

REFERÁTY

VÝZNAM AMINOKYSELÍN PRE BIOSYNTÉZU PENICILÍNU

VLADIMÍR BETINA

Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Slovenskej vysokej školy technickej
v Bratislave

Fermentačná výroba antibiotík popri dôležitých technických problémoch otvorila nový úsek fyziologického a biochemického štúdia mikroorganizmov. Z chemického hľadiska antibiotiká tvoria veľmi rôznorodú skupinu zlúčenín, ktoré vznikajú syntetickou činnosťou niektorých mikroorganizmov. V porovnaní s fermentačnou výrobou látok, ktoré sú produktmi disimilácie cukrov (organické kyseliny, alkohol a i.), otázky štúdia biosyntézy antibiotík sú oveľa zložitejšie. Penicilín a jeho produkčné kmene sú pravdepodobne najlepšie preštudované, avšak o mechanizme biosyntézy tohto antibiotika sa dnes vie ešte veľmi málo.

V tomto referáte sa chceme dotknúť niektorých otázok metabolizmu aminokyselín, ktoré zdá sa, majú v biosyntéze penicilínu kľúčové postavenie. Zhrnujeme v ňom najdôležitejšie výsledky domácich a zahraničných autorov, ktorí sa zaoberali touto problematikou. Spracovaný materiál je rozdelený do dvoch častí:

1. metabolizmus aminokyselín počas fermentácie,
2. úlohy niektorých aminokyselín v biosyntéze penicilínu.

Metabolizmus aminokyselín počas fermentácie

Biochemické pochody počas fermentácie sa rozdeľujú do troch fáz [3, 5, 10]:

- a) pochody súvisiace s rastom mycélia,
- b) biosyntéza penicilínu,
- c) autolýza mycélia.

Ako uvidíme ďalej, v premenách aminokyselín počas jednotlivých fáz v kultivačnom prostredí, ako aj v mycéliu sú kvantitatívne rozdiely.

Najpoužívanejšou natívnou živinou pre prípravu fermentačných pôd je kukuričný extrakt (corn steep), ktorý je bohatým zdrojom aminokyselín. P y l e [22] porovnával obsah voľných aminokyselín v mnohých vzorkách kukuričného extraktu a vo všetkých zistil 11 aminokyselín:

vysoký obsah: glykokol, alanín, valín, leucín;
menej: lyzín, tryptofán, prolín, kyselina asparágová, kyselina glutamová;
najmenej: arginín a histidín.

Počas fermentácie sledoval prítomnosť vymenovaných aminokyselín v pôde a v mycéliu. Na začiatku boli v pôde všetky prítomné, ale do 48. hodiny fermentácie ich takmer úplne spotrebovalo rastúce mycélium. Všetkých 11 aminokyselín z kukuričného extraktu a glutamín našiel v mycéliu, kde ich obsah bol najvyšší medzi 48. až 72. hodinou fermentácie, potom sa však znižoval. Pri paralelnej kultivácii *P. chrysogenum* v syntetickej pôde, ktorá obsahovala dusičnan amónny ako jediný zdroj dusíka, zistil v mycéliu tie isté aminokyseliny ako pri kultivácii v pôde s obsahom kukuričného výluhu a ako vo vzorkách kukuričného výluhu. Kladný význam tejto suroviny pre produkciu penicilínu vidí okrem iného v obsahu aminokyselín, ktorý sa zhoduje s ich obsahom v mycéliu produkčného mikroorganizmu.

V Indii používajú hydrolyzáty zámostkov hodvábnika ako zdroj aminokyselín do fermentačnej pôdy pre produkciu penicilínu. Hydrolyzáty obsahujú okrem iného serín a leucylprolín, ktoré sa nachádzajú aj v autolyzátoch mycélia *P. chrysogenum* [21].

U nás N e m e c a spolupracovníci [19] navrhli používať do fermentačných pôd pre penicilín FEOL (fermentovaný extrakt pšeničných otrúb a olejnatých semien), ktorý sa svojím zložením podobá kukuričnému extraktu a vyrovná sa mu aj vo výťažnosti penicilínu. FEOL obsahuje tie isté aminokyseliny ako kukuričný extrakt s rozdielom v cysteíne a v prolíne.

