

MARCIN BIZUKOJC
STANISŁAW LEDAKOWICZ

Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Biosynteza metabolitów wtórnych przez *Aspergillus terreus*

Metabolity wtórne *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus jest grzybem nitkowym należącym do gromady *Ascomycota*. Ten gatunek ma szczególnie bogaty metabolizm wtórny. Różne szczepy *A. terreus* są zdolne do biosyntezy między innymi takich metabolitów, jak benzochinony, aspulwinon, astechrom, astepirony, kwas astrowy, astrochinony, butyrolaktony, cytrowirydyna, cytrynina, emodyna, erdyna, (+)-geodyna, kwas itakonowy, hydrazynokarboksamid, lowastatyna, patulina, kwetyna, sulochryna, kwas terreinowy, terreina, toluochinony. Z tych metabolitów lowastatyna jest najważniejsza dla inżynierii biochemicznej, biotechnologii i medycyny, gdyż jest ona inhibitorem reduktazy (S)-3-hydrokso-3-metyloglutarylo-CoA (3-HMG-CoA). Enzym ten katalizuje jedną z początkowych reakcji w szlaku endogennej biosyntezy cholesterolu w organizmie człowieka: redukcję 3-HMG-CoA do mewalonianu. Lowastatyna, a ściślej mówiąc forma β -hydroksokwasowa tego laktonu zwana kwasem mewolinowym jest współzawodniczym inhibitorem tej reakcji. Przez to lowastatyna jest wykorzystywana jak lek obniżający poziom cholesterolu w organizmie człowieka. Towarzysząca często lowastatynie (+)-geodyna, mimo że kilkadziesiąt lat wcześniej odkryta, nie znajduje na razie żadnego zastosowania w medycynie i jest traktowana jako produkt uboczny procesu.

Szlaki biochemiczne biosyntezy lowastatyny i (+)-geodyny oraz rekonstrukcja sieci metabolicznej

Biosynteza metabolitów poliketydowych lowastatyna i (+)-geodyna składa się zawsze z dwóch etapów. Pierwszym etapem jest działanie syntazy poliketydowej (PKS), szczególnego enzymu zawierającego kilka miejsc aktywnych o różnych właściwościach (syntazy iteracyjne) lub kompleksu enzymatycznego (syntazy modułowe). Drugi etap, czyli *post-PKS tailoring*, jest często wielostopniowy. Polega on na dalszej enzymatycznej modyfikacji produktu uzyskanego w wyniku działania PKS. Zazwyczaj są to reakcje utleniania, estryfikacji czy przenoszenia grup funkcyjnych.

Biosynteza lowastatyny przez *A. terreus* jest w pierwszym etapie katalizowana przez syntazę nonaketydową lowastatyny (LNKS, EC 2.1.3.161). Substratem jest jedna cząsteczka inicjująca acetylo-CoA, do której stopniowo (ośmiokrotnie) dołączane są kolejne cząsteczki wydłużające malonylo-CoA. Dodatkowo na każdym etapie przyłączania malonylo-CoA zachodzą w różnych konfiguracjach reakcje ketoredukcji, enoloredukcji, dehydratacji i przeniesienia grupy metylowej. Produktem końcowym jest niearomatyczny związek 4a,5-dihydromonakolina L. Ten związek jest następnie utleniany,

a na koniec do uzyskanej w ten sposób monakoliny J przyłączany jest na drodze reakcji transestryfikacji diketyd, produkt reakcji acetylo-CoA i malonylo-CoA katalizowanej przez syntazę diketydową lowastatyny (LDKS), kwas (2R)-2-metylo-omasłowy [1].

W odróżnieniu od lowastatyny (+)-geodyna jest metabolitem oktaketydowym. Syntaza oktaketydowa tworząca w pierwszym etapie z jednej cząsteczki acetylo-CoA i siedmiu malonylo-CoA antron emodyny nie została scharakteryzowana. Znacznie lepiej poznane są etapy *post-PKS* prowadzące do (+)-geodyny, poprzez emodynę, kwetynę i sulochrynę [2].

