

# Regulace biosyntézy sekundárních metabolitů

Ing. VLADISLAV BĚHAL, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

*Klíčová slova: regulace, sekundární metabolit, enzymy, nadprodukce, rezistence, signální molekuly*

## Úvod

Mikroorganismy produkují řadu látek, jejichž význam pro producenta není zjevný, a které nazýváme souhrnně sekundární metabolismus (SM). Tyto metabolity mají rozličné biologické aktivity. Nejznámější jsou antibiotika, kancerostatika; fungují však i jako pesticidy, herbicidy, insekticidy, antihelmintika a lze předpokládat, že můžeme najít látku s libovolnou biologickou aktivitou, budeme-li dosti trpělivě hledat a mít vhodnou screenovací metodu. Limitujícím faktorem je zde především nedostatek těchto testovacích metod, protože jinak počet mikrobiálních produktů je nepřeberný.

Při studiu regulace biosyntézy (SM) si musíme především uvědomit rozdíl v situaci, kdy mikroorganismus produkuje malá množství (SM), zhruba v množství jako v přírodě, která jsou pro něho fyziologická, a situaci, kdy mikroorganismus produkuje o dva až tři řády větší množství (SM) v průmyslových podmínkách, kdy hovoříme o tzv. „nadprodukci“ metabolitu. V tomto případě pracujeme s „domestifikovanými“ kmeny, které jsme před tím podrobili mnohonásobné mutaci. Jejich metabolismus je značně pozměněný. Syntéza některých látek je potlačena a poměr aktivit základních metabolických druh je odlišný od původních kmenů.

## Genetická regulace

Geny kódující biosyntézu SM byly nalezeny na chromosomu a v několika případech i na plazmidech. Stejně jako u rezistentních mikroorganismů i rezistence vůči vlastnímu produktu byla nalezena především na plazmidech. V současné době se konají pokusy s klonováním úseků DNA s geny kódujícími biosyntézu SM se snahou o přenesení této vlastnosti do jiného mikroorganismu. Práce je to velmi obtížná, protože geny nemusí být všechny vedle sebe. Geny pro enzym katalyzující tři poslední reakce biosyntézy oxytetracyklinu (OTC) byly nalezeny v opačné poloze na chromosomu, než jsou geny pro jiné tři enzymy biosyntézy OTC [1]. Vysokoprodukční mutanty, se kterými nyní pracujeme a využíváme k výrobě antibiotik, byly však získány metodami klasického šlechtění, tj. výběrem mutant s výhodnějšími vlastnostmi po předchozím působení mutagenním činitelům.

Má-li mikroorganismus ve svém genetickém materiálu zakódovanou schopnost vysoké produkce SM, pak to ještě neznamená, že toto množství bude produkovat za všech podmínek. Aby bylo dosaženo vysoké produkce, musíme mikroorganismu připravit vhodné podmínky. Mikroorganismy jsou velmi citlivé a na každý nevhodný zásah do vývoje kultury reagují snížencem produkcí. Počínaje konstrukcí fermentační nádoby, způsobem a množstvím aerace a složením fermentačního média konče, musíme hledat a dодержovat optimální podmínky pro ma-

ximální produkci. Požadovanou expresi SM dosahujeme především volbou vhodného živného média v průběhu celé fermentace. Tím způsobem navodíme v kultuře takový fyziologický stav, při kterém dojde k nadprodukci mikrobiálního metabolitu.

## Fyziologický stav nadprodukce

Některé charakteristiky fyziologického stavu nadprodukce SM již známe. Vyznačuje se především zpomalením růstu, vyjádřeným někdy dosud nepřesně zpomalením přírůstku sušiny. Ještě dříve než zaznamenáme zpomalení nebo zastavení přírůstku sušiny a zpomalení proteosyntézy, dochází k zpomalení až zastavení syntézy RNA a DNA [2, 3, 4, 5]. V podstatě je omezena aktivita enzymatických systémů primárního metabolismu. Současně s omezením aktivity primárního metabolismu nastává exprese enzymů sekundárního metabolismu (ESM). Výše produkce řady SM je přímo úměrná množství ESM v buňce, resp. kultuře. Dá se předpokládat, že enzymatické systémy syntezující aminokyseliny a jiné stavební jednotky potřebné pro růst jsou dosti aktivní, aby bezpečily syntézu stavebních jednotek pro SM.

