

# BIOSYNTHEZA LIPIDŮ V MIKROORGANISMECH\*

A. KLEINZELLER

*Ústav kvasné chemie a mykologie na vysoké škole chemicko-technologického inženýrství v Praze*

Úkolem tohoto referátu je ukázati stav našich znalostí v tomto oboru a objasnit všechny faktory, které mohou hráti roli při případném využití výsledků v průmyslu.

Lipidy představují jednu ze základních složek každé buňky. Tyto složky (včetně lipidů) jsou syntetisovány buňkou ze živin, které jsou obsaženy v substrátech. Substrát slouží tedy jako zdroj základních stavebních kamenů protoplazmy (t. j. jako zdroj uhlíku, dusíku, popelovin, atd.). Substrát však současně slouží jako zdroj energie pro životní pochody, t. j. také jako zdroj energie potřebné pro syntetické reakce. Mikrobiální buňka tedy současně oxypuje substrát a takto získává energii, kterou pak spotřebuje pro současně probíhající syntetické pochody.

Pokud jde o funkci substrátů jako zdroje uhlíku, víme nyní, že u tukotvorných kvasinek je část tohoto substrátu oxypována na CO<sub>2</sub>, část uhlíku se objeví v lipidech a část se ukládá ve formě polysacharidů v buňce. Tyto skutečnosti vyplývají z následující tabulky.

*Tab. 1. Bilance uhlíku v Torulopsis lipofera [6]  
(Kvasinky v 0.1 M NaCl s 0,05 m KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, při 25° C, 5 hod.)*

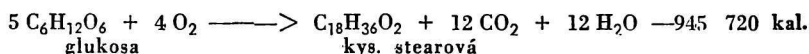
|                                | Počátek | po 5 hod. | Utvořeno (+)<br>spotřebováno (—) | C-spotř.<br>mg | C utvoř.<br>mg |
|--------------------------------|---------|-----------|----------------------------------|----------------|----------------|
| pH                             | 3,66    | 3,21      |                                  |                |                |
| Glukosa                        | 3290 mg | 1540 mg   | —1750 mg                         | 700            |                |
| CO <sub>2</sub>                | —       | 1105 mg   | +1105 mg                         |                | 301            |
| C v prostředí (netěkavé látky) | 1315 mg | 634 mg    | — 681 mg                         | (681)          |                |
| ethanol                        | —       | 10 mg     | + 10 mg                          |                | 5              |
| kyselina mléčná                | 0       | 0         |                                  |                |                |
| ketokyseliny                   | 0       | 0         |                                  |                |                |
| kvasinky (sušina)              | 3146 mg | 3923 mg   | + 774 mg                         |                |                |
| C v kvasinkách                 | 1533 mg | 1903 mg   | + 370 mg                         |                | 370            |
| N v kvasinkách                 | 164 mg  | 169 mg    | + 5 mg                           |                |                |
| nezmýdelnitelný podíl          | 56 mg   | 62 mg     | + 6 mg                           |                | (158)          |
| mastné kyseliny                | 706 mg  | 908 mg    | + 202 mg                         |                |                |
| jod. č.                        | 82,3    | 77,3      |                                  |                |                |
| prům. mol. váha                | 270     | 275       |                                  |                |                |
| sacharidy v kvasinkách         | 588 mg  | 929 mg    | + 340 mg                         |                | (151)          |

## *Podmínky tvorby mastných kyselin z uhlohydrátů*

Při studiu tvorby lipidů máme na mysli zejména otázky syntézy mastných kyselin, obsažených v těchto lipidech ve formě glyceridů,

\* Prednesené na pracovnej konferencii chemických výskumníkov, technikov, zlepečovateľov a novátorov v Banskej Štiavnici v júli 1951.

(příp. i jinak). Chceme-li si objasnit otázku způsobu vzniku mastných kyselin, je nutno zabývatí sa v prvé řadě podmínkami, které ovlivňují tvorbu mastných kyselin (lipidů). Z modelové reakce:



vyplývá, že tvorba mastných kyselin z uhlohydrátů je endothermický pochod. Energie potřebná k tomu, aby kyselina stearová byla syntetisována z glukosy, je poskytována současným spalováním dalších molekul glukosy.

V průběhu tvorby tuků z uhlohydrátů je pravidelně zvýšen tak zv. dýchací kvocient, t. j. poměr vydýchaného CO<sub>2</sub> ke spotřebovanému O<sub>2</sub> (ve shora uvedené modelové reakci, tedy 12/4 = 3,0). Důvody vyplývají z modelové reakce. Čím vyšší je výkonnost synthetického pochodu, t. j. čím nižší je počet molekul glukosy potřebný pro syntésu jedné molekuly na př. kyseliny stearové, tím vyšší je dýchací kvocient. U mikroorganismů, u nichž byl námi sledován dýchací kvocient v průběhu ztučnění, byly nalezeny hodnoty od 1,1 — 1,8 i více. Bohužel, nelze z těchto měření učiniti přímé závěry na stechiometrický průběh syntésy mastných kyselin z uhlohydrátů, protože, jak již uvedeno shora, část spotřebovaného uhlíkatého zdroje je ukládána v buňce ve formě jiné než lipidy, t. j. na př. uhlohydrát.

Velmi významným faktorem pro syntésu lipidů z uhlohydrátů je přítomnost asimilovatelného dusíku v substrátu. Všichni pracovníci v tomto oboru shodně našli, že přítomnost asimilovatelného dusíku podstatně snižuje tvorbu tuků z uhlohydrátů. Názorně vyplývá tato skutečnost z následující tabulky.

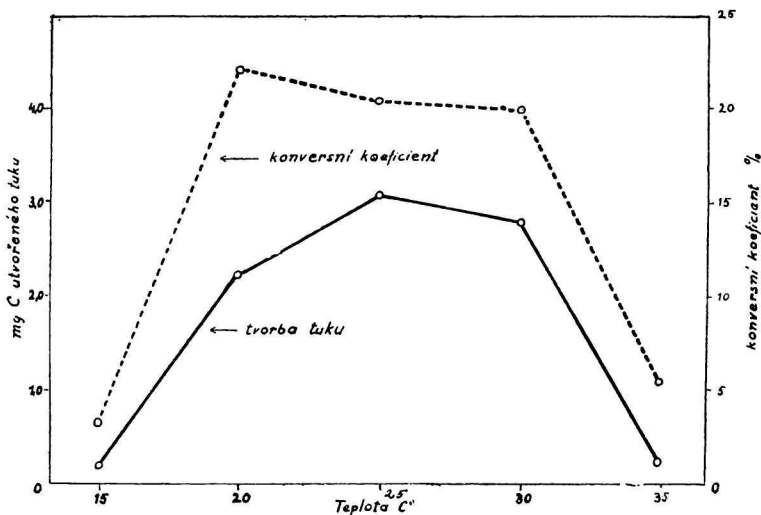
Tab. 2. Vliv NH<sub>4</sub>Cl na tvorbu tuku v *Torulopsis lipofera* [6]

| molární konc. NH <sub>4</sub> Cl | spotř. glukosy mg | utv. mg tuku |
|----------------------------------|-------------------|--------------|
| 0                                | 44,2              | 4,18         |
| 0,025                            | 43,5              | 3,86         |
| 0,05                             | 41,8              | 2,94         |
| 0,20                             | 35,8              | 1,85         |

Tento zjev je nutno si vyložití tak, že v přítomnosti asimilovatelného dusíku (u kvasinek na př. amonné soli, močovina a j.) se tvoří v buňce spíše bílkoviny než lipidy.

Značný vliv na tvorbu tuků má teplota. Je známo z řady prací různých autorů, že tvorba tuků z uhlohydrátů má určité tepelné optimum. Názorně vyplývá tato skutečnost z následujícího vyobrazení.

Podle našich posledních výsledků ovlivňuje teplota v průběhu tvorby tuků nejen rychlost tvorby tuků, nýbrž i složení vytvořených tuků. Jak vyplývá z následující tabulky (tab. 3) u kvasinek kultivovaných při vyšší teplotě, má utvořený tuk nižší jodové číslo i poněkud nižší zmýdelňovací ekvivalent, t. j. vytvořený tuk je nasycenější a průměrná délka řetězů vytvořených mastných kyselin je kratší. Podrobné výsledky těchto pokusů jsou v tisku [1].