Badanie metabolizmu pierwotnego współcześnie prowadzi się wykorzystując automatyczną anotację genomu. Częściowo zsekwencjonowany genom *A. terreus* jest dostępny w Broad Institute (MIT). Automatyczna anotacja genomu została wykonana z wykorzystaniem serwera KAAS (*KEGG Automatic Annotation Server*) [3]. Dzięki rozpoznaniu genów ortologicznych w transkryptomie lub proteomie i przyporządkowaniu ich do ortologii KEGG możliwe jest odtworzenie sieci metabolicznej. Porównując odtworzone sieci metaboliczne z danymi, jakie uzyskuje się na drodze badań na fenotypem, można stwierdzić, że potwierdzona jest zdolność *A. terreus* do wzrostu na glukozie jako jedynym źródle węgla. Według anotacji genomu *A. terreus* posiada komplet enzymów glikolitycznych. Podobnie jest w przypadku skrobi i sacharozy, natomiast w odtworzonej sieci brakuje części enzymów odpowiedzialnych za wzrost na laktozie. Badanie fenotypu, jednak jednoznacznie wskazują na to, że taki wzrost jest możliwy. Brak odpowiednich anotacji to tzw. dziury w sieci metabolicznej. Według anotacji genomu i badań fenotypu *A. terreus* jest także zdolny do wzrostu na azotanach jako jedynym źródle azotu, jednak w tych warunkach nie jest tworzona lowastatyna [4]. W rekonstrukcji sieci metabolicznej nie ma możliwości odnalezienia szlaków biosyntezy lowastatyny i (+)-geodyny, z tego względu, że w KEGG brakuje odpowiednich ortologii i map metabolicznych.

Biosynteza lowastatyny i (+)-geodyny przez *A. terreus* w ujęciu fizjologicznym

Biosynteza lowastatyny przez *A. terreus* jest silnie uzależniona od składu podłoża. Analizując wpływ źródła węgla, można stwierdzić, że wolno przyswajalne źródła węgla, jak np. laktoza, są zdecydowanie preferowane niż glukoza. Przy hodowli *A. terreus* na glukozie, obserwuje się biosyntezę etanolu jako produktu ubocznego, co nigdy nie występuje przy użyciu laktozy. Biosynteza lowastatyny i towarzysząca jej geodyna silnie zależy od początkowego stężenia laktozy. Stężenia laktozy na poziomie 5–10 g · l⁻¹ są zdecydowanie niewy-

starzające i szybkie wyczerpanie się źródła węgla hamuje biosyntezę lowastatyny. W przypadku (+)-geodyny ta wrażliwość jest jeszcze wyższa, gdyż przy tak niskich stężeniach laktozy w ogóle nie obserwuje się jej tworzenia. Podniesienie stężenia laktozy z 20 do 40 g · l⁻¹ nie daje specjalnego efektu, gdyż wtedy laktoza pozostaje niewykorzystana w podłożu. Laktoza pozostająca w podłożu sprzyja w wysokim stopniu biosyntezie (+)-geodyny, której maksimum biosyntezy pojawia się w idiofazie [5–7].

Azot organiczny silnie hamuje biosyntezę obydwu omawianych metabolitów wtórnych, z tym, że ten efekt jest znacznie silniejszy w przypadku (+)-geodyny. W tym przypadku już poziom początkowy azotu organicznego odpowiadający 8 g ekstraktu drożdżowego w litrze całkowicie hamuje biosyntezę (+)-geodyny [6,7].

Działanie syntazy nonaketydowej lowastatyny jest silnie zależne do NADPH i CoA. Dlatego hipoteza, czy dodatek prekursorów tych koenzymów wywiera pozytywny wpływ na biosyntezę lowastatyny jest warta sprawdzenia. Ten efekt jest potwierdzony, a najlepsze wyniki uzyskuje się, używając mieszaniny podstawowych witamin z grupy B: tiaminy, ryboflawiny, chlorowodoru pirydoksyny, pantotenianu wapnia oraz nikotynamidu [8].

Napowietrzanie hodowli *A. terreus* wywiera znaczący wpływ na biosyntezę obydwu metabolitów *A. terreus*. Wzrost szybkości napowietrzania jest szczególnie dobry jednak nie dla biosyntezy lowastatyny a (+)-geodyny. Przy vvm przekraczających 1 l_{pow} · min⁻¹ · l⁻¹ nawet kilkadziesiąt razy wyższe stężenie (+)-geodyny niż lowastatyny może zostać uzyskane. Ten efekt jest dodatkowo wzmocniony, jeżeli prowadzony proces jest hodowlą półokresową zasilaną w idiofazie laktozą. Istnieje korelacja między biosyntezą (+)-geodyny a krzywą pH w hodowli okresowej i półokresowej. Silny spadek pH oraz przegięcie krzywej pH jest wyznacznikiem procesu, w którym wydajność biosyntezy (+)-geodyny jest wysoka. Najlepszą strategią, aby zminimalizować biosyntezę produktu ubocznego, czyli (+)-geodyny, nie wpływając przy tym na wydajność biosyntezy lowastatyny jest utrzymywanie stałego pH w późnej trofofazie i idiofazie, poprzez dodawanie do bioreaktora mieszaniny węglanów sodu i potasu. Uzyskuje się wtedy nawet kilkukrotne obniżenie końcowego stężenia (+)-geodyny przy prawie niezmiennym stężeniu lowastatyny. Dodatek nikotynamidu oraz pantotenianu wapnia do takiej hodowli jeszcze bardziej polepsza końcowy stosunek stężeń lowastatyny do (+)-geodyny [9].

Kinetyka biosyntezy lowastatyny i (+)-geodyny przez *A. terreus*

Pod względem kinetycznym biosynteza lowastatyny znacząco odbiega od biosyntezy (+)-geodyny. W przypadku lowastatyny większość tego metabolitu powstaje jeszcze w fazie wzrostu biomasy. Jednakże nawet po zahamowaniu wzrostu biomasy ta biosynteza może być kontynuowana, szczególnie jeśli pozostaje w podłożu laktoza. Biorąc pod uwagę te wyżej wspomniane cechy procesu biosyntezy lowastatyny można uznać ją za częściowo związaną ze wzrostem biomasy (*partially growth-associated*). Biosynteza (+)-geodyny jest obserwowana głównie w idiofazie po zahamowaniu wzrostu biomasy i jest tym intensywniejsza, im więcej pozostaje laktozy w podłożu. Zatem biosynteza (+)-geodyny jest przykładem

tworzenia metabolitu bez powiązania ze wzrostem biomasy (*non-growth associated*) [6,7].

W literaturze przedmiotu istnieją tylko dwa modele kinetyczne biosyntezy lowastatyny. Jeden z nich jest morfologicznie strukturalny, mocno naśladujący wcześniejsze modele biosyntezy penicyliny, przez co zawierający wątpliwe założenia, [10]. Drugi zaś jest oryginalny niestrukturalny model kinetyczny uzyskany wyłącznie na podstawie wyników eksperymentów prowadzonych w szerokim zakresie stężeń substratów limitujących, czyli źródła węgla i azotu [6].

Morfologia grzybni *A. terreus* i różnicowanie się jej strzępek a biosynteza lowastatyny i (+)-geodyny

Przeważającą formą morfologiczną *A. terreus* w czasie wzrostu w hodowli wglębnej jest makroskopowa peletka. Peletki *A. terreus* mają zazwyczaj średnicę od ok. 1 mm do nawet 3 mm. Wielkość peletek ściśle zależy od stężenia spor użytych w podłożu inokulacyjnym. Im więcej spor wprowadzi się do podłoża inokulacyjnego, tym więcej uzyskuje się peletek i tym mniejsza jest ich średnica. Mechanizm tworzenia peletek u *A. terreus* jest mechanizmem aglomeracyjnym. Najpierw spory ze sobą aglomerują a następnie z tych skupisk spor wyrastają strzępki. Młode nie rozwinięte peletki mają czasem jeszcze zdolność do aglomeracji, jednak z ich wiekiem ta zdolność zanika. Szacuje się, że średnio pojedyncza peletka powstaje z ok. 10000 spor [11,12].

Wzrost peletek w podłożu inokulacyjnym, mierzony poprzez zmianę ich średnicy lub pola powierzchni rzutu jest wykładniczy [5]. Po przeniesieniu ich po 24 godzinach do świeżego podłoża hodowlanego przyrost średnicy peletek jest znacznie wolniejszy, pomimo znaczącego wzrostu biomasy jako suchej masy [5, 11].

Istnieje ścisła zależność między morfologią grzybni określaną wielkością peletek, a biosyntezą lowastatyny. Mniejsze peletki zawierają więcej biomasy jako suchej masy i wytwarzają więcej lowastatyny. W przypadku biosyntezy (+)-geodyny wielkość peletek nie ma znaczenia.