Přechod kultury na sekundární metabolismus je návazen vyčerpáním rychle utilizovatelných zdrojů uhlíku, dusíku a fosfátu. Z uhlíkatých zdrojů je to především glukosa, která inhibuje syntézu antibiotik a jak jsme dokázali u *S. aureofaciens*, repremuje syntézu ESM [6]. Tomuto jevu se říká katabolická repese, i když na přesném vymezení tohoto pojmu se někteří autoři nemohou shodnout. Jasné však je, že v přítomnosti glukosy v médiu k syntéze SM nedochází. Pouze tehdy, byla-li glukosa přistokována ve velmi nízkých koncentracích, bylo možno ji použít jako zdroj uhlíku v produkční fázi SM. Jinak jako uhlíkaté zdroje slouží sacharosa, laktosa, škrob, estery mastných kyselin a polysacharidy ve formě sójové nebo arašídové mouky.

Rychle utilizovatelné zdroje dusíku, které musí být rovněž vyčerpány, aby došlo k exprese ESM, jsou amonné soli, dusičnan a některé aminokyseliny. Pro různé SM jsou různé aminokyseliny, které repremuje syntézu SM. Potřeba aminokyselin v produkční fázi kryjí mikroorganismy z bílkovin přítomných v moukách. K tomuto účelu májí vybudovaný systém exocelulárních proteáz [7].

Produkce SM probíhá vesměs na půdách s nižším obsahem fosfátu, než je optimální množství pro růst kultury. U biosyntézy tetracyklinů, tylosinu, candididinu a gramicidinu S bylo prokázáno, že snížení produkce antibiotika je způsobeno tím, že anorganický fosfát v médiu repremuje biosyntézu ESM [8, 9, 10, 11]. Přídavek fosfátu v růstové fázi má za následek zastavení syntézy ESM a obnovení intenzivní proteosyntézy. Přídavek fosfátu v produkční fázi má jen malý, anebo žádný efekt [12,

[13]. Anorganický fosfát limituje produkci SM, jen je-li ve formě fosforečných iontů v médiu. I vysoká kvanta fosfátu, jsou-li absorbována mikroorganismem, již expresi ESM nereprimují, alespoň ne při biosyntéze tetracyklinů.

Nejasná je přičina nižší citlivosti vůči vyšším koncentracím fosfátu u mutant získaných Martinem et al. [14] u producenta candididinu *S. griseus* IMRU 3570, Hänelem et al. [15] u *S. noursei* JA 38906 produkujícím streptothricin a Novotnou et al. [16] u *S. aureofaciens*. O mutantech *S. griseus* a *S. noursei* prokázali autoři, že se nejedná o permeabilní mutanty. U mutant *S. aureofaciens* nedocházelo ke snížení množství anhydrotetracyklinoxygénasy (ATC oxygenases) při vyšších koncentracích fosfátu, anebo snížení bylo podstatně menší než u rodičovského kmene. Mezi získanými mutantami byly i takové, které sice ATC-oxygenases obsahovaly, množství enzymu při vyšších koncentracích fosfátu neklesalo, avšak produkce CTC byla o řad nižší než u rodičovského kmene.

### Enzymy sekundárního metabolismu

Pod pojmem ESM rozumíme enzymy, které se přímo nepodílejí na spojování stavebních jednotek SM ve složitější struktury a transformaci těchto struktur na konečné produkty. Jedná se vesměs o multienzymatické komplexy reverzibilně rozložitelné na podjednotky. Produkce SM závisí jak na jejich množství, tak i na jejich aktivitě. Zahájení syntézy ESM, který nastává po vyčerpání rychleutilizovatelných zdrojů uhlíku, dusíku a fosforu, můžeme považovat za přechod z růstové fáze do produkční, resp. za přechod z fáze, kdy probíhá převážně primární metabolismus do fáze sekundárního metabolismu.

Tam, kde nedochází k výraznému snížení nárůstu sušiny v produkční fázi, jako např. u biosyntézy candididinu, nedochází k výraznému snížení proteosyntézy [17]. Produkci SM během růstové fáze můžeme navodit, použijeme-li živinami chudé médium. Příkladem může sloužit biosyntéza chloramphenikolu. Na chudém médiu je však produkce chloramphenikolu nízká. Na bohatých půdách, kdy docilujeme vysokých výtěžků, nastává jeho syntéza až koncem růstové fáze.