B e t i n a a V e l i k ý [6] upozornili na doplnkový zdroj aminokyselín pre fermentáciu penicilínu v podobe hydrolyzátu peria „Peramín“ [29], ktorý obsahuje veľa sírnych aminokyselín. Pri kombinácii Peramínu s FEOL dosiahli zvýšenú produkciu penicilínu kmeňom *P. chrysogenum* Q 176. V prípade produkčného kmeňa *Wis 51-20* však nepozorovali vyššiu produkciu v porovnaní s kontrolnou fermentačnou pôdou, ktorá obsahovala FEOL bez Peramínu. Podľa H e r o l d a [11] príčina rozdielnych výsledkov by mohla byť v tom, že pôda pre kmeň *Wis 51-20*, na rozdiel od pôdy pre kmeň Q 176, obsahuje aj síran sodný, ktorý môže vykompenzovať nižší obsah sírnych aminokyselín vo FEOL a stimulačný účinok Peramínu pozorovaný pri kmeni Q 176 sa neprejaví.

Z e l e n k a a spolupracovníci [32] udávajú, že zahustená hľuzová zemiaková voda po predchádzajúcom dokvasení pomocou kultúry laktobacila dávala pri fermentácii v tankoch 100—120 % výťažky penicilínu v porovnaní s kukuričným extraktom.

Štúdiu voľných aminokyselín v kultivačnej pôde a v mycéliu pri kultivácii rôznych kmeňov *P. chrysogenum* v syntetickom prostredí sa venovali viacerí autori.

J a r v i s a J o h n s o n [15] ako prví zistili pri kultivácii kmeňa Q 176 v syntetickej pôde už po 24 hodinách organické dusíkaté zlúčeniny.

R a e o a V e n k a t a r a m a n [23] študovali syntézu aminokyselín kmeňom Q 176 v chemicky definovanej pôde a našli voľné aminokyseliny v pôde a v mycéliu po 24. hodine kultivácie. V prvej fáze fermentácie prebiehala rýchla syntéza aminokyselín, ktoré sa hromadili v prostredí (kyselina glutamová, alanín, prolín, leucín, valín, tyrozín). V druhej fáze nastalo úplné odčerpanie aminokyselín z pôdy, ale v obsahu voľných aminokyselín v mycéliu nepozorovali zmeny. V mycéliu našli kyselinu glutamovú, alanín, histidín, cysteín, menej prolínu, valínu, leucínu a tyrozínu. V konešom štádiu sa v dôsledku autolýzy aminokyseliny objavili v pôde znova. Autori poukazujú na pravdepodobnú súvislosť medzi spotrebou aminokyselín a biosyntézou penicilínu.

M e l n i k o v o v á a S u r i k o v o v á [17] potvrdili údaje starších prác o vylučovaní voľných aminokyselín do kultivačnej pôdy v prípade anorganického zdroja dusíka. Porovnávali tvorbu aminokyselín kultúrami *P. chrysogenum* a *P. jancevskii*, ktoré neprodukuje penicilín. Kým *P. chrysogenum* vylučovalo voľné aminokyseliny do pôdy už v ranej etape vývinu, u *P. jancevskii* sa dokázali len počas autolýzy. Autorky zdôrazňujú veľký význam aminokyselín pre biosyntézu penicilínu.

W o l f [30] sledoval schopnosť mycélia *P. chrysogenum* Q 176 oxydovať aminokyseliny vo fáze biosyntézy penicilínu a udáva, že mycélium oxydovalo 23 rôznych aminokyselín. Vyslovil tiež náhľad, že je úzka súvislosť medzi hromadením aminokyselín v mycéliu a tvorbou penicilínu.

Z autolyzátu mycélia *P. chrysogenum* izoloval Y o k a j a m a [31] 12 aminokyselín, na ktoré pripadalo 28,46 % celkového dusíka. Ich kvantitatívne poradie bolo: kyselina glutamová, lyzín, arginín, kyselina asparágová, histidín, prolín, tyrozín, valín, alanín, fenylalanín, leucín a glykokol.

Na základe citovaných údajov o prítomnosti voľných aminokyselín v syntetických pôdach s anorganickým zdrojom dusíka počas kultivácie kmeňov *P. chrysogenum* mô-

žeme ich metabolizmus v jednotlivých fázach fermentácie charakterizovať takto: V prvej fáze fermentácie, v ktorej rýchlo pribúda mycélium, objavujú sa voľné aminokyseliny v pôde už v skorých štádiách a ich obsah vzrastá s pokračovaním tejto fázy, až ku jej koncu začínajú ubúdať z pôdy. V druhej fáze fermentácie (biosyntéza penicilínu) sa voľné aminokyseliny odčerpávajú z pôdy takmer úplne. V tretej fáze (autolýza) objavujú sa aminokyseliny znova v kultivačnom prostredí.

