

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 577.121

К.В. АЛЕКСЕЕВ^{1,*}, М.В. ДУБИНА², В.П. КОМОВ¹

¹Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, 197376

²Санкт-Петербургский академический университет, Санкт-Петербург, 194021

e-mail: hermelynn@mail.ru

Молекулярно-генетические и биохимические характеристики цитратсинтазы из грибов — продуцентов лимонной кислоты вида *Aspergillus niger*

Обзор посвящен достижениям в области изучения цитратсинтазы — фермента, играющего ключевую роль в метаболизме клетки и катализирующего процесс синтеза лимонной кислоты на первом этапе цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Основным продуцентом лимонной кислоты в промышленности является гриб *Aspergillus niger*; основные молекулярно-генетические и биохимические характеристики фермента этого гриба приведены в сравнении с таковыми других эукариот. Проанализирована информация о механизме сверхсинтеза лимонной кислоты грибом-продуцентом и его эволюционных особенностях. Обзор может быть полезен при разработке стратегии создания более эффективных продуцентов органических кислот.

Ключевые слова: биосинтез лимонной кислоты, цитратсинтаза, *Aspergillus niger*.

Производство лимонной кислоты является одним из старейших и наиболее хорошо изученных биотехнологических процессов [1]. Представители р. *Aspergillus*, в частности, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. terreus*, являются наиболее важными для коммерческого использования, так как они способны в больших количествах продуцировать широкий спектр низкомолекулярных органических кислот, в том числе лимонную кислоту [1–3]. Метаболические пути, ведущие к образованию и накоплению лимонной кислоты хорошо известны, как и закономерности ферментации с участием продуцентов, что в итоге обуславливает высо-

кий выход целевого продукта. Однако механизм сверхсинтеза цитрата, который имеет место в клетках продуцентов — грибов р. *Aspergillus*, а также многие физиологические и биохимические процессы, лежащие в основе эмпирически подобранных условий ферментации, до конца неясны [3, 4].

Множество работ, связанных с увеличением производительности имеющихся штаммов продуцентов, посвящено изучению и манипуляциям с различными ферментами: цикла трикарбоновых кислот [5], гликолиза [6–8], пентозомонофосфатного пути, глиоксилатного шунта и пр., но только небольшое число этих исследований

Алексеев Камиль Владимирович, Дубина Михаил Владимирович, Комов Вадим Петрович.

Список сокращений: МФК — мультиферментные комплексы; ПААГ — полиакриламидный гель; п.н. — пар нуклеотидов; ЦС — цитратсинтаза; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот; AMP, ADP, ATP — аденозинмонофосфат, -дифосфат, -трифосфат, соответственно; NAD, NADP, NAD⁺, NADH, NADPH — никотинамидадениндинуклеотид и его фосфорилированная форма, восстановленная форма, окисленная форма, фосфорилированная восстановленная форма, соответственно; ORF (open reading frame) — открытая рамка считывания; SDS — додецилсульфат натрия.

* Автор для переписки.

затрагивают ключевой фермент синтеза лимонной кислоты — цитратсинтазу [9—11]. В настоящем обзоре мы преследовали цель осветить современное состояние в изучении этого ключевого для синтеза лимонной кислоты микробного фермента.

ЦИТРАТСИНТАЗА. РОЛЬ В КЛЕТОЧНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ ГРИБА *A. niger*

Цитратсинтаза (К.Ф. 2.3.3.1) — ключевой фермент цикла трикарбоновых кислот, катализирующий стереоспецифический синтез лимонной кислоты из ацетил-коэнзима А и оксалоацетата [12, 13]. Цитратсинтаза (ЦС) была впервые обнаружена в клетках *E. coli* в 1965 г. [14]. В эукариотических клетках синтез цитрата происходит в митохондриях как первый шаг цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), причем у эукариот включая дрожжевые грибы *Saccharomyces cerevisiae* [15, 16] и за исключением некоторых растений ЦС находится только в этих органеллах [17, 18]. В мицелии гриба *A. niger* при его культивировании на сахарозе или глюкозе цитратсинтаза локализована в матриксе митохондрий [19, 20]. ЦС является количественным маркером интактности митохондрий [21], а также белковым маркером митохондриального матрикса [22]. Однако имеются свидетельства о том, что в клетках эукариот цитратсинтаза может быть слабо прикреплена к внутренней мембране митохондрий, как это было показано для других ферментов ЦТК [23].

Биохимический путь, ведущий к избыточному накоплению лимонной кислоты, был открыт в ходе радиоизотопных исследований, проведенных в 1950-х годах рядом исследователей [24—27]. Центральная реакция в синтезе низкомолекулярных органических кислот — это фиксация CO_2 молекулой пирувата с образованием оксалоацетата [2]. Высокий выход органических кислот возможен лишь потому, что все шесть атомов углерода субстрата (глюкозы или фруктозы) под действием двух ферментов пируваткарбоксилазы и цитратсинтазы сохраняются в шестиуглеродном продукте, лимонной кислоте [28].

Биосинтез цитрата из глюкозы включает большое число ферментативных реакций, происходящих в двух разных клеточных компартментах — в цитозоле и митохондриях. Цитратсинтаза помимо своей прямой синтетической функции осуществляет регуляцию ЦТК [12], играет важную роль в β -окислении жирных кислот, а также участвует в фотореспираторном гликолятом пути у растений [29].