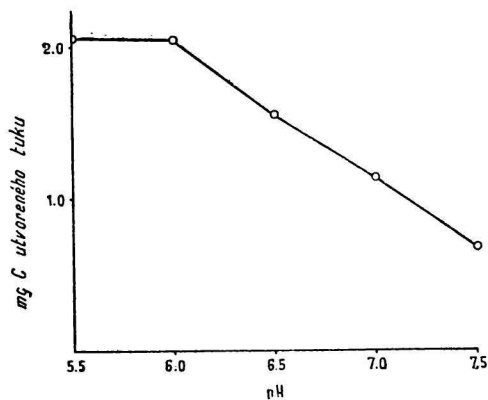


Obr. 1. Vliv teploty na tvorbu tuku [6]  
 Konverzní koeficient je množství utvořeného C mastných kyselin v % spotřebovaného C substrátu

Tab. 3. Vliv teploty na některé konstanty tuku z *Rhodotorula gracilis* [1]

|                           | Vzorek I. zač. | 20°C   | 28°C   |
|---------------------------|----------------|--------|--------|
| Tuk v sušině v %          | 19,25          | 46,49  | 50,10  |
| Zmýd. ekvivalent          | 311,71         | 308,67 | 304,02 |
| Jod. č.                   | 91,10          | 77,19  | 68,66  |
| % bílkovin v kvas. sušině | 24,85          | 15,02  | 13,32  |

Také pH prostředí zřetelně ovlivňuje tvorbu tuků z uhlohydrátů, jak vyplývá z následujícího vyobrazení.



Obr. 2. Vliv pH na tvorbu tuku [6]

Podle našich prací má značný význam pro tvorbu lipidů přítomnost fosfátových iontů [6]. V nepřítomnosti fosfátu v substrátu je tvorba lipidů dosti podstatně snížena. Tato skutečnost má význam pro vysvětlení způsobu, jakým jsou mastné kyseliny syntetisovány z uhlohydrátů.

Některé vitaminy skupiny B ovlivňují tvorbu lipidů. Podle prací O d i n c o v é [14] podporuje aneurin (vitamin B<sub>1</sub>) tvorbu lipidů z uhlohydrátů v *Torulopsis utilis*. V této souvislosti je velmi zajímavá práce M e d v ě d ě v é [12], která ukázala, že kyselina para-amino-benzoová snižuje tvorbu lipidů v *Rhodotorula aurentiaca*, a že aneurin odstraňuje tento brzdicí vliv.

Velmi podrobně byla studována různými autory tvorba tuků z různých substrátů (různých uhlohydrátů a necukrů). Toto studium pomáhá utvořit si obraz o mechanismu syntézy tuků (mastných kyselin). Bylo zjištěno, že mikroorganismy dovedou tvořit tuk nejen z glukosy, nýbrž i řady jiných hexos. Kmeny organismů přizpůsobené xylose dovedou také rychle syntetisovat tuk z této pentosy. (Tab. 4). Tento poznatek má značný význam, neboť rozšiřuje surovinovou základnu pro možnou průmyslovou výrobu tuků pomocí mikroorganismů [8, 13].

Tab. 4. Adaptace kvasinky 72 na xylosu [8]

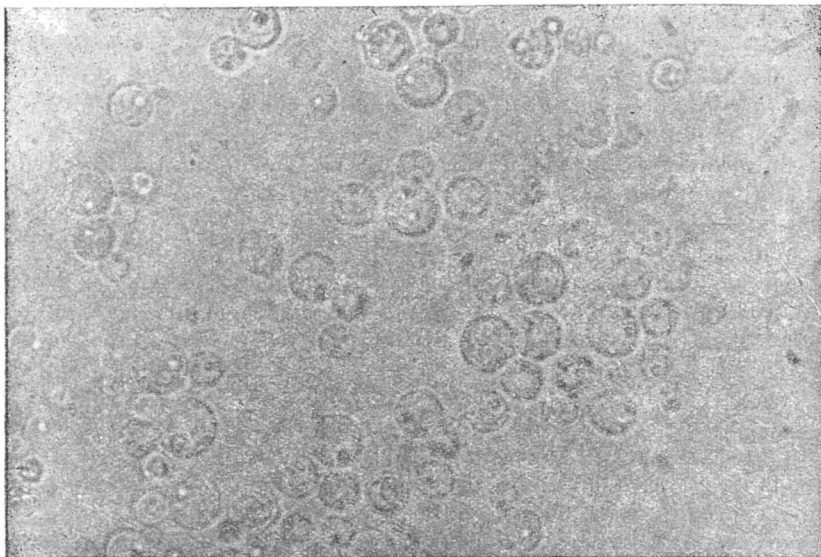
|                 | Kvasinky pěstovány na glukose<br>bez substr. |        |      | Kvasinky pěstované na xylose<br>bez substr. |        |      |
|-----------------|--|--------|------|---|--------|------|
|                 | s u b s t r á t                              |        |      | s u b s t r á t                             |        |      |
|                 | glukosa                                      | xylosa |      | glukosa                                     | xylosa |      |
| QO <sub>2</sub> | 7,4  | 18,3   | 10,1 | 6,4   | 11,4   | 11,5 |
| Dých. kvoc.     | 0,92   | 1,20   | 1,10 | 1,02  | 1,22   | 1,23 |

Trvání pokusu 2 hod. Pokus proveden ve Warburgových manometr. nádobách při 25°C.

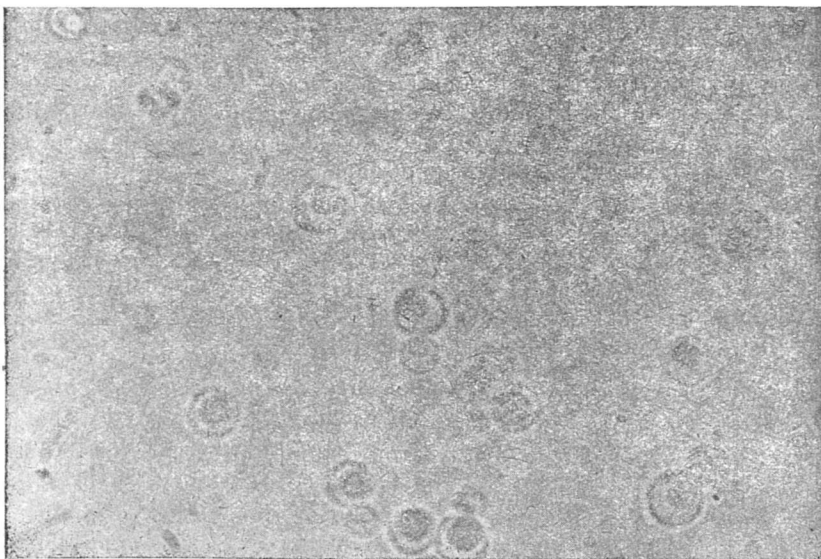
Mikroorganismy dovedou taktéž syntetisovat tuky z látek o 2 nebo 3 uhlících (ethanol, acetaldehyd, kys. octová, kys. pyrohroznová a j.). Jak uvidíme dále, mají tyto výsledky rozhodující význam pro teorii, vysvětlující tvorbu mastných kyselin z uhlohydrátů.

#### *Mikroorganismy vyznačující se značnou tvorbou tuků*

Klasické práce byly provedeny většinou s kvasinkovitým organismem *Endomycopsis vernalis*. Tento organism v povrchových kulturách rychle tvoří tuk z uhlohydrátů. Výtěžek tuků je obvykle vyjadřován t. zv. tukovým koeficientem, t. j. množství tuků v % na spotřebovaný uhlohydrát. Tukový koeficient u tohoto mikroorganismu je poměrně malý (v průmyslových podmínkách se pohyboval kolem 7, t. j. na 100 kg spotřebovaného cukru se vytvořilo 7 kg tuků) [5]. V posledních 10 letech byla věnována značná pozornost jiným tukotvorným mikroorganismům. V Německu během poslední války byl přihlášen patent [3], používající jako tukotvorných organismů kmene plísně *Fusarium*. Tento organismus na rozdíl od *Endomycopsis vernalis* se vyznačuje jak poněkud vyššími tukovými koeficienty, tak schopností tvořit značné



*1. Kvasinky během růstové fáze. Malý obsah tuku.*



*2. Kvasinky na konci pokusu (po ztučňovací fázi). Vysoký obsah tuku.  
Mikrofotografie pořídil Dr. Gabriel.*

množství tuků i v hloubkové kultuře, což má značný význam s hlediska průmyslového využití. Řada dalších autorů se věnovala zejména kvasinkám. Tak *Starky* [16] popsal kmeny kvasinek u nichž jsme pak my našli tukové koeficienty mezi 14—15. *Lundin* a jeho spolupracovníci [4] pak pracovali s kmenem *Rhodotorula gracilis*, který vykazoval tukový koeficient až 18. Vzhledem k rychlému rozmnožování kvasinek v hloubkové kultuře jeví se tedy tukotvorné kvasinky jako dosud nejvýhodnější organismy pro studium tvorby tuků z uhlohydrátů. Následující vyobrazení ukazuje kmen kvasinek č. 72 jednak ve fázi intenzivního růstu (malé množství tuku) jednak ve stadiu vysokého ztučnění.

Obsah tuků v sušině kvasinkových mikroorganismů může dosáhnouti při vhodných podmínkách i 60% a více. V jednom případě jsme dosáhli skoro 70% tuků v sušině a tukové koeficienty blížící se 20.

#### *Theorie tvorby mastných kyselin z uhlohydrátů*

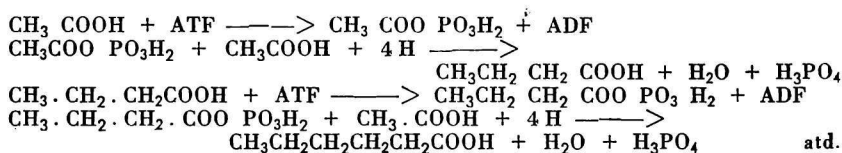
Kterákoliv theorie, vysvětlující vznik mastných kyselin z uhlohydrátů, musí vysvětliti základní charakteristické vlastnosti tuků nacházejících se v přírodě. Podle představ *E. Fischer*a jsou mastné kyseliny syntetisovány tak, že řetězce uhlíku v uhlohydrátech se přímo na sebe napojí, a redukcí hydroxylových skupin, případně oxýdační konečné aldehydické skupiny by pak vznikl řetěz mastné kyseliny. Podle této theorie by tedy vznikla kyselina  $C_{18}$  přímou kondensací 3 molekul hexosy,  $C_{16}$  kys. přímou kondensací 2 molekul pentosy a 1 molekuly hexosy. Tato theorie však neobstála ve světle velkého množství pokusného materiálu, a dnes je všeobecně uznávána theorie vyslovená poprvé ruským fyziologem *Něnkim* 1878. Podle této theorie jsou syntetisovány mastné kyseliny kondensací složek o 2 uhlících. Tato theorie nám tedy vysvětluje skutečnost, že mastné kyseliny v přírodě mají rovný řetěz o sudém počtu uhlíků. Pokusy konané s  $C_2$  sloučeninami označenými isotopy ukázaly, že pravděpodobně touto  $C_2$  sloučeninou je kys. octová. Zůstává však otevřena otázka způsobu kondensace  $C_2$  složek na mastné kyseliny. Běžně byl vyslovován názor, že dochází k typu aldolové kondensace za tvorby nenasyčených aldehydů a nenasyčených kyselin. Proti této koncepci mluví skutečnost [15], že v živém organismu se tvoří podstatně rychleji mastné kyseliny nasycené než nenasyčené. Toto bylo prokázáno také v kvasinkách.

Tab. 5. Změny jodového čísla mastných kyselin v tuku z kvasinek během tvorby tuků [8]

| Torulopsis lipofera |         | Kvasinka 74   |         |
|---------------------|---------|---------------|---------|
| % tuku v suš.       | jod. č. | % tuku v suš. | jod. č. |
| 20,4                | 90,5    | 17,7          | 59,6    |
| 24,1                | 82,3    | 24,6          | 48,2    |
| 25,5                | 80,5    | 32,4          | 49,1    |
|                     |         | 40,5          | 43,1    |

Všem shora uvedeným poznatkům nejlépe vyhovuje theorie vyslovená *Barkere*m r. 1948 [2]. Podle této theorie je kyselina octová

aktivována kyselinou fosforečnou za vzniku acetylfosfátu (nebo látka mu podobná). Tato kondensuje s další molekulou kys. octové za vzniku látky, která redukcí dává kyselinu máselnou. Tato je znovu aktivována kyselinou fosforečnou, slučuje se pak s kyselinou octovou, atd., čímž se neustále prodlužuje řetěz uhlíku. Protože je nyní známo, že pro tyto kondenzační reakce je nezbytný t. zv. koenzym A, t. j. látka obsahující kyselinu pantothenovou (jeden z vitaminů skupiny B), je takto vysvětlen i význam tohoto vitaminu pro syntézu mastných kyselin. Konečně jako zdroj kyseliny fosforečné slouží kyselina adenosintrifosforečná (ATF) za tvorby kys. adenosindifosforečné (ADF). Celé schema Barkerovo lze vyjádřit takto:



### Tvorba některých jiných složek mikrobiálních lipidů

Lipidy mikroorganismů obsahují vedle triglyceridů mastných kyselin také některé jiné složky, na př. fosfolipidy, steroly, karotenoidy a j. Zmíníme se o nejnovějších poznatcích týkajících se biosyntézy sterolů a karotenoidů.

Nejdůležitějším steroidem v mikroorganismech je ergosterol. Podle našich výsledků [9] je obsah tohoto sterolu (provitaminu D) v některých kvasinkách tento:

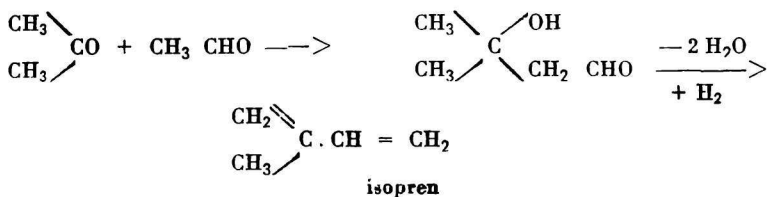
Tab. 6. Obsah ergosterolu v různých kvasinkách.  
Ergosterol stanoven methodou P e s e z o v o u [15]

| Druh kvasinek        | substrát        | ergosterol mg/g sušiny |
|----------------------|-----------------|------------------------|
| Rhodotorula gracilis | melasa          | 4,41                   |
| Rhodotorula gracilis | synth. substrát | 4,61 — 5,12            |
| Saccharomyces cerev. | melasa          | 5,19 — 5,31            |
| Torulopsis utilis    | melasa          | 2,83                   |

Jak vyplývá z této tabulky, je obsah ergosterolu závislý nejen na druhu kvasinky, nýbrž i na druhu substrátu, na kterém byl organismus pěstován. Z prací školy S c h ö n h e i m e r o v y je známo, že ergosterol je syntetisován v živé buňce kondensací kyseliny octové.

Některé druhy kvasinek se vyznačují vedle vysoké schopnosti tvořit tuk také význačnou schopností syntetisovat karotenoidy. Tak na př. obsahují kvasinky vybraných kmenů Rhodotorula nebo Sporobolomyces až 360.000 m. j. karotenů  $\alpha$  i  $\beta$  (vyjádřeno v mezinár. jednotkách vitaminu A) [18]. Pokud jde o způsob syntézy těchto karotenoidů, vysvětluje jej nejlépe theorie K u z i n a a N ě v r a j e v é [10], předpo-

kládající aldolickou kondensaci acetonu s acetaldehydem za vzniku základní strukturní složky karotenoidů, isoprenu:



### *Ekonomika tvorby tuků z uhlohydrátů*

Biologická syntéza tuků pomocí mikroorganismů může naléztí použití v průmyslu jen tehdy, budou-li splněny následující podmínky:

1. rychlý růst mikroorganismů
2. vysoký výtěžek mikroorganismu na spotřebovaný cukr (vysoký ekonomický koeficient)
3. vysoký obsah tuků v sušině
4. levná cukernatá surovina
5. levná metoda na získání tuků z mikroorganismů.

Body 2 a 3 lze vyjádřiti jediným bodem: vysoký tukový koeficient.

Jak již bylo uvedeno shora, vyznačují se mikroorganismy, studované v posledních 10 letech, vysokými tukovými koeficienty. Taktéž prvý požadavek lze celkem považovati za splněný, protože během růstové fáze je generační doba řady tukotvorných kvasinek nižší než 4 hodiny, t. j. neliší se podstatně od generační doby kulturních kvasinek droždářských. Pokud jde o vhodné suroviny: lze vyloučit melasu pro její poměrně vysoký obsah asimilovatelného dusíku, který, jak bylo uvedeno na str. 316 podstatně snižuje tvorbu tuků ve prospěch bílkovin. Lze však uvažovati o melase zbavené vhodnou úpravou podstatné části asimilovatelného dusíku. Vedle melasy bylo uvažováno na př. švédskými autory [11] o použití hydrolyrátů dřeva jako vhodné a poměrně levné suroviny. Pokud jde o poslední požadavek, t. j. levnou metodu získání tuků z mikroorganismů, lze použití některého ze způsobu vypracovaných pro průmyslovou výrobu tuků z *Endomycopsis vernalis*, t. j. zejména kyselou hydrolysu kvasinek a extrakci uvolněného tuku některým z běžných tukových rozpouštědel.

