

Vplyv kvality substrátov na produkciu sekundárnych metabolitov u niektorých húb

Ing. ALŽBETA FUSKOVÁ, Československé stredisko pre životné prostredie, Bratislava, Ing. JÁN FUSKA, DrSc., Ing. MÁRIA ŠTURDIKOVÁ, Doc. Ing. JOZEF AUGUSTÍN, CSc., Katedra biochemickej technológie, ČHTF SVŠT, Bratislava

Kľúčové slová: Biosyntéza sekundárnych metabolitov, zdroje uhlíka a dusíka, vermikulín, vermistatín, palitantín, frekventín, tropolóny, gibberelíny, bikaveríny

Biosyntéza sekundárnych metabolitov je ovplyvnená fyziologickými vlastnosťami mikroorganizmu, koncentráciou a kvalitou zdrojov uhlíka a dusíka, ktoré sú v médiu k dispozícii v priebehu rastu a množenia mikroorganizmu. Prítomnosť prekursoru môže produkciu metabolitu zvýšiť, inhibitor zasa čiastočne alebo aj úplne potlačiť.

Pri biotechnológiach sú uvedené závislosti dôležité, lebo často už v prvej fáze ovplyvňujú úspešný prevod laboratórnych výsledkov do väčších rozmerov. Niektoré z týchto závislostí sme sledovali pri biosyntéze metabolitov v našom laboratóriu.

Penicillium vermiculatum (CCM F-276), izolované z prírodného zdroja, tvorí v submerzných podmienkach ako hlavný metabolit vermikulín [1]. Je to antibiotikum s nezvyčajnými imunosupresívnymi účinkami. Uvedený kmeň produkuje vermikulín na médiu, obsahujúcim sacharózu ako zdroj uhlíka. Ak sa v médiu nahradila sacharóza glukózou, produkovala kultúra miesto vermikulínu vermistatín [2], látku geneticky príbuznú vermikulínu a ďalší metabolit vermiciín [3]. Vermistatín a vermiciín kultúra na médiu so sacharózou neprodukovala. Ak sa v médiu s obsahom sacharózy zvýšila koncentrácia Mg^{2+} z 0,05 na 0,1 %, zvýšila sa i produkcia vermikulínu z 25 na 125 $\mu g \cdot ml^{-1}$, ale produkcia ďalších dvoch metabolitov sa nedokázala.

Penicillium frequentans produkuje dva metabolity: palitantín a frekventín. Nami použitá kultúra produkovala v podmienkach statickej kultivácie palitantín a frekventín v pomere 7:3. V podmienkach submerznej kultivácie sa tvoril frekventín iba na médiu s obsahom laktózy. Je pravdepodobné, že frekventín vzniká z palitantínu oxidáciou jeho primárnej alkoholické skupiny na aldehydickú. Podľa našich experimentov sa takáto premena nedala uskutočniť ani kvasničnou ani cicavčou alkoholdehydrogenázou, i keď sa tento enzým uplatňuje pri oxidácii primárne alkoholické skupiny lokalizovanej v molekule ochratoxínu.

Penicillium stipitatum Thom produkuje metabolity v závislosti na zložení kultivačného média. Na médiu s obsahom sacharózy tvorila kultúra predovšetkým metabolity tropolónovej štruktúry: kyselinu stipitátovú (I) a kyselinu stipitátónovú (II) [4]. V prítomnosti glukózy tvorila nízkomolekulárne metabolity — cystostipín [5] a duklauxín [6]. Významne ovplyvnil produkciu metabolitu uhlíkatý substrát. V prítomnosti glukózy kultúra biosyntetizovala duklauxín, glycerín podmienil vznik metabolitu 2-a.

