

BIOSINTESIS METABOLIT

Tujuan Instruksional Khusus :

- Mahasiswa dapat menjelaskan manipulasi keteraturan metabolisme mikrobia untuk biosintesis metabolit

Elisa Julianti - THP-FP USU

METABOLISME

- Adalah semua reaksi kimiawi yang dilakukan oleh sel yang menghasilkan energi dan yang menggunakan energi untuk sintesis komponen-komponen sel atau untuk kegiatan-kegiatan seluler seperti pergerakan.
- Reaksi kimiawi yang membebaskan energi melalui perombakan nutrien = disimilasi/kegiatan katabolik
- Reaksi kimiawi yang menggunakan energi untuk sintesis dan fungsi sel lain = asimilasi/anabolik

Elisa Julianti - THP-FP USU

BIOSINTESIS METABOLIT

Elisa Julianti - THP-FP USU

I. BIOSINTESIS METABOLIT PRIMER

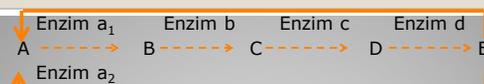
- Metabolit primer : persenyawaan-persenyawaan yang merupakan produk akhir atau produk antara yang dihasilkan dari proses metabolisme sel, mempunyai berat molekul rendah, sebagai penyusun molekul yang lebih besar atau dikonversi menjadi koenzim.
- Contoh : asam organik, nukleotida dan vitamin
- Tidak diproduksi secara berlebih karena pada sebagian mikrobia dapat menghambat pertumbuhan dan kadang-kadang mematikan
- Mikrobia yang dapat hidup pada kondisi produksi metabolit primer berlebih, potensial dikembangkan sebagai galur dengan produktivitas tinggi.

Elisa Julianti - THP-FP USU

1. Metabolit Primer Yang Merupakan Produk Antara

- Pada jalur reaksi metabolik sederhana yang tidak bercabang, produk akhir pada tingkat konsentrasi tertentu bertindak sebagai penghambat pada rangkaian reaksi.
- Dengan membatasi sintesis produk akhir, maka produk antara akan terakumulasi (Gambar 1).

Elisa Julianti - THP-FP USU



Gambar 1. Produksi senyawa antara yang berlebihan pada jalur reaksi sederhana yang tidak bercabang

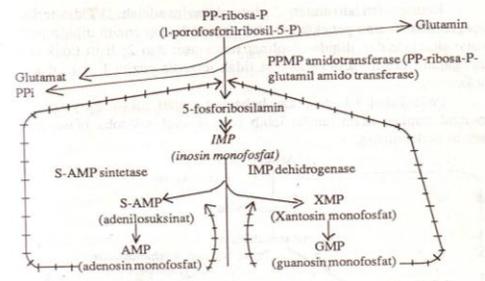
- Pada tingkat konsentrasi tertentu, produk akhir E menghambat kerja enzim a_1 dan a_2 yang mengkatalis senyawa A menjadi B. Senyawa C dapat diproduksi lebih banyak jika tidak diubah menjadi D. Pada *mutan auksotrop*, enzim c tersedia dalam jumlah yang sedikit sehingga tidak cukup untuk mengubah C menjadi D. Bila ke dalam media ditambahkan senyawa E pada tingkat konsentrasi suboptimum (di bawah konsentrasi yang bisa menimbulkan efek penghambatan umpan balik), maka mikrobia tersebut dapat tetap hidup dan C diproduksi berlebih.

Mutan auksotrop = mutan yang tidak menghasilkan metabolit atau menghasilkan dalam jumlah sedikit

Elisa Julianti - THP-FP USU

- Contoh : untuk menghasilkan Inosin Monofosfat (IMP) pada jalur reaksi bercabang dari biosintesis purin oleh mutan auktotrop adenin : *Corynebacterium glutanicum* dan *Brevibacterium ammoniagenes* yang kekurangan enzim S-AMP sintetase 7⇨ Furuya dkk (1968) (Gambar 2)

Elisa Julianti - THP-FP USU



Gambar 2. Senyawa antara IMP pada jalur bercabang yang diproduksi secara berlebihan.