Цитрат имеет огромное физиологическое значение для клеток гриба *A. niger*, являясь интермедиатом в реакциях синтеза аминокислот и жирных кислот, энергетическим субстратом, переносчиком ацильной группы, а также играя регуляторную роль за счет хелатных взаимодействий с некоторыми субстратами и кофакторами, например, с ионами Mg^{2+} и других бивалентных металлов, необходимых для активности некоторых ферментов [4]. Цитрат и другие низкомолекулярные органические кислоты, продуцируемые грибами, обладают способностью к хелатному связыванию и других металлов, что имеет, например, большое значение для растворения и поглощения минерального фосфора посредством комплексообразования с Ca^{2+} [30]. Помимо физиологического, цитрат имеет большое биологическое значение, определяя способность гриба к выживанию, выделяясь во внешнюю среду и снижая ее pH, тем самым ослабляя конкуренцию за питательные ресурсы со стороны других микроорганизмов и ингибируя их рост в природных условиях. Широко известно, что цитрат также играет существенную роль в разложении древесины и природном распаде лигнина [2]. Такова биологическая и эволюционная подоплека природной способности гриба *A. niger* к синтезу цитрата в количествах, превышающих необходимый для клеточного метаболизма уровень.

Как предполагалось ранее, основная реакция, в которую вовлечена цитратсинтаза, является “бутылочным горлышком” во всем ЦТК [12]. Однако было показано [6, 11], что сверхэкспрессия генов цитратсинтазы, а также фосфофрукто- и пируваткиназы не влечет за собой увеличение синтеза лимонной кислоты, т.е. активность ЦС не является единственным ограничивающим фактором в процессе синтеза цитрата. Одно из объяснений этого феномена заключается в том, что активность ЦС в неочищенном экстракте гриба настолько высока, что уже сама по себе обеспечивает сверхсинтез лимонной кислоты [31]. Отсюда можно сделать вывод, что изменение в определенных пределах активности цитратсинтазы, которое наблюдается в ходе ферментации, может не оказывать влияние на продуктивность культуры микроорганизма по цитрату [4]. Другое объяснение основывается на избыточности генома *A. niger*, который содержит гены, предположительно кодирующие одну цитозольную и три митохондриальные цитратсинтазы [32]. При такой избыточности попытка повысить продукцию цитрата путем дополнительной сверхэкспрессии цитратсинтазы, предпринятая Руйтером и др. [11], вряд ли могла окончиться успехом.

К настоящему времени установлено, что метаболический контроль над мультиферментными системами, причастными к образованию цитрата, распределен между несколькими этапами, и таким образом не существует одной конкретной “ключевой контрольной точки” или “узкого места”, влияя на которое можно значительно увеличить биосинтез цитрата в грибной клетке [33].

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТРАТСИНТАЗЫ

Цитратсинтазы эукариот — гомодимеры, близкие между собой как по вторичной, так и по третичной структуре, но при этом коренным образом отличающиеся от цитратсинтаз прокариот, которые являются гетеромерами и имеют от 4 до 6 субъединиц в своем составе [34].

В клетках эукариот митохондриальная ЦС кодируется ядерными генами; в цитоплазме транслируется ее более длинный предшественник, который далее транспортируется в митохондрии, где осуществляется постсинтетический процессинг фермента [35, 36]. В настоящее время клонированы и секвенированы гены, кодирующие цитратсинтазу у большого числа прокариот, различных видов грибов, в том числе *A. niger* [10], а также клеток животных и растений [29].

По данным исследований [10], цитратсинтаза, полученная с использованием нуклеотидной последовательности гена *cit1* длиной в 1425 п.н., состоит из 475 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 52153 Да. Путем компьютерной обработки аминокислотной последовательности было установлено, что масса зрелого белка составляет приблизительно 49 кДа [10]. Анализ молекулярной массы цитратсинтаз других эукариот на основе их аминокислотной последовательности дал сходные результаты.

Установлена структура гена, кодирующего цитратсинтазу в клетках *A. niger*. Ген разделен шестью небольшими интронами [10, 11], 4 из которых находятся вблизи 5'-концевой области [10]. Каждый из 6 интронов начинается с GT- и оканчивается AG-консенсусными последовательностями в соответствии с консенсусными сигналами сплайсинга, характерными для мицелиальных грибов [10, 37]. Также в ходе анализа нуклеотидной последовательности гена, кодирующего ЦС, было выявлено наличие одной открытой рамки считывания (ORF). В целом содержание GC составило около 53% [10].

В гене *cit1* также был обнаружен СТ-богатый регион, который предположительно играет

роль промоторного участка у мицелиальных грибов, не имеющих классических промоторных боксов ТАТА, АТА, СААТ [10, 37]. Анализ СТ-богатых областей показал, что они являются характерными для грибных промоторов [37], а три консервативные области, выявленные у некоторых представителей р. *Aspergillus* при сопоставлении последовательностей генов [38] и локализованные до рамки считывания гена *citA A. niger*, предположительно являются основной *cis*-регуляторной особенностью последовательности белка P*citA* [39]. Как показали дальнейшие исследования, промотор *A. niger* обладает высокой конститутивной экспрессивностью и потенциально может быть использован для гетерологичной экспрессии [39].

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИТРАТСИНТАЗ *A. niger*

Несмотря на высокую гомологию аминокислотные последовательности цитратсинтаз грибов *A. niger* WU-2223L и N400 (CBS 120.49) характеризуются некоторыми различиями, наибольшие из которых были выявлены в С-концевой области [11]. При анализе первичной структуры ЦС из штамма WU-2223L на наличие характерного для всех митохондриальных цитратсинтаз сигнального мотива было показано, что такая область присутствует в N-концевой области [10]. Этот участок пептидной цепи лишен кислотных радикальных остатков и в то же время обогащен основными остатками, что придает ему способность формировать амфифильные (гидрофильно-гидрофобные) спирали [10]. Геномный анализ *A. niger* WU-2223L показал, что в хромосомной ДНК содержится только одна копия гена цитратсинтазы *cit1* [10]. Однако авторы работы [32], проанализировав геном гриба *A. niger* CBS 513.88, промышленного продуцента энзимов и органических кислот, обнаружили одну цитозольную и три предположительно митохондриальных последовательности цитратсинтазы. В то же время, другая исследовательская группа показала, что штаммы *A. niger* обладают 5 изоферментами ЦС, включая активную метилцитратсинтазу [40], *A. oryzae* имеет четыре изоэнзима, а *A. fumigatus* и *A. nidulans* только три [9, 41]. Интересен также тот факт, что *A. niger* ATCC 1015 (штамм дикого типа) с более чем 90-летней историей, использованный в первом запатентованном процессе ферментации цитрата, имеет дополнительный уникальный ген для ЦС, который не обнаруживается ни у одного другого штамма. Последовательность этого белка идентична структуре ЦС I *Delftia acidovorans* SPH-1 (β -протеобактерия). Од-

нако, по нашему мнению, присутствие этой бактериальной цитратсинтазы требует дополнительно подтверждения [42].

Филогенетический анализ ЦС различных представителей р. *Aspergillus* выявил множественность генов, кодирующих цитратсинтазу. При дальнейшем изучении обнаружено сходство генов ЦС из аспергиллов с генами ЦС из протеобактерий и некоторых растений [32, 42]. Ряд исследователей пришли к выводу, что обнаруженная избыточность генов цитратсинтазы в геноме *A. niger* является продуктом ранней дупликации гена цитратсинтазы у предков, которая была затем утрачена всеми организмами, кроме некоторых грибов и растений, или межвидовым переносом генов [32, 41]. Различные дупликации генов могут быть очень важны для высокоэффективной продукции цитрата грибом *A. niger* [32]. Генная избыточность была обнаружена у аконитазы [32] и альтернативной митохондриальной оксидазы, что может обуславливать высокую производительность цитрата изученными видами [42]. Как показал геномный анализ, дупликация генов и их избыточность являются основными стратегиями эволюции у аспергиллов [42]. В свете обнаружения у них митохондриальной цитратлиазы (КФ 4.1.3.6) было высказано предположение о существовании в митохондриях цикла синтеза-распада цитрата [32], значение которого до сих пор не изучено [41].

БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦИТРАТСИНТАЗЫ

Как показали многие исследования, цитратсинтазы эукариот схожи между собой как в генетическом (промоторные и консервативные области), так и в биохимическом аспектах [10, 43]. Однако кинетические параметры ЦС все же испытывают некоторые колебания в зависимости от таксономической принадлежности организма, хотя их можно отнести и за счет различного методического и технологического оформления эксперимента.

Считается, что у животных ЦС наряду с изоцитратдегидрогеназой (NAD- и/или NADP-зависимой) и оксоглутаратдегидрогеназным комплексом являются объектом регуляторного контроля и определяют метаболический поток субстратов через ЦТК [44]. Активность ЦС напрямую регулируется доступностью оксалоацетат и/или ацетил-КоА [45]. Для *A. niger* специфическая активность ЦС сильно зависит от того, в какой фазе — роста или продукции цитрата — ее определяют; в последнем случае активность цитратсинтазы возрастает вдвое [19, 46].

Порядок присоединения субстратов к ЦС оказывает на скорость реакции образования цитрата наиболее сильное воздействие [43]. Оксалоацетат, первым связываясь с активным центром цитратсинтазы, повышает константу связывания ацетил-КоА примерно в 20 раз. Но если с ферментом сначала связывается ацетил-КоА, активность образования комплекса ЦС с оксалоацетатом существенно снижается [13]. Оксалоацетат напрямую регулирует активность цитратсинтазы *in vivo* [44, 47], однако только кетоформа этого соединения является истинным субстратом для ЦС, а енольная форма может быть ответственна за ингибирование сукцинатдегидрогеназы [48]. Тот факт, что обе формы оксалоацетата поддерживаются в таутомерном равновесии, имеет серьезные последствия для клеточного метаболизма грибов, которые, однако, не всегда признаются. При измерении концентрации оксалоацетата следует также учитывать, что большая часть его связана с белками, т.е. цитратсинтаза функционирует в условиях, далеких от максимальной скорости катализа [45].

Выход целевого продукта при ферментации с образованием лимонной кислоты повышается при добавлении в питательную среду гриба *A. niger* небольших количеств низших алифатических спиртов [49, 50]. Оказалось, что метанол и этанол изменяют активность ключевых ферментов ЦТК — цитратсинтазы и аконитазы [50]. Этанол вдвое увеличивает активность ЦС и на 75% снижает активность аконитазы, при этом повышается активность других ферментов ЦТК, что ведет к увеличению синтеза цитрата и уменьшению его распада [51]. Низшие спирты используются в промышленных процессах ферментации цитрата, в частности, как активаторы его синтеза.

Коэнзим А конкурентно с ацетил-КоА ингибирует цитратсинтазу *A. niger* (константа ингибирования равна 0,1—0,15 мМ) [11, 43], что объясняется его структурным сходством с субстратом ЦС (ацетил-КоА). Ингибирующим действием обладают также структурные аналоги ацетил-КоА (карбоксиметил-КоА и др.) [52].

Механизм ингибирования эукариотических цитратсинтаз пальмитоил-КоА и другими производными длинноцепочечных жирных кислот [53] долгое время был предметом дискуссий [45, 54], пока не было доказано, что жирные ацил-КоА все-таки связываются с активным центром фермента. Можно предположить, что через этот феномен осуществляется физиологическая функция регуляции активности цитратсинтазы, а в более широком смысле — и всего липидного обмена [54]. Сто-

ит также отметить, что, как было сказано выше, ингибирование цитратсинтазы аналогами ацетил-КоА конкурентно по отношению к ацетил-КоА, но не к оксалоацетату [52].

Ранее сообщалось, что ADP умеренно ингибирует ЦС *A. niger* (на 25% при 2 мМ концентрации); ATP и GTP сильно снижают активность фермента (при 2 мМ концентрации — на 70—80%), конкурируя за активный центр с ацетил-КоА; комплекс Mg-ATP ингибирует ЦС в меньшей степени (при 2 мМ концентрации — на 40%) [11]. Однако данные результаты получены только в условиях *in vitro*. При той же концентрации метаболитов *in vivo* ингибирование реакции было либо незначительным, либо его не было вовсе [55]. Авторы [56] показали, что фермент *A. niger* проявляет в три раза более высокую активность в неочищенном экстракте, чем в пермеабелизованных клетках. Это различие в активности цитратсинтазы в условиях *in vitro* и *in situ* авторы объяснили разным кинетическим поведением растворенного фермента и фермента в пермеабелизованных клетках. Это предположение нашло подтверждение при измерении кинетических параметров цитратсинтазы *A. niger* в бесклеточном экстракте [56].

Следует отметить, что L-малат, фумарат, α -кетоглутарат, сукцинат, пируват, глутамат (при концентрации 10 мМ), а также AMP, NADH, NADPH, NAD⁺ и NADP⁺ (при концентрации 2 мМ) оказывают незначительное воздействие на активность цитратсинтазы *A. niger*. Показано [11], что цитрат в концентрации 10 мМ, (что в 3—5 раз выше физиологической концентрации в клетках) не только не ингибировал фермент, но напротив, повышал активность ЦС на 30—40%. Также было обнаружено, что внутримитохондриальные концентрации оксалоацетата и цитрата находятся в пределах, соответствующих регуляторному диапазону K_m для этих соединений [45]. Эти факты указывают на то, что либо вклад ЦС в регуляцию цикла Кребса не столь велик, как считалось прежде, либо недостаточно хорошо известно устройство регуляторной системы биосинтеза лимонной кислоты. Тем не менее, при оценке роли концентраций внутриклеточных метаболитов в регуляции активности ферментов стоит помнить о двух ограничениях: а) в данном случае классическая кинетика Михаэлиса—Ментен не применима из-за высоких внутриклеточных концентраций ферментов в сравнении с концентрациями метаболитов [57]; б) концентрации метаболитов, ионная сила и pH могут кардинально отличаться в различных сайтах клетки даже внутри одной органеллы.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТРАТСИНТАЗЫ. МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Цитратсинтазы эукариот имеют компактное глобулярное строение [13, 45]. По данным денатурирующего SDS-ПААГ-электрофореза, масса денатурированной ЦС из гриба *A. niger* составляет около 48 кДа [11], а масса нативного фермента примерно 80 кДа [43]. Эти данные указывают на то, что фермент *in vivo* представляет собой димер, что хорошо согласуется с данными о гомодимерной структуре других эукариотических цитратсинтаз [10, 11].

Примечательно, что при высокой степени сходства как первичной, так и третичной структуры ферментов эукариот и некоторых прокариот иммунологические исследования не обнаружили перекрестной реактивности между ними [58, 59]. Тем не менее, значительное структурное сходство ЦС наблюдают даже у эволюционно далеких видов, что проявляется в высокой консервативности N-концевых аминокислотных последовательностей, сопоставимости аминокислотных составов, а также сходстве физико-химических свойств [59].

Все аминокислотные остатки белка цитратсинтазы организованы в две главные субъединицы гомодимера, состоящие из 20 α -спиралей. Эти α -спирали составляют около 40—60% всей вторичной структуры цитратсинтазы, остальные аминокислотные остатки формируют иррегулярные образования (за исключением небольшого участка β -слоя, который локализован на поверхности белка) [13]. Каждая из субъединиц ЦС состоит из малого и большого доменов; кристаллические формы субъединиц отличаются друг от друга относительным расположением этих двух доменов. Контакт между двумя субъединицами осуществляется посредством области, состоящей в основном из гидрофобных аминокислотных остатков; в образующейся щели заключен активный центр фермента, в котором расположены сайты связывания оксалоацетата/цитрата и коэнзима А, причем каждый сайт функционирует независимо от другого и кооперативный эффект обнаружен не был [13].

Были получены две кристаллические формы фермента, сингонии которых связаны с конформацией молекулы энзима: тетрагональная — открытая форма и моноклиная, соответствующая двум закрытым формам. Фермент начинает работу в открытой конформации; затем при связывании с оксалоацетатом малый домен претерпевает вращение на 18°, закрывая оксалоацетат-связывающий сайт [52], что ведет к образованию закрытой конформации гомодимера [60]. Данное кон-

формационное изменение не только предотвращает контакт растворителя со связанным субстратом, но и открывает ацетил-КоА-связывающий сайт. Далее фермент смыкается вокруг связанных в активных центрах субстратов и осуществляет реакцию конденсации оксалоацетата и ацетил-КоА [13, 61].

В настоящее время ясно, что клетки невозможно представить себе как “мешки”, заполненные растворами ферментов. Эффективное функционирование клетки обусловлено определенным расположением различных ферментов в ее структурных частях, компартментах. Вызывает интерес вопрос о расположении ЦС внутри самой митохондрии: прикреплена ли она к внутренней мембране или же свободно перемещается в матриксе. Для дрожжевой митохондриальной цитратсинтазы CS1 и цитратсинтазы из свиного сердца характерно высокое сродство к внутренней мембране митохондрий [62], в то время как пероксисомальная изоформа CS2 не связана с внутренней мембраной митохондрий и, по мнению ряда авторов, является растворимым ферментом [63]. В 1968 г. показано [64], что концентрация белков в митохондриальном матриксе достигает величины около 560 мг/мл; такая концентрация обуславливает повышенную вязкость матрикса, в котором свободное перемещение белков практически невозможно. Можно предположить, что метаболические пути осуществляются за счет физических контактов между ферментами, ответственными за последовательные реакции. Вероятно, ферменты ЦТК расположены вблизи внутренней мембраны митохондрии, а сукцинатдегидрогеназа вообще погружена в нее [65]. Позднее было показано специфическое взаимодействие ЦС с другими митохондриальными ферментами ЦТК: малатдегидрогеназой и фумаразой [66], а также аконитазой [67]. Было установлено, что это взаимодействие объясняется электростатическими силами. Однако взаимодействия между ЦС и цитозольной малатдегидрогеназой не наблюдалось [68]. Все указанные митохондриальные ферменты связаны с внутренней поверхностью внутренней мембраны митохондрии, в то время как очищенные изоферменты из других клеточных компартментов не обладают способностью к такому связыванию [67]. Наблюдались также взаимодействия (пространственные или межмолекулярные) между шестью из восьми ферментов цикла Кребса [68]. Более того, на основании экспериментов с иммобилизованными ферментами была выдвинута гипотеза о существовании одного большого комплекса, объединяющего ЦТК и аспартат-малатный челнок [66]. Возможное преимуще-

ство такого комплекса — это предотвращение выхода интермедиатов в раствор, где они могут быть разрушены другими ферментами или направлены по другим метаболическим путям. Существование такого метаболического канала для оксалоацетата было показано с участием цитратсинтазы и малатдегидрогеназы млекопитающих [69] и дрожжей [70]. Позднее было установлено, что наличие этого канала передачи объясняется электростатической природой поверхности между двумя активными сайтами этих двух ферментов [68, 71] и что электростатическое воздействие увеличивает эффективность переноса субстрата по этому каналу [72]. Также представляется возможным существование комплекса аконитаза—цитратсинтаза—малатдегидрогеназа. Согласно модельной системе иммобилизованных химерных белков (ферментов ЦТК) свиньи, реальна возможность существования такого же канала между цитратсинтазой и аконитазой, как и между малатдегидрогеназой и цитратсинтазой [73].

Вероятность существования в митохондриях МФК описанного выше типа особенно велика у гриба *A. niger*. Регуляция таких комплексов может осуществляться несколькими путями: изменением локальной концентрации метаболитов и/или эффекторных молекул, активацией/инактивацией ферментов посредством их ассоциации/диссоциации или же комбинацией этих воздействий.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИТРАТСИНТАЗЫ

Общая для эукариот схема действия ЦС была изучена достаточно давно. Пространственная структура и механизм действия ЦС были подробно представлены на примере животных цитратсинтаз в обзоре [13].

Следует отметить, что ферментативная реакция конденсации ацетил-КоА и оксалоацетата, катализируемая ЦС, может быть разделена на два последовательных этапа, енолазно-лиазный и гидролазный. Было показано, что оба они осуществляются независимо друг от друга, хотя локализованы в одном и том же активном центре [52, 74].

Активный центр животной ЦС содержит два сайта: цитрат/оксалоацетат-связывающий сайт, имеющий 6 ключевых аминокислотных остатка (His174, His238, His320, Arg329, Arg402 и Arg421), участвующих в связывании цитрата, а также коэнзим А-связывающий сайт, который имеет петлю (основания 314—320, ключевые из которых Asp375, His320, His274), ответственную за распознавание адениловой части коэнзима А и его связывание [13, 60]. ЦС — один из небольшого

числа ферментов, способных образовывать С—С-связь в отсутствие металла как кофактора.

Реакция протекает по механизму очередности: первым к энзиму присоединяется оксалоацетат, а затем ацетил-КоА [55]. На первом этапе Asp375 ведет себя как основание и забирает протон у метильной группы ацетил-КоА, в результате чего последний превращается в енол, который стабилизируется His274, образующим водородную связь с кислородом енола. На втором этапе реакции конденсации енол ацетил-КоА нуклеофильно атакует карбонильный углерод оксалоацетата, а His320, ведущий себя как кислота, становится донором протона для карбонильной группы оксалоацетата, образуя цитрил-КоА посредством ковалентного связывания ацетил-КоА с оксалоацетатом. При этом цитрил-КоА остается связанным с ферментом. И наконец, цитрил-КоА гидролизуется до цитрата и КоА молекулой воды, депротонированной His320; при этом кислород такой воды атакует цитрил-КоА. Высвобождение КоА и цитрата сопровождается восстановлением открытой конформации фермента.

Итак, несмотря на многолетнюю историю производства лимонной кислоты посредством ферментации, *A. niger* и многие его ферменты до сих пор остаются объектами исследования. Биохимические и молекулярно-генетические характеристики, а также физиологическая роль цитратсинтазы в клетках как растений, так и грибов и по сей день до конца не раскрыты, а, казалось бы, досконально изученный метаболизм гриба *A. niger* изобилует “белыми пятнами”. Например, неясно, имеются ли в клетках гриба-продуцента *A. niger* каталитически активные изоформы цитратсинтаз (цитозольная, пероксисомная), гены которых были обнаружены при исследовании геномов грибов. Если такие формы имеются, то предстоит выяснить, каковы их роль и происхождение, а также какова роль митохондриальной (или других изоформ) ЦС в феномене сверхсинтеза лимонной кислоты у *A. niger* и некоторых других грибов. До сих пор не вполне понятно, как реально осуществляется регуляция ЦС в клетках гриба, а также как регулируется транскрипция, трансляция ЦС и ее транспорт в митохондрии. Предстоит *подтвердить* существование взаимодействия между ЦС и транспортом цитрата в мембранах митохондрий грибов р. *Aspergillus*; возможно, все ферменты ЦТК существуют в виде единого МФК, и в таком случае неясно, как осуществляется регуляция всего этого комплекса и какую роль такая регуляция играет в сверхсинтезе цитрата и т.д. В перспективе изучение этих вопросов приведет к созданию еще

более эффективных продуцентов не только органических кислот, но и других важных метаболитов.

Получено 23.12.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Bentley, R. A Ferment of Fermentations: Reflections on the Production of Commodity Chemicals Using Microorganisms / R. Bentley, J.W. Bennett // *Advan. Appl. Microbiol.* — 2008. — V. 63(7). — P. 1—32.
2. Scazzocchio, C. *Aspergillus*: A Multifaceted Genus: Encyclopedia of Microbiology. — Boston: Academic Press Inc., 2009. — P. 401—421.
3. Plassard, C. Regulation of low-molecular weight organic acid production in fungi / C. Plassard, P. Fransson // *Fungal Biol. Rev. Elsevier Ltd.* — 2009. — V. 23(1, 2). — P. 30—39.
4. Karaffa, L. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? / L. Karaffa, C.P. Kubicek // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2003. — V. 61. — P. 189—196.
5. de Jongh, W.A. Enhanced citrate production through gene insertion in *Aspergillus niger* / W. A. de Jongh, J. Nielsen // *Metab. Eng.* — 2008. — V. 10. — P. 87—96.
6. Ruijter, G.J.G. Overexpression of phosphofructokinase and pyruvate kinase in citric acid-producing *Aspergillus niger* / G.J.G. Ruijter, H. Panneman, J. Visser // *Biochim. Biophys. Acta — Gen. Subj.* — 1997. — V. 1334. — P. 317—326.
7. Panneman, H. Cloning and biochemical characterisation of an *Aspergillus niger* glucokinase. Evidence for the presence of separate glucokinase and hexokinase enzymes / H. Panneman, G.J. Ruijter, H.C. van den Broeck, E.T. Driever, J. Visser // *Eur. J. Biochem.* — 1996. — V. 240(3). — P. 518—525.
8. Panneman, H. Cloning and biochemical characterisation of *Aspergillus niger* hexokinase — the enzyme is strongly inhibited by physiological concentrations of trehalose 6-phosphate / H. Panneman, G.J. Ruijter, H.C. van den Broeck, E.T. Driever, J. Visser // *Eur. J. Biochem.* — 1998. — V. 258(1). — P. 223—232.
9. Park, B.W. Cloning and characterization of the citA gene encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus nidulans* / B.W. Park, K.H. Han, C.Y. Lee, C.H. Lee, P.J. Maeng // *Mol. Cells.* — 1997. — V. 7(2). — P. 290—295.
10. Kirimura, K. Cloning and sequencing of the chromosomal DNA and cDNA encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus niger* WU-2223L / K. Kirimura, Y. Masashi, K. Ikuyo, Y. Oshida, K. Miyake, S. Usami // *J. Biosci. Bioeng.* — 1999. — V. 88(3). — P. 237—243.
11. Ruijter, G.J.G. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of citA overexpression on citric acid production / G.J.G. Ruijter, H. Panneman, D.B. Xu, J. Visser // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2000. — V. 184. — P. 35—40.
12. Krebs, H.A., Lowenstein, J.M., Greenberg, D.M. *Metabolic Pathways.* — New York, Academic Press, 1960. — P. 175.
13. Wiegand, G. Citrate synthase: structure, control, and mechanism / G. Wiegand, S.J. Remington // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* — 1986. — V. 15. — P. 97—117.