Ak sa použila kombinácia glukózy a peptónu (miesto dusičnanu sodného), tvorilo *P. stipitatum* iba cystostipín. Pri biosyntéze kyseliny stipitátovej (I) a kyseliny stipitátónovej (II) boli dokázané nasledujúce vzťahy. Na médiu s obsahom glukózy a $NaNO_3$ sa tvorila I:II v pomere 2:1, v celkovej koncentrácii 378 μg na ml, pri zámene sacharózy za glukózu sa pomer I:II upravil na 1:1 a celková produkcia stúpila na 1460 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Ak sa k médiu s obsahom sacharózy a $NaNO_3$ pridá 0,75 % CSL (kukurličného výluhu) pomer I:II sa zmení na 1:2 a celková produkcia dosiahne 3450 $\mu g \cdot ml^{-1}$. Ďalšie vzťahy sú uvedené v tab. 1. Kyselina stipitátová sa tvorí dekarboxyláciou z kyseliny stipitátónovej. Ak sa v experimentoch použilo mycélium *P. stipitatum* pripravené na médiu so sacharózou, CSL a $NaNO_3$ dekarboxyluje v priebehu 6 hodín približne 60 % II na I. U mycélia, pripraveného na médiu bez CSL sa zníži jeho dekarboxylačná schopnosť o 35 %, v prítomnosti kobaltu (10^{-3} mol) až o 50 %. Týmto možno vysvetliť, že prídavok iónu Co do kultivačného média zvýšil celkovú produkciu tropolónov (+II), ale v prospech II, ktorá sa v prítomnosti Co dekarboxyluje na nižšiu rýchlosťou.

Tabuľka 1. Biosyntéza kyseliny stipitátovej (I) a stipitátónovej (II) kultúrou *P. stipitatum* [4] v závislosti na zložení kultivačného média

Základné zložky média	I	Produkcia I a II ($\mu g \cdot ml^{-1}$)		
		II	I+II	I:II
G + $NaNO_3$	260	127	387	2:1
S + $NaNO_3$	850	610	1460	1:1
S + $NaNO_3$ + CSL	1100	2350	3450	1:2
S + CSL	100	86	186	1:1
S + $NaNO_3$ + CO	1500	2100	3600	1:1,3

S = sacharóza, G = glukóza, CSL = kukuričný výluh

Gibberella fujikuroi biosyntetizuje dva typy biologicky aktívnych metabolitov: gibberelíny [7] a bikaverín [8]. Gibberelíny A_1 a A_3 (GA_1 a GA_3) sú známe, vysokoúčinné rastové stimulatory vyšších rastlín, bikaverín je účinný inhibitor energetického metabolizmu nádorových buniek. Produkcia gibberelínov je závislá na kvalite zdroja uhlíka a dusíka a na ich vzájomnom pomere. Ak je v médiu NH_4Cl ,

Tabuľka 2. Vplyv sójovej múky a jej zložiek na produkciu giberelínov kultúrou *Gibberella fujikuroi* [7]

Zdroj N-látok	Produkcia giberelínov ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)		
	GA ₁	GA ₃	Spolu
Sójová múka	258	272	530
Frakcia I	120	142	262
Frakcia II	145	155	300
Frakcia III	0	600	600

Frakcia I-III sú zbytky sójovej múky po jej vyluhovaní vodou. Frakcia I pri pH 1-1,5, frakcia II pri pH 6,8-7,1, frakcia III pri pH 11,5-12,0. Celkový obsah N-látok sa v médiu nemenil.

NH₄NO₃, KNO₃ alebo kostná múka, biosyntetizuje uvedená kultúra giberelíny, ale nie bikaveríny. GA₁ a GA₃ syntetizuje kultúra najčastejšie spoločne, výnimku tvorí kultivácia na médiu s obsahom kvasničného extraktu, kde sa tvorí iba GA₃. Vysoká produkcia oboch giberelínov sa dosiahne na médiu s obsahom sójovej múky, pričom pomer oboch metabolitov je približne 1:1. Ak sa zo sójovej múky odstráni niektoré jej zložky, tvorí sa iba GA₃ vo vysokej koncentrácii (tab. 2). Podľa dosiahnutých výsledkov možno predpokladať, že sójová múka ako zdroj dusíkatých látok obsahuje i látku, ktorá podmieňuje biosyntézu GA₁.

Výsledky dosiahnuté v našich experimentoch ukazujú na konkrétnych príkladoch, ako možno vhodnou biotechnológiou ovplyvniť kvalitatívne i kvantitatívne produkciu sekundárnych metabolitov.