Elisa Julianti - THP-FP USU

- Dari Gambar 2 :

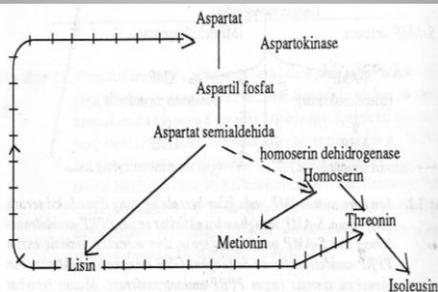
Hasil akhir AMP dan GMP secara kumulatif menghambat aktivitas dan sintesis PPMP amidotransferase. AMP juga menghambat aktivitas S-AMP sintetase, sehingga tidak bisa memproduksi AMP. Tanpa AMP mutan tersebut tidak bisa tumbuh sehingga perlu penambahan AMP dengan konsentrasi sub optimum sehingga mutas dapat tumbuh dan IMP dapat diproduksi secara berlebihan karena hanya sedikit yang dimetabolisir lebih lanjut.

Elisa Julianti - THP-FP USU

2. Metabolit Primer Yang Merupakan Produk Akhir Pada Jalur Reaksi Bercabang

- Pada jalur reaksi bercabang, maka produk akhir dari salah satu cabang dapat diproduksi secara berlebihan jika produksi akhir dari cabang lainnya ditekan.
- Contoh : pada produksi asam amino lisin oleh *C. glutanicum* yang kekurangan homoserin dihidrogenase (Gambar 3).

Elisa Julianti - THP-FP USU



Gambar 3. Fermentasi lisin oleh *C. glutanicum*

Elisa Julianti - THP-FP USU

- Dari Gambar 3 :

Lisin dan threonin secara bersama-sama menghambat aspartokinase. Dengan rekayasa genetika, diperoleh mutan auktotrop yang kekurangan homoserin dehidrogenase sehingga threonin tidak dihasilkan dalam jumlah cukup untuk menghambat enzim aspartokinase. Bila threonin ditambahkan dalam jumlah suboptimal, maka mikrobia tetap tumbuh dan lisin diproduksi dalam jumlah berlebihan : 50 g/liter.

Elisa Julianti - THP-FP USU

Tabel 1. Beberapa mutan auksotrop penghasil asam amino

Produk	Organisme	Kebutuhan Auksotropik	Substrat	Potensi
L-Sitruilin	<i>Bacillus subtilis</i>	Arginin	Glukosa	16
L-Lisin	<i>Corynebacterium</i>	Threonin-Metionin	Glukosa	50
L-Tirosin	<i>Corynebacterium</i>	Fenilalanin	N-Alkana	19
L-Ornitin	<i>Corynebacterium</i>	Arginin	Glukosa	26
L-Fenilalanin	<i>Arthrobacter parafineus</i>	Tirosin	N-Alkana	15
L-Threonin	<i>E.Coli</i>	Lisin, metionin, isoleusin	Glukosa	20
L-Valin	<i>C.glutamicum</i>	Isoleusin	Glukosa	11

Elisa Julianti - THP-FP-USU

Modifikasi Permeabilitas

- Bila permeabilitas sel terhadap suatu metabolit ditingkatkan, selama proses metabolisme, maka metabolit tersebut > diekstresikan keluar sel \Rightarrow [] nya di dalam sel tidak cukup untuk bisa menimbulkan efek penghambatan umpan balik.
- Contoh : pada mutan *C.glutamicum* untuk memproduksi asam glutamat, permeabilitas dikendalikan dengan mengatur konsentrasi biotin.

Elisa Julianti - THP-FP-USU

- Mikrobia untuk fermentasi glutamat membutuhkan biotin untuk pertumbuhannya. Bila biotin tersedia dalam jumlah cukup maka membran sel akan terbentuk sempurna sehingga mempunyai permeabilitas yang rendah terhadap asam glutamat \Rightarrow tidak dapat diekstresikan keluar sel. Jika biotin diberi pada konsentrasi suboptimum, maka pembentukan membran sel kurang sempurna sehingga permeabilitasnