stwierdziliśmy, że aktywność produkowanych przez ten szczep enzymów uzależniona była od rodzaju podłoża, temperatury oraz czasu hodowli. Optymalne parametry stanowiła temperatura 20—22°, czas hodowli 2—3 dni i pożywka zawierająca otręby pszenne, autolizat drożdżowy i wodę destylowaną. Aktywność celulazy wynosiła 70—79% w odniesieniu do rozkładu celulozy podłoża i 8—16% w odniesieniu do rozkładu preparatu celulozy przez sok komórkowy.

### Biosynteza

#### $\beta$ -D-glukopyranozo-aerodehydrogenazy

W celu otrzymania aktywnego preparatu glukooksydazy przebadaliśmy 7 szczepów pleśni z rodzaju *Aspergillus*. Szczepy *A. niger* CBS 13 i *A. niger* P(As)VII wykazywały stosunkowo wysoką aktywność (około

11,5 i 16 jednostek na g suchej masy). Najwyższą aktywność uzyskiwano stosując zmodyfikowaną pożywkę Müllera. Zastąpienie sacharozy melasem, nie powodowało istotnych zmian aktywności. Dodatek namoku kukurydzianego powodował znaczny wzrost masy grzybni przy równoczesnym spadku aktywności.

Z grzybni *A. niger* CBS 13 otrzymaliśmy surowy preparat gluko-oksydazy o aktywności 90 jednostek na g suchej masy. Ze względu na dobre cechy organoleptyczne (szaro-żółtawe zabarwienie, słaby posmak bulionu) może on być stosowany do utrwalania środków spożywczych.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Ford J. E., Porter J. W. G.: *Biochem. J.* **51**, V (1952).
2. Janicki J., Kotala L., Pędziwilk F.: *Intern. Symp. on B-Vitamins*, Poznań, 1959, PAN, str. 51.
3. Janicki J., Nowakowska K.: *Intern. Symp. on B-Vitamins*, Poznań, 1959, PAN, str. 33, 36.
4. Janicki J., Pawełekiewicz J.: *Acta Biochim. Polon.*, **1**, 307 (1954).
5. Janicki J., Pawełekiewicz J.: *Acta Biochim. Polon.*, **2**, 329 (1955).
6. Janicki J., Pawełekiewicz J., Nowakowska K.: *Acta Biochim. Polon.*, **3**, 161 (1956).
7. Janicki J., Pawełekiewicz J., Stawicki S., Szebiotko K., Żodrow K.: *Przemysł Chem.*, **9**, 8, 386 (1953).
8. Janicki J., Pawełekiewicz J., Stawicki S., Żodrow K.: *Przemysł Chem.*, **9**, 509 (1953).
9. Janicki J., Pawełekiewicz J., Stawicki S., Żodrow K.: *Przemysł Chem.*, **9**, 614 (1953).
10. Janicki J., Pawełekiewicz J., Stawicki S., Żodrow K.: *Acta Biochim. Polon.*, **3**, 3 (1954).
11. Janicki J., Pędziwilk F.: *Acta Biochim. Polon.*, **5**, 299 (1958).
12. Janicki J., Pędziwilk F.: *Intern. Symp. on B-Vitamins*, Poznań, 1959, PAN.
13. Janicki J., Pędziwilk F., Kiszka J.: Praca referowana na XVI Kongresie Mleczarskim w Kopenhadze, 1962, oddana do druku w „Die Nahrung”
14. Janicki J., Pędziwilk F.: Praca wygłoszona na II Sympozjum Fermentacyjnym w Londynie, 1964.
15. Janicki J., Skupin J.: *Bull. de l'Acad. Polon. des Sciences Cl.* V. **9**, 19 (1953).
16. Lewiton A., Hargrove E. R.: *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 2651 (1952).
17. Pawełekiewicz J.: *Acta Biochim. Polon.*, **1**, 313 (1954).
18. Pawełekiewicz J.: *Acta Biochim. Polon.*, **2**, 321 (1955).
19. Pawełekiewicz J., Nowakowska K.: *Acta Biochim. Polon.*, **2**, 259 (1955).
20. Pędziwilk F.: *Prace z Zakresu Biochemii i Chemii Rolnej*, Poznańskie Towarzystwo Przyjaciół Nauk, Wyd. Nauk Roln. i Leśn. **11**, 141 (1962).