### ATP a biosyntéza sekundárních metabolitů

S poklesem aktivity primárního metabolismu souvisí i pokles obsahu ATP v buňce. U většiny sledovaných případů [18, 19, 20, 21] biosyntéze SM předchází prudké snížení obsahu ATP, takže je uvažován ATP jako efektor působící přeměnu primárního metabolismu na sekundární. I když tato role není u některých případů vyloučena, můžeme se spíše dívat na vnitrobuněčný obsah ATP jako na marker aktivity primárního metabolismu. I u metabolitů, kdy dochází k syntéze ESM během růstu kultury, jako je tylosin, klesá při vyčerpání rychleutilizovatelných zdrojů hladina ATP, po níž nastává syntéza ESM, resp. syntéza SM. Při biosyntéze tylosinu klesá po vyčerpání glukosy hladina ATP na určitou mez. V té době jsou syntetizovány enzymy tylosin synthetas. Případem glukosy má za následek nejprve snížení obsahu ATP oproti kontrole, ATP je zřejmě využita k fosforylacii glukosy. Již v této době, kdy je hladina ATP snížena, biosyntéza tylosinu stagnuje. Po několika hodinách nastane přechodné zvýšení obsahu ATP. Tylosin je opět syntetizován, až klesne hladina ATP, zřejmě v důsledku vyčerpání přidané glukosy [21].

Obdobně nespecifické je zřejmě působení takových látek, jako jsou ppGpp a cAMP.

### Induktory syntézy sekundárních metabolitů

Jako induktor syntézy SM slouží však látky jako je tryptofan, který zvyšoval množství chlormutasy a phenylalanin ammoniaklyasy při produkci mucidinu, u basidiomycet *Oudemansiella mucida* [22, 23].

Phenylalanintransaminasa, která se syntézy mucidinu neúčastní, tryptophanem ovlivněna nebyla. Tryptophan rovněž indukuje syntézu alkaloidů [24].

Z toho, že je účinný, jen byl-li přidáván v růstové fázi, můžeme usuzovat, že indukuje syntézu ESM. Za stejných okolností stimuluje methionin biosyntézu Cephalosporinu C [25].

### Zastavení syntézy enzymů sekundárního metabolismu

Pro výši produkce metabolitu je důležité, jakým způsobem je regulováno zastavení biosyntézy ESM. Zde musíme zejména rozlišovat, zda se jedná o kultivaci kmenů vysokoprodukčních nebo nízkoprodukčních, resp. divokých. U vysokoprodukčních kmenů musíme předpokládat, že řada faktorů inhibujících biosyntézu ESM i jiných faktorů inhibujících syntézu SM, byla odstraněna mutačními zásahy do genu kmene.

Jedním z významných inhibitorů biosyntézy ESM je přímo metabolit jimi produkovaný. Zřetelně to bylo prokázáno u chloramphenicolu, kdy syntéza arylaminsynthetas je jím inhibována [26]. Inhibice vlastní biosyntézy antibiotikem je velmi častým jevem. Vysokoprodukční mutanty mají však vytvořenou alespoň částečnou rezistenci vůči produktu. Způsobů rezistence bylo popsáno několik. Rezistence se může zvýšit např. modifikací ribosomů producenta, syntézou bílkovin vyvazujících produkt, anebo jiným způsobem chránícím ribosomy, změnou permeability cytoplasmatické membrány aj. Principiálně byla pozorována rezistence k vyšším koncům produktu u výše produkčních kmenů.

### Feed-back inhibice

Při biosyntéze SM se uplatňuje i inhibice enzymů participujících na jejich biosyntéze konečným produktem. Inhibici ATC-oxygenasy tetracykliny jsme prokázali u *Streptomyces aureofaciens*. Kromě toho byl ovlivněn tento enzym ionty Ca, Mg a dalšími kovovými ionty [27]. Ionty Ca, Co, Mn a Zn byla rovněž ovlivněna bacitracinsynthetas [28]. Kromě feed-back inhibice vlastním produktem známe i feed-back inhibici produktem, který má část biosyntetické dráhy společně. Jako příklad může sloužit valin a lysin při biosyntéze penicilinu.