14. Ashworth, J.M. Location of the structural gene for citrate synthase on the chromosome of *Escherichia coli* K12 / J.M. Ashworth, H.L. Kornberg, D.L. Nothmann // J. Mol. Biol. — 1965. — V. 11. — P. 654—657.
15. Jia, Y.K. The CIT3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase / Y.K. Jia, A.M. Be'cam, C.J. Herbert // Mol. Microbiol. — 1997. — V. 24(1). — P. 53—59.
16. Graybill, E.R. Functional comparison of citrate synthase isoforms from *S. cerevisiae* / E.R. Graybill, F.R. Matthew, C.E. Kirby, J.W. Hawes // Arch. Biochem. Biophys. — 2007. — V. 465. — P. 26—37.
17. Beevers, H. Microbodies in Higher Plants // Annu. Rev. Plant Physiol. — 1979. — V. 30(1). — P. 159—193.
18. Tolbert, N.E. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes // Annu. Rev. Biochem. — 1981. — V. 50. — P. 133—157.
19. Jaklitsch, W.M. Intracellular location of enzymes involved in citrate production by *Aspergillus niger* / W.M. Jaklitsch, C.P. Kubicek, M.C. Scrutton // Can. J. Microbiol. — 1991. — V. 37. — P. 823—827.
20. Kubicek, C.P., Punt, P., Visser, J. Production of organic acids by filamentous fungi: Industrial Applications [Ed. M. Hofrichter]. — Berlin Heidelberg: Springer, 2011. — P. 215—234.
21. Graham, J.M. Preparation of crude subcellular fractions by differential centrifugation // Sci. World J. — 2002. — V. 2. — P. 1638—1642.
22. Ernster, L., Kuylenstierna, B. Outer membrane of mitochondria: Membranes of Mitochondria and Chloroplasts [Ed. E. Racker]. — Princeton, NY: Van Nostrand Reinhold, 1970. — P. 172—212.
23. D'Souza, S.F. Binding of citrate synthase to mitochondrial inner membranes / S.F. D'Souza, P.A. Srere // J. Biol. Chem. — 1983. — V. 258. — P. 4706—4709.
24. Lewis, K.F. Studies on the Mechanism of Citric Acid Production in *Aspergillus niger* / K.F. Lewis, S. Weinhouse // J. Am. Chem. Soc. — 1951. — V. 73(6). — P. 2500—2503.
25. Bomstein, R.A. The mechanism of formation of citrate and oxalate by *Aspergillus niger* / R.A. Bomstein, M.J. Johnson // J. Biol. Chem. — 1952. — V. 198(1). — P. 143—153.
26. Cleland, W.W. Tracer experiments on the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger* / W.W. Cleland, M.J. Johnson // J. Biol. Chem. — 1954. — V. 208(2). — P. 679—689.
27. Shu, P. Mechanism of citric acid formation from glucose by *Aspergillus niger* / P. Shu, A. Funk, A.C. Neish // Can. J. Biochem. Physiol. — 1954. — V. 32(1). — P. 68—80.
28. Magnuson, J.K. Organic acid production by filamentous fungi / J.K. Magnuson, L.L. Lasure // Adv. Fungal Biotechnol. Ind. Agric. Med. — 2004. — P. 307—340.
29. Liu, J.H. Function of a citrate synthase gene (MaGCS) during postharvest banana fruit ripening / J.H. Liu, G.H. Chi, C.H. Jia, J.B. Zhang, B.Y. Xu, Z.Q. Jin // Postharvest Biol. Technol. — 2013. — V. 84. — P. 43—50.
30. Jones, D.L. Organic acids in the rhizosphere — a critical review // Plant Soil. — 1998. — V. 205(1). — P. 25—44.
31. Ratledge, C. Look before you clone // FEMS Microbiol. Lett. — 2000. — V. 189. — P. 317—318.
32. Pel, H.J. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 / H.J. Pel, J.H. de Winde, D.B. Archer, P.S. Dyer, G. Hofmann, P.J. Schaap, G. Turner // Nat. Biotechnol. — 2007. — V. 25(2). — P. 221—231.
33. Kholodenko, B.N. Control theory of metabolic channelling / B.N. Kholodenko, M. Cascante, H.V. Westerhoff // Mol. Cell. Biochem. — 1995. — V. 143(2). — P. 151—168.
34. Russell, R.J. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antarctic bacterium / R.J. Russell, U. Gerike, M.J. Danson, D.W. Hough, G.L. Taylor // Structure. — 1998. — V. 6(3). — P. 351—361.
35. Neupert, W. How proteins are transported into mitochondria / W. Neupert, G. Schatz // Trends Biochem. Sci. — 1981. — V. 6(January). — P. 1—4.
36. Alam, T. In vitro translation of mRNA for yeast citrate synthase / T. Alam, D. Finkelstein, P.A. Srere // J. Biol. Chem. — 1982. — V. 257(18). — P. 11181—11185.
37. Gurr, S.J. The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi / S.J. Gurr, S. E. Unkles, J. R. Kinghorn // Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol. — 1987. — V. 22. — P. 93—139.
38. Jones, M.G. The first filamentous fungal genome sequences: *Aspergillus* leads the way for essential everyday resources or dusty museum specimens? // Microbiology. — 2007. — V. 153(1). — P. 1—6.
39. Dave, K. Utility of *Aspergillus niger* citrate synthase promoter for heterologous expression / K. Dave, N.S. Punekar // J. Biotechnol. — 2011. — V. 155(2). — P. 173—177.
40. Maerker, C. Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*: Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia / C. Maerker, M. Ronde, A. Brakhage, M. Brock // FEBS J. — 2005. — V. 272. — P. 3615—3630.
41. Flippi, M. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. / M. Flippi, J. Sun, X. Robellet, L. Karaffa, E. Fekete, A. P. Zeng, C.P. Kubicek // Fungal Genet. Biol. — 2009. — V. 46(1). — P. S19—S44.
42. Sun, J. Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics / J. Sun, X. Lu, U. Rinas, A. P. Zeng // Genome Biol. — 2007. — V. 8(9). — P. R182.
43. Kubicek, C.P. Regulation of citrate synthase from the citric acid-accumulating fungus, *Aspergillus niger* / C.P. Kubicek, M. Röhr // Biochim. Biophys. Acta. — 1980. — V. 615(2). — P. 449—457.
44. Williamson, J.R. Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems / J.R. Williamson, R.H. Cooper // FEBS Lett. — 1980. — V. 117 Suppl. — P. K73—K85.
45. Beckmans, S. Some structural and regulatory aspects of citrate synthase // Int. J. Biochem. — 1984. — V. 16(4). — P. 341—351.
46. Ahmed, S.A. Mitochondrial activity during citric acid production by *Aspergillus niger* / S.A. Ahmed, J.E. Smith, J.G. Anderson // Transact. British Mycol. Soc. — 1972. — V. 59(1). — P. 51—61.