W makroskopowych peletkach *A. terreus* można określić ilościowo, przy zastosowaniu technik cyfrowej analizy obrazu, dwie strefy: komórki wierzchołkowe (rosnące, aktywne zlokalizowane na zewnętrznej części peletek) oraz komórki strzępkowe (nierosnące zajmujące wnętrza peletek). Metamorfoza strefy komórek wierzchołkowych w komórki strzępkowe pozostaje w liniowej zależności ze wzrostem biomasy, której stężenie wyrażone jest jako stężenie suchej masy. Jak już wyżej wspomniano peletki nie zmieniają swojej średnicy, lecz na skutek metamorfozy, rosną do wewnątrz, zagęszczając swoją strukturę.

Istnieje związek pomiędzy obecnością strefy rosnącej a właściwą szybkością biosyntezy lowastatyny. Wraz ze zmniejszaniem się udziału tej strefy ta szybkość liniowo maleje. W przypadku (+)-geodyny ta zależność jest odwrotna. Właściwa szybkość biosyntezy (+)-geodyny rośnie wykładniczo wraz z obniżeniem się ułamka strefy wierzchołkowej [11].

Podsumowanie

Badanie fizjologii i metabolizmu grzybów nitkowych zawsze należy prowadzić w kilku obszarach tak, jak to zostało pokazane dla *A. terreus*, szczególnie, jeśli badania dotyczą produkcji metabolitów wtórnych. Na podstawie badań własnych prowadzonych w *Katedrze Inżynierii Bioprocessowej Politechniki*

niki Łódzkiej wykazane zostało, że właściwy dobór składników podłoża, w tym źródeł węgla, azotu i mikroelementów oraz zastosowanie odpowiedniej kontroli procesu pozwala na ukierunkowanie biosyntezy na pożądany metabolit, w tym przypadku była to lowastatyna. Nowym elementem w tego typu badaniach powinna być analiza anotacji genomu danego mikroorganizmu. Ta analiza, jeśli jest uważnie stosowana, a jej wyniki są na bieżąco porównywane z fenotypem, może okazać się przydatnym narzędziem, odkrywającym nowe możliwości metaboliczne danego organizmu, jak wykorzystywanie nietypowych substratów, zdolność do przeprowadzania jakiejś charakterystycznej reakcji enzymatycznej czy też biosyntezy jakiegoś metabolitu. U grzybów nitkowych dodatkowo niezbędne jest uwzględnianie zmian morfologii grzybni w zależności od sposobu przygotowania inokulum i warunków procesowych. Natomiast kinetyka różnicowania się strzępek grzybni zwykle koreluje się z kinetyką biosyntezy produktów. Ta wiedza jest zwykle niezbędna do ustalenia optymalnej strategii prowadzenia procesów biosyntezy w bioreaktorach okresowych i półokresowych.

LITERATURA

1. *J. Kennedy J., K. Auclair, S.G. Kendrew, C. Park, J. Vederas, C.R. Hutchinson: Science* 284, 1368-1372 (1999).
2. *M. Askenazi, E. M. Driggers, D.A. Holtzman, T.C. Norman, S. Iverson, D. Zimmer, M.-E. Boers, P.R. Blomquist, E.J. Martinez, A.W. Monreal, T.P. Feibelman, M.E. Mayorga, M.E. Maxon, K. Sykes, J.V. Tobin, E. Cordero, S. Salama, J. Trueheart, J.C. Royer, K.T. Madden: Nature Biotechnol.*, 21, 150-156 (2003).
3. KAAS – KEGG Automatic Annotation Server: www.kegg.jp/kaas
4. *H. Hajjaj, P. Niederberger, P. Duboc: Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2596, (2001).
5. *M. Bizukojć, S. Ledakowicz: Biotechnologia-monografie* 2(2), 25, (2005).
6. *M. Bizukojć, S. Ledakowicz: J. Biotechnol.* 130, 422, (2007).
7. *M. Bizukojć, S. Ledakowicz: J. Biotechnol.* 132, 453, (2007).
8. *M. Bizukojć, B. Pawłowska, S. Ledakowicz: J. Biotechnol.* 127, 258, (2007).
9. *M. Bizukojć, S. Ledakowicz: Biochem. Eng. J.* 42, 198, (2008).
10. *G. Liu, Z. Xu, P. Cen: Chin. J. Chem. Eng.* 8, 46, (2000).
11. *M. Bizukojć, S. Ledakowicz: World J. Microbiol. Biotechnol.* under review, (2009).
12. *M. Bizukojć, S. Ledakowicz: Biotechnol. J.* in press, 2009.