### Signální molekuly

Růst kultury a biosyntéza SM je řízena i ovlivňována i nízkomolekulárními látkami, o kterých předpokládáme, že mají funkci signálních molekul. U některých byly určeny i struktury. Nejznámější z nich je Faktor A izolovaný pracovní skupinou vedenou prof. Chochlovem z *Streptomyces griseus*. Tato látka reguluje biosyntézu streptomycinu. Z několika druhů streptomycet byly izolovány deriváty 2-methyl-3-hydroxy-4-butenolidu, které měly funkci autoregulátorů biosyntézy anthracyklinů [29].

### Závěr

Fermentační průmysl se z větší části zabývá výrobou SM. Aby tato výroba byla co nejekonomičtější, musíme znát regulační mechanismy, jimž biosyntéza SM podléhá. V průmyslu zatím převládá empirie nad vědecky zdůvodněným vedením mikrobiálních kultur. Vzhledem k tomu, že produkce SM závisí na mnoha faktorech, bude třeba volit optimální podmínky pomocí počítače. K tomu musíme mít matematický model experimentálně ověřený. K sestavení takového modelu však potřebujeme více poznatků o chování mikroorganismů za podmínek nadprodukce SM.

### Literatura

- [1] RHODES, P. M., WINSKIL, N., FRIEND, E. J., WARREN, M. W.: J. Gen. Microbiol. **124**, 1981, s. 329.
- [2] ŠIMŮT, J., HUDEC, J., CHAN, H. T., DÁNYI, O., ZELINKA, J.: J. Antibiot. **32**, 1979, s. 53.
- [3] LIRAS, P., VILLANUEVA, J. R., MARTIN, J. F.: J. Gen. Microbiol. **102**, 1977, s. 269.
- [4] BĚHAL, V., VANĚK, Z., HOŠTÁLEK, Z., RAMADAN, A.: Folia Microbiol. **24**, 1979, s. 211.
- [5] MADRY, N., PAPE, H.: Actinomycetes, G. Fischer, Stuttgart, 1981.
- [6] ERBAN, V., NOVOTNÁ, J., BĚHAL, V., HOŠTÁLEK, Z.: Folia Microbiol. **28**, 1983, s. 262.

- [7] POKORNÝ, M., VITOЛЕ, L., TURK V., RENKO, M., ŽUVANIC, J.: Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **8**, 1979, s. 81.
- [8] BĚHAL, V., HOŠTÁLEK, Z., VANĚK, Z.: Biotechnol. Lett., **1**, 1979, s. 177.
- [9] MADRY, N., PAPE, H.: *Actinomycetes*, G. Fischer, Stuttgart, 1981.
- [10] MARTIN, J. F., ALEGRE, M. T., GIL, J. A., NAHARZO, G.: *Advances in Biotechnology: Fermentation Products*, Pergamon Press, Toronto, 1981.
- [11] CHIU, C. W., BERNARD, T., DOLLWEG, G.: *Peptide Antibiotics - Biosynthesis and Functions*, Gruyter, Berlin, 1982.
- [12] BĚHAL, V., PRUŠÁKOVÁ-GRÉGROVÁ, J., HOŠTÁLEK, Z.: Folia Microbiol. **27**, 1982, s. 102.
- [13] BĚHAL, V.: *Overproduction of Microbial Products*, Academic Press, London, 1982.
- [14] MARTIN, J. F., NAHARZO, G., LIRAS P., VILLANUEVA J. R.: J. Antibiот. **32**, 1979, s. 660.
- [15] HOENEL, F., GRÄFE, W., FRIDRICH, W., BORMAN, E. J.: Ztsch. Allgem. Mikrobiol. **24**, 1984, s. 239.
- [16] NOVOTNÁ, J., KADIR, O. A., BLUMAUEROVÁ M., BĚHAL, V., HOŠTÁLEK, Z.: Folia Microbiol. **29**, 1984, s. 399.
- [17] LIRAS, P., VILLANUEVA, J. R., MARTIN, J. F.: J. Gen. Microbiol., **102**, 1977, s. 289.
- [18] JANGLOVÁ, Z., SUCHÝ, J., VANĚK, Z.: Folia Microbiol. **14**, 1969, s. 208.
- [19] ČURDOVÁ, E., KŘEMEN, A., VANĚK, Z.: Folia Microbiol. **21**, 1976, 481.
- [20] MADRY, N., SPRINGMEYER, R., PAPE, H.: Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **7**, 1979, s. 365.
- [21] VU-TRONG, K., BHUWAPATHANAPUS, S., GREY, P. P.: Anti-microb. Agents and Chemother. 1980, s. 519.
- [22] ZOUCHOVÁ, Z.: *Disert. práce*, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha, 1980.
- [23] NERUD, F., ZOUCHOVÁ, Z., MUSÍLEK, V.: Folia Microbiol., **29**, 1984, s. 389.
- [24] REBBERS, J. E., ROBERTSON, L. W., HORNEMANN, K. M., JINDRA, A., FLOSS, H. G.: J. Bacteriol. **112**, 1972, s. 791.
- [25] NÜESCH, J., TREICHLER, H. J., LIERSCH, M.: *Genetics of Industrial Microorganisms*, Academia, Praha, 1973.
- [26] JONES, A., WESTLAKE, D. W. S.: Can. J. Microbiol. **20**, 1974, 1599.
- [27] BĚHAL, V., NEUŽIL, J., HOŠTÁLEK, Z.: Biotechnol. Lett., **5**, 1983, s. 537.
- [28] FROYSHOV, O., MATHIESEN A., HAAVIK, H. I.: J. Gen. Microbiol. **117**, 1980, s. 163.
- [29] GRÄFE, U., REINHARDT, G., SCHADE, W., FRI, H. I., FLECK, W. F.: *Symp. Physiology of Microbial Growth and Differentiation*, Reinhardsbrunn, DDR, May 1984.