Vo fermentačných pôdach s kukuričným extraktom sú pomery odlišné. Aminokyseliny z extraktu ako jediný zdroj dusíka sa metabolizujú prednostne a do pôdy sa uvoľňuje amoniak vznikajúci ich dezamináciou. Produkcia penicilínu nastáva v čase, keď prakticky všetky aminokyseliny z prostredia sa už spotrebovali. V produkčnej fáze je zdrojom dusíka amoniak uvoľnený vo fáze rastu mycélia. Autolýzou sa aminokyseliny znova dostávajú do prostredia, vo výrobných podmienkach sa však fermentácia zastavuje ešte pred autolýzou, aby sa zabránilo stratám penicilínu [10].

Údaje o organických formách dusíka v mycéliu, medzi nimi aj o aminokyselinách, zhrnul P f e n n i g [20] takto:

a) vylučovanie organického dusíka vzhľadom na sušinu mycélia je najvyššie v prvej fáze, v strednej fáze klesne na minimum a ku koncu kultivácie rozpadom mycélia znova prudko stúpa;

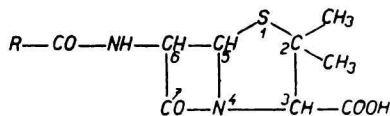
b) množstvo voľných aminokyselín v mycéliu stúpa počas prvej fázy, začiatkom strednej fázy dosiahne maximum a potom až do konca kultivácie pomaly klesá.

Z uvedeného vyplýva oprávnenosť náhľadu väčšiny citovaných autorov, že medzi obsahom voľných aminokyselín v mycéliu a biosyntézou penicilínu je blízka súvislosť. Maximum aminokyselín v mycéliu sa dosahuje práve v čase, keď nastáva prudký vzostup v uvoľňovaní penicilínu z mycélia do prostredia (druhá fáza fermentácie).

O priamej účasti niektorých aminokyselín na biosyntéze antibiotika a o ich začlenení do molekuly penicilínu sa hovorí v druhej časti referátu.

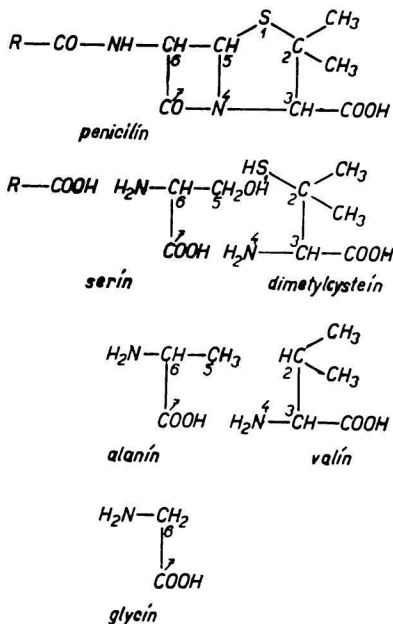
Úlohy niektorých aminokyselín v biosyntéze penicilínu

Označenie „penicilín“ sa používa pre rad zlúčenín, ktoré obsahujú systém β -laktámového a tiazolidínového kruhu s rôznymi bočnými radikálmi:



Poznanie štruktúry penicilínu umožnilo pátrať po mechanizme jeho biosyntézy. Mnohí autori študovali vznik bočných radikálov, ako aj pôvod β -laktámového a tiazolidínového kruhu. Obyčajne sa vychádzalo z látok, ktoré svojou štruktúrou sú zhodné s niektorou časťou molekuly penicilínu, a predpokladalo sa o nich, že by mohli byť prekursorami príslušnej časti molekuly antibiotika. Veľkú väčšinu preskúšaných zlúčenín tvoria práve aminokyseliny alebo ich deriváty.

P r a t t a D u f r e n o y [21] zostavili nižšie uvedenú schému, ktorá naznačuje teoretické možnosti biosyntézy (čítané zdola nahor) alebo rozkladu penicilínu. Ako uvidíme ďalej, ich predpoklady boli v mnohom správne. (Schému upravil autor referátu.)