Vzniklý mikrobielní tuk, zejména tuk z tukotvorných kvasinek byl podroben zevrubné analýse. Jak vyplývá z *tab. 8*, jde o tuk celkem velmi podobný některým tukům rostlinným (nejspíše palmovému oleji). Při tom nutno poznamenat, že složení tuků u téhož organismu není stálé, nýbrž, jak ukázaly naše práce, podstatně se mění podle podmínek kultivace (stupně ztučnění, teploty, atd.).



Tab. Složení směsi mastných kyselin tuků z kvasinek rodu *Rhodotorula* o obsahu 25,2% a 38,8% tuku v sušině v % mol. [7]

| Mastná kyselina             | tuk č. 1            | tuk č. 2            |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|
|                             | (25,2% tuku v suš.) | (38,8% tuku v suš.) |
| laurová                     | 1,7                 | 0,1                 |
| myristová                   | 1,4                 | 2,7                 |
| palmitová                   | 19,8                | 29,0                |
| stearová                    | 10,2                | 14,0                |
| arachová                    | 0,7                 | 1,2                 |
| hexadecenová                | 3,7                 | 5,3                 |
| olejová                     | 43,9                | 41,8                |
| linolová                    | 6,9                 | 3,2                 |
| linolenová                  | 5,0                 | 1,4                 |
| C <sub>20-22</sub> nenasyc. | 6,8                 | 1,3                 |

Uvedený přehled tohoto úseku kvasné chemie umožňuje utvořit si obraz o složitosti dějů probíhajících v průběhu tvorby tuků mikroorganismech. Současně však úspěchy na tomto poli dosažené, zejména v posledních letech, dávají předpoklady k tomu, aby výroba tuků kvasnou cestou se značně přiblížila hospodářským požadavkům.

#### LITERATURA

1. Bass A., Hospodka J., Chem. listy 46, 243, (1952).
2. Bornstein B. T., Barker H. A., Stadtman E. R., J. biol. chem. 174, 1039 (1948).
3. Damm H., Chem. Ztg. 67, 47 (1943).
4. Enebo L., Anderson L. G., Lundin H., Arch. Biochem. 11, 383 (1946).
5. Fink H., Haehn H., Hoerburger W., Chem. Ztg. 61, 689, 723, 744 (1937).
6. Kleinzeller A., Biochem. J. 38, 480 (1944).
7. Kleinzeller A., Bass A., Chimija 1, 56 (1951).
8. Kleinzeller A., Vihan R., Bass A., viz Kleinzeller, Adv. Enzymol. 8, 299 (1948).
9. Kleinzeller A., Škoda J., Štros F., Státnicová práce Štrose F. na ČVUT, 1951.
10. Kuzin A. M., Něvrajeva N. A., Biochimija 4, 142 (1939).
11. Lundin H., Mitteilungen d. Versuchsanstalt f. d. Gärungsgew. 1950, 5.
12. Medvěděva G. A., Mikrobiologija 20, 305 (1951).
13. Nielsen N., Nilsson N. G., Arch. Biochem. 25, 316 (1950).
14. Odincova J. N., Mikrobiologija 9, 253 (1940).
15. Pesez M., Hebrain M., Bull. soc. chim. Fr., 1949, 760.
16. Rittenberg D., Schönheimer R. J., Biol. chem. 121, 235 (1937).
17. Starkey R. L. J., Bact. 51, 33 (1946).
18. Škoda J., nepublikováno; některé výsledky v tisku v Chem. listech.  
Souborné referáty:  
Bernhauer K., Erg. d. Enzymforschung 9, 298 (1943).  
Kleinzeller A., Adv. Enzymol. 8, 299 (1948).  
Raveux R., Ann. Nut. Alim. 2, 39 (1948).