47. *Kubicek, C.P.* Citric Acid Fermentation / C.P. Kubicek, M. Röhr, H.J. Rehm // Criti. Rev. Biotechnol. — 1985. — V. 3(4). — P. 331—373.
48. *Pogson, C.I.* Oxaloacetic acid. Tautomeric and hydrated forms in solution / C.I. Pogson, R.G. Wolfe // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1972. — V. 46(3). — P. 1048—1054.
49. *Pazouki, M.* Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose / M. Pazouki, P.A. Felse, J. Sinha, T. Panda // Bioproc. Eng. — 2000. — V. 22. — P. 0353—0361.
50. *Barrington, S.* Response surface optimization of medium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss / S. Barrington, J.W. Kim // Bioresour. Technol. — 2008. — V. 99. — P. 368—377.
51. *Manonmani, H.K.* Citric acid production by a selected isolate of *Aspergillus niger* in defined media / H.K. Manonmani, K.R. Sreekantiah // J. Microb. Biotechnol. — 1989. — V. 4(2). — P. 75—79.
52. *Bayer, E.* Evidence from inhibitor studies for conformational changes of citrate synthase / E. Bayer, B. Bauer, H. Eggerer // Eur. J. Biochem. — 1981. — V. 120. — P. 155—160.
53. *Wieland, O.* Inhibition of Citrate-Synthase by Palmityl-Coenzyme A / O. Wieland, L. Weiss // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1963. — V. 13. — P. 26—31.
54. *Caggiano, A.V.* Regulation of enzymes by fatty acyl coenzyme A. Site-specific binding of fatty acyl coenzyme A by citrate synthase—a spin-labeling study / A.V. Caggiano, G.L. Powell // J. Biol. Chem. — 1979. — V. 254(8). — P. 2800—2806.
55. *Papagianni, M.* Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling // Biotechnol. Adv. — 2007. — V. 25(3). — P. 244—263.
56. *Cordewener, J.* A permeabilized cell assay system for studying enzyme regulation and localisation in *Aspergillus niger* / J. Cordewener, R. Busink, J. Visser // J. Microbiol. Methods. — 1989. — V. 10. — P. 231—240.
57. *Sols, A., Marco, R.* Concentrations of metabolites and binding sites. Implications in metabolic regulation: Current Topics in Cellular Regulation. V. 2. [Eds. L.H. Bernard, E.R. Stadtman]. — London: Academic Press, 1970. — P. 227—273.
58. *Moriyama, T.* Purification of Rat and Rat Liver Citrate Synthases. Physical, Kinetic, and Immunological Studies / T. Moriyama, P.A. Srere // J. Biol. Chem. — 1971. — V. 246(10). — P. 3217—3223.
59. *Beeckmans, S.* Purification and Physicochemical Characterization of Chicken Heart Citrate Synthase / S. Beeckmans, L. Kanarek // Int. J. Biochem. — 1983. — V. 15(4). — P. 469—478.
60. *Remington, S.* Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Å resolution / S. Remington, G. Wiegand, R. Huber // J. Mol. Biol. — 1982. — V. 158(1). — P. 111—152.
61. *Roccatano, D.* Investigation of the mechanism of domain closure in citrate synthase by molecular dynamics simulation / D. Roccatano, A.E. Mark, S. Hayward // J. Mol. Biol. — 2001. — V. 310. — P. 1039—1053.
62. *Brent, L.G.* The interaction of yeast citrate synthase with yeast mitochondrial inner membranes / L.G. Brent, P.A. Srere // J. Biol. Chem. — 1987. — V. 262(1). — P. 319—325.
63. *Kispal, G.* Studies on yeast peroxisomal citrate synthase / G. Kispal, P.A. Srere // Arch. Biochem. Biophys. — 1991. — V. 286(1). — P. 132—137.
64. *Hackenbrock, C.R.* Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1968. — V. 61(2). — P. 598—605.
65. *Capaldi, R.A.* Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane // Biochim. Biophys. Acta. — 1982. — V. 694(3). — P. 291—306.
66. *Beeckmans, S.* Demonstration of physical interactions between consecutive enzymes of the citric acid cycle and of the aspartate-malate shuttle. A study involving fumarase, malate dehydrogenase, citrate synthesis and aspartate aminotransferase / S. Beeckmans, L. Kanarek // Eur. J. Biochem. — 1981. — V. 117(3). — P. 527—535.
67. *Srere, P.A., Sherry, A.D., Malloy, C.R., Sumegi, B.* Channeling in Intermediary Metabolism. — London, UK: Portland Press Ltd., 1997. — 150 p.
68. *Morgunov, I.* Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase: Substrate channeling of oxaloacetate / I. Morgunov, P.A. Srere // J. Biol. Chem. — 1998. — V. 273. — P. 29540—29544.
69. *Datta, A.* Substrate channeling of oxalacetate in solid-state complexes of malate dehydrogenase and citrate synthase / A. Datta, J.M. Merz, H.O. Spivey // J. Biol. Chem. — 1985. — V. 260(28). — P. 15008—15012.
70. *Lindbladh, C.* Preparation and kinetic characterization of a fusion protein of yeast mitochondrial citrate synthase and malate dehydrogenase / C. Lindbladh, M. Rault, C. Hagglund, W.C. Small, K. Mosbach, L. Bülow, C. Evans, P.A. Srere // Biochemistry. — 1994. — V. 33(39). — P. 11692—11698.
71. *Shatalin, K.* Electrostatic channeling of oxaloacetate in a fusion protein of porcine citrate synthase and porcine mitochondrial malate dehydrogenase / K. Shatalin, S. Lebreton, M. Rault-Leonardon, C. Ve'lot, P.A. Srere // Biochemistry. — 1999. — V. 38(3). — P. 881—889.
72. *Elcock, A.H.* Evidence for electrostatic channeling in a fusion protein of malate dehydrogenase and citrate synthase / A.H. Elcock, J.A. McCammon // Biochemistry. — 1996. — V. 35(39). — P. 12652—12658.
73. *Ve'lot, C.* Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon / C. Ve'lot, M.B. Mixon, M. Teige, P.A. Srere // Biochemistry. — 1997. — V. 36(47). — P. 14271—14276.
74. *Bayer, E.* Chemical modification of citrate synthase / E. Bayer, B. Bauer, H. Eggerer // FEBS Lett. — 1981. — V. 127(1). — P. 101—104.

K.V. ALEKSEEV^{1,*}, M.V. DUBINA², and V.P. KOMOV¹

¹The St-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, 197376, St.-Petersburg Russia

² The St.-Petersburg Academic University, 194021, St.-Petersburg Russia

e-mail: hermelynn@mail.ru

Molecular-Genetic and Biochemical Characteristics of Citrate Synthase from the Citric Acid Producing Fungus *Aspergillus niger*

The review is devoted to the achievements in the investigation of citrate synthase, an enzyme that plays a key role in cell

metabolism and catalyzes the process of citric acid synthesis at the first step of the tricarboxylic acid cycle (TCA). The primary industrial producer of citric acid is an *Aspergillus niger* fungus; therefore, the fundamental molecular-genetic and biochemical characteristics of the enzyme from this producer are discussed in comparison with those of other eukaryotes. The information about mechanisms of the citric acid overproduction in *A. niger* and its evolutionary features are analyzed. The current review can be helpful in the development of strategy for the design of more effective organic acids producers.

Key words: *Aspergillus niger*, citric acid biosynthesis, citrate synthase.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 1, P.11–20.

*Author for correspondence.