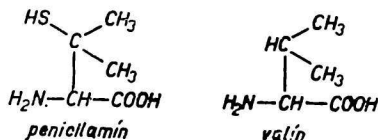
Obširny prehľad prác, venovaných otázkam biosyntézy penicilínu pred rokom 1956, podávajú Arnstein a Grant [3]. V ďalšom sa opierame predovšetkým o ich prehľad a dopĺňame ho niektorými novšie publikovanými výsledkami.

Spomenuli sme už priaznivý účinok kukuričného extraktu na produkciu penicilínu. Dávnejšie je známe, že kukuričný extrakt obsahuje niektoré deriváty kyseliny fenylactovej, napr. fenylalanín [10], ktoré sú prekurzormi benzylpenicilínu; poskytujú totiž benzylový radikál pre jeho biosyntézu. Dôkazy o tom, že deriváty kyseliny fenylactovej stimulujú produkciu benzylpenicilínu, máme nielen zo štúdia s rádioaktívnymi izotopmi v týchto zlúčeninách, ale aj z priemyselnej výroby penicilínu, kde sa spomenuté prekurzory bežne používajú do fermentačných pôd. Z aminokyselín prítomných v kukuričnom extrakte je to teda najmä fenylalanín, ktorý sa zúčastňuje biosyntézy penicilínu.

Zložitejšie sú otázky vzniku tiazolidínového a β -laktámového kruhu. Kým o pôvode bočného radikálu benzylpenicilínu z derivátov kyseliny fenylactovej máme jednoznačne zhodné dôkazy, o pôvode vnútornej časti molekuly penicilínu jestvujú aj protichodné údaje. Príčinou toho môžu byť jednak rozdielne produkčné kmene *P. chrysogenum*, ktoré použili jednotliví autori, jednak nerovnaká metodika.

Pridanie cystínu, cysteínu a D- β -hydroxyvalínu do fermentačnej pôdy nezvýšilo výťažky penicilínu, hoci sa predpokladalo, že tieto aminokyseliny môžu byť donátormi atómu síry pre tiazolidínový kruh [12]. Avšak pri použití L-cystínu, cysteínu a niektorých jeho derivátov, ktoré obsahovali ^{35}S , Stevens a spolupracovníci [25, 26] dokázali prednostné včlenenie ^{35}S z týchto zlúčenín do molekuly penicilínu pred ^{35}S zo síranu sodného. Pôvod síry v tiazolidínovom kruhu z cysteínu potvrdili neskoršie aj iní autori a dnes sa cysteín všeobecne považuje za donátor síry [3]. Ďalej uvedieme ešte iné dôkazy o včlenení cysteínu do molekuly penicilínu.

Ďalšie atómy v molekule penicilínu podľa vyššie naznačeného číslovania spolu so sírou patria k penicilamínovej časti molekuly. Dnes je v literatúre už veľa dôkazov o tom, že uhlíková kostra penicilamínu pochádza z valínu:

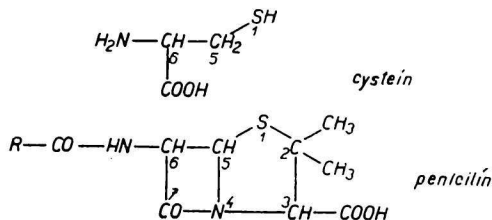


Pôvod uhlíkov C_2 a C_3 z valínu potvrdili Arnstein a Grant [1]. Stevens a spolupracovníci [3] dokázali, že $-\text{COOH}$ skupina na C_3 bola z $-\text{COOH}$ skupiny D,L-valínu. Otázka, či na biosyntéze penicilamínovej časti molekuly sa zúčastňuje L-valín alebo D-valín, nebola zodpovedaná rovnako. Hoci atóm C_3 má D-konfiguráciu, udávalo sa, že D-valín nie je prekursorom [2, 8, 28], ale inhibítorom [8] biosyntézy a do penicilínu sa včleňuje iba uhlíková kostra L-valínu [8, 28]. Najnovšie však Arnstein a spolupracovníci uvádzajú, že pozorovali aj včlenenie D-valínu do penicilínu, ale v značne menšej miere než v prípade L-valínu, pretože mycélium prijíma D-valín pomalšie než L-valín. Včlenenie oboch stereoizomérov do penicilínu je však rovnaké, ak sa vzťahujú na množstvo valínu prijatého mycéliom [4].