Literatúra

- [1] FUSKA, J., NEMEC, P., KUHR, I.: J. Antibiotics, **25**, 1972, s. 208—211.
- [2] FUSKA, J., NEMEC, P., FUSKOVÁ, A.: J. Antibiotics, **32**, 1979, s. 667—670.
- [3] FUSKA, J., FUSKOVÁ, A., NEMEC, P.: Biológia (Bratislava), **31**, 1979, s. 735—739.
- [4] FUSKA, J., SLÁVIKOVÁ, E., ADAMKOVÁ, M.: Biológia (Bratislava), **30**, 1975, s. 669—676.
- [5] FUSKA, J., KUHR, I., NEMEC, P., FUSKOVÁ, A.: J. Antibiotics, **27**, 1974, s. 123—127.
- [6] KUHR, I., FUSKA, J., SEDMERA P., PODOJIL, M., VOKOUN, J., VANĚK, Z.: J. Antibiotics, **26**, 1973, s. 535—538.
- [7] FUSKA, J., KUHR, I., ZAJÍČEK, J.: Mikrobiologia [ZSSR], **33**, 1964, s. 783—786.

- [8] BALAN, J., FUSKA, J., KUHR, I., KUHRVÁ, V.: Folia microbiol., **15**, 1970, s. 479—483.

Fusková, A. - Fuska, J. - Šturdíková, M. - Augustin, J.: Vplyv kvality substrátov na produkciu sekundárnych metabolitov u niektorých húb. Kvas. prům., **31**, 1985, č. 10, s. 242—243.

Biosyntézu sekundárnych metabolitov húb možno usmerniť tiež použitým zdrojom uhlíka alebo dusíka. Biosyntézu vermikulínu a vermistatínu u *P. vermiculatum*, palitantínu a frekventínu u *P. frequentans* a tropolónu u *P. stipitatum* regulujú uhľikaté zdroje. Biosyntéza giberelínov a bikaverínov u *Gibberella fujikuroi*, duklauxínu a cytostipínu u *P. stipitatum* je ovplyvnená použitými dusíkatými substrátmi.

Фускова, А. — Фуска, И. — Штурдикова, М. — Аугустин, И.: Влияние качества субстратов на производство вторичных метаболитов у некоторых грибов. Квас. прум. **31**, 1985, № 10, стр. 242—243.

Биосинтез вторичных метаболитов грибов можно направлять также использованным источником углерода и азота. Биосинтез вермикулина и вермистатина у *P. vermiculatum*, палитантина и фреквентина у *P. frequentans* и также трополонов у *P. stipitatum* можно направлять и источниками углерода. Азотистые субстраты оказывают влияние на биосинтез гиберелинов и бикаверинов у *Gibberella fujikuroi*, дуклаксина и цитостипина у *P. stipitatum*.

Fusková, A. - Fuska, J. - Šturdíková, M. - Augustin, J.: The influence of the substrates on the production of secondary metabolites by some fungi. Kvas. prům. **31**, 1985, No. 10, pp. 242—243.

Biosynthesis of secondary metabolites can be also regulated by the used carbon as well as nitrogen source. Biosynthesis of vermiculin and vermistatin by *P. vermiculatum*, palitantin and frequentin by *P. frequentans* as well as the tropolones by *P. stipitatum* can be regulated by the carbon sources. The production of giberelins and bikaverins by *Gibberella fujikuroi*, as well as duklauxin and cytostipin by *P. stipitatum* can be influenced by the nitrogen substrates.

Fusková, A. - Fuska, J. - Šturdíková, M. - Augustin, J.: Einfluß der Substratenqualität auf die Produktion der sekundären Metaboliten bei einigen Pilzen. Kvas. prům. **31**, 1985, Nr. 10, S. 242—243.

Mann kan die Biosynthese der sekundären Metaboliten bis zum gewissen Maße durch gebrauchte Kohlenstoff- und Stickstoffquellen lenken. Die Biosynthese des Vermikulins und Vermistatins bei *P. vermiculatum*, Palitantin und Frequentin bei *P. frequentans* und Tropolon bei *P. stipitatum* wird durch Kohlenstoffquellen reguliert. Die Biosynthese der Gibereline und Bikaverine bei *Gibberella fujikuroi*, Duklauxin und Cytostipin bei *P. stipitatum* ist von gebrauchten Stickstoffsubstraten beeinflusst.