Běhal, V.: **Regulace biosyntézy sekundárních metabolitů**. Kvas. prům. **31**, 1985, č. 7—8, s. 157—159.

Produkce sekundárních metabolitů je určována jak geny lokalizovanými na chromosomech, tak i na mimochromosomalních částicích. Výši produkce často určuje množství enzymů sekundárního metabolismu v buňkách. Tyto enzymy se syntézují po vyčerpání rychleutilizovatelných zdrojů uhlíku, dusíku a fosforu. Jejich syntézu často inhibuje vlastní metabolit. Metabolit může rovněž inhibovat aktivitu jak enzymů primárního metabolismu, tak i aktivitu enzymů sekundárního metabolismu.

Бегал, В.: **Регулирование биосинтеза микробиальных метаболитов**. Квас. прум. **31**, 1985, № 7—8, стр. 157—159.

Продукция вторичных метаболитов определена генами, локализованными на хромозомах, и также на внехромосомальных частицах. Уровень продукции часто зависит от количества ферментов вторичного метаболизма в клетках. Эти ферменты синтезируются после исчерпания быстро используемых источников углерода, азота и фосфора. Их синтез часто подавлен собственным метаболитом. Метаболит может также подавлять активность как ферментов первичного метаболизма, так и ферментов вторичного метаболизма.

Běhal, V.: **Biosynthesis control of microbial metabolites**. Kvas. prům. **31**, 1985, No. 7—8, pp. 157—159.

Production of secondary metabolites is determined by genes localised on chromosomes and also on extrachromosomal particles. The level of production is often determined by the amount of enzymes of secondary metabolism in cells. These enzymes are synthesized after exhaustion of rapidly utilizable sources of carbon, nitrogen and phosphorus. Their synthesis is often inhibited by metabolites produced by these enzymes. These products can also inhibit the activity of enzymes of primary metabolism as well as the activity of enzymes of secondary metabolism.

Běhal, V.: **Regulation der Biosynthese mikrobiale Metabolite**. Kvas. prům. **31**, 1985, Nr. 7—8, S. 157—159.

Die Produktion sekundärer Stoffwechselprodukte wird sowohl von Genen, die in den Chromosomen lokalisiert sind, als auch von Genen in extrachromosomalien Partikeln bestimmt. Die Höhe der Produktion gibt oft die Menge der Enzyme des sekundären Stoffwechsels in den Zellen an. Diese Enzyme synthetisieren sich nach der Ausbeute der schnell utilisierbaren Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphor-Quellen. Die Synthese dieser Enzyme inhibiert oft das eigene Stoffwechselprodukt. Der Metabolit kann ebenfalls sowohl die Aktivität der Enzyme des primären Stoffwechsels als auch die Aktivität der Enzyme des sekundären Stoffwechsels inhibieren.