O atónoch C_2 a C_3 môžeme teda povedať, že pochádzajú z valínu, ktorý sa asi dezaminuje, a pred včlenením do molekuly penicilínu nastane v prípade L-valínu presun na D-konfiguráciu [3].

Pôvod atómu N_1 v penicilíne je zatiaľ neznámy. V najnovšej práci Arnsteina a spolupracovníkov [4] sa hovorí, že ^{15}N z L-valínu sa dostal do polohy N_1 vo veľmi malej miere; viacej ho našli v bočnom radikáli.

Arnstein a Grant [1] zistili, že atómy uhlíka v molekule penicilínu označené ako C_5 a C_6 pochádzali z cystínu alebo z cysteínu, z ktorého bol aj atóm dusíka v bočnom reťazci. Vyslovili náhľad, že L-cystín je prekursorom penicilínu pravdepodobne po redukcii na cysteín [3]. Ak berieme do úvahy vyššie citované údaje o pôvode atómu síry z cysteínu, môžeme si štruktúrne predpoklady pre včlenenie cysteínu do molekuly penicilínu znázorniť takto:



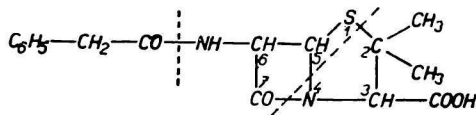
O pôvode atómu C_7 v β -laktámovom kruhu nemáme zatiaľ v literatúre priame dôkazy. Arnstein a spolupracovníci [4] predpokladajú, že by mohol pochádzať z karboxylovej skupiny cysteínu, ako to znázorňuje aj predchádzajúca schéma.

Na sympóziu o antibiotikách v Moskve v júni 1957 referoval Levitov [16] o zvýšenej produkcii penicilínu účinkom leucínu, alanínu a metionínu. Účasť metionínu na biosyntéze potvrdila ^{35}S .

Zhrnutím doteraz citovaných údajov o účasti aminokyselín pri biosyntéze penicilínu dochádzame k tomuto uzáveru:

- fenylalanín a iné deriváty kyseliny fenylactovej sú prekurzormi bočného radikálu;
- cysteín je prekurzorom síry v tiazolidínovom kruhu, uhlíkových atómov C₅, C₆ a pravdepodobne i C₇ v β-laktámovom kruhu, ako aj atómu dusíka v bočnom reťazci;
- valín je donátorom uhlíkových atómov penicilamínu, pôvod dusíka v penicilamíne nie je ešte jasný.

Molekulu penicilínu môžeme potom medzi jednotlivé prekurzory „rozdeliť“ takto [4]:



Spomenuté aminokyseliny môžeme považovať za priame prekurzory penicilínu. Predpoklady o jeho vzniku, ktoré naznačili Pratt a Dufrenoy [21], boli do značnej miery oprávnené. Potvrdilo sa včlenenie valínu do penicilamínu. Aj predpoklad o vzniku β-laktámového kruhu súhlasí s neskoršími experimentálnymi výsledkami. Rádioaktívny uhlík z glycínu a serínu sa dostal do molekuly penicilínu ako C₅ a C₆ [1], z čoho sa usudzuje na mechanizmus: glycín→serín→cystín→penicilín [3].

Žiada sa spomenúť predstavy o biosyntéze penicilínu v úplne syntetickom prostredí. V citovanom prehľade [3] je zmienka o postupe síry z anorganického síranu až do tiazolidínového kruhu. Predpokladá sa mechanizmus: síran→neznáme medzi produkty → metionín→cystín→penicilín [3]. Pozitívny účinok na produkciu penicilínu má aj prídavok tiosíranu do fermentačných pôd [32].

Mechanizmus biosyntézy penicilínu z prekurzorov nie je ešte známy. Arnstein a spolupracovníci [4] diskutujú o mechanizme: L-valín→L-cysteinylyl-L-valín→L-cysteinylyl-D-valín→penicilín. Derivát cysteinylylvalínu N-fenylacetyl-L-cysteinylyl-D-valín pripravený synteticky mal slabé antibiotické účinky v kombinácii s benzylpenicilínom [13]. Uvedený náhľad na mechanizmus biosyntézy sa opiera aj o iné experimentálne dosiahnuté podklady, ktoré sú prehľadne zhrnuté v prácach [3, 4].

Zo spomínaných dôkazov a predpokladov o včlenení niektorých aminokyselín do molekuly penicilínu by sa mohlo zdať, že sa zamlčujú možnosti premien voľných aminokyselín aj na iné zlúčeniny. Zdôrazňovanie len vzniku penicilínu z aminokyselín skutočne vytrhuje a zdôrazňuje iba jednu stránku komplexu metabolických pochodov; je však viacmenej nevyhnutný, ak má vyniknúť sledovaný cieľ: ukázať na dôležitosť niektorých látok v mechanizme biosyntézy. Aminokyseliny sa isto spotrebúvajú aj v iných procesoch, pretože penicilín je len jeden z produktov metabolizmu. Tohto problému sa čiastočne dotýka aj najnovšia práca Melnikovej a spolupracovníkov [18], no nevyčerpáva ho dostatočne.

Jestvuje veľa otázok súvisiacich s naznačenou problematikou, ktoré dnes ešte nevieme zodpovedať. Avšak z doterajšieho štúdia metabolizmu aminokyselín u producentov penicilínu vyplýva zreteľný uzáver, že niektoré z nich majú v biosyntéze penicilínu kľúčové postavenie.

LITERATÚRA

- Arnstein H. R. V., Grant P. T., Biochem. J. 57, 353, 360 (1954). — 2. Arnstein H. R. V., Clubb M. E., Biochem. J. 60, xxxiv (1955). — 3. Arnstein H. R. V., Grant P. T., Bact. Revs. 20, 133 (1956). — 4. Arnstein H. R.

- V., Clubb M. E., *Biochem. J.* **65**, 618 (1957). — 5. Bekker E. E. a spol., *Antibiotiki I*, **40** (1956). — 6. Betina V., Veliký I., *Biológia* **12**, 377 (1957). — 7. Brit. patent 750 185 (1952). — 8. Demain A. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **64**, 74 (1956). — 9. Gordon M., Pan S. C., Virgona A., Numeroff P., *Science* **118**, 43 (1953). — 10. Herold M., *Antibiotika*, Praha 1953.
11. Herold M., Recenzia práce [6]. — 12. Hockenhull D. J. D., Ramachandran K., Walker T. K., *Arch. Biochem. Biophys.* **23**, 160 (1949). — 13. Holly F. W., Peel E. W., Luz E. L., Folkers K., *J. am. chem. Soc.* **74**, 4539 (1952). — 14. Horowitz N. H., *J. biol. Chem.* **171**, 255 (1947). — 15. Jarvis F. G., Johnson M. J., *J. am. chem. Soc.* **69**, 3010 (1947). — 16. Levitov M. M., *Sympóziium o antibiotikách*, Moskva, jún 1957. — 17. Melnikova A. A., Surikova E. I., *Mikrobiologija* **25**, 261 (1956). — 18. Melnikova A. A., Surikova E. I., *Mikrobiologija* **26**, 35 (1957). — 19. Nemeč P., Šatura D., Ebringer L., Balan J., Závěrečná zpráva Laboratória technickej mikrobiológie SAV, 1956. — 20. Pfennig N., *Arch. Mikrobiol.* **25**, 109 (1956).
21. Pratt R., Dufrenoy D., *Antibiotics*, London 1953. — 22. Pyle A., *J. Gen. Microbiol.* **11**, 191 (1954). — 23. Rao P. L. N., Venkataraman R., *Experientia* **8**, 350 (1952). — 24. Sebek O. K., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **84**, 170 (1953). — 25. Stevens C. M., Vohra P., Inamine E., Roholt O. A., *J. biol. Chem.* **205**, 1001 (1953). — 26. Stevens C. M., Vohra P., Moore J. E., DeLong Ch. W., *J. biol. Chem.* **210**, 713 (1954). — 27. Stevens C. M., Vohra P., DeLong Ch. W., *J. biol. Chem.* **211**, 297 (1954). — 28. Stevens C. M., Inamine E., DeLong Ch. W., *J. biol. Chem.* **219**, 405 (1956). — 29. Veliký I., Kossacká A., I. vedecká konferencia Chemickej fakulty, Bratislava 1956. — 30. Wolf F., *Arch. Biochem. Biophys.* **16**, 143 (1948).
31. Yokajama V., *J. Antib.* **4**, 95 (1951). — 32. Zelenka S. a spolupracovníci, Čs. patent, prihl. č. PV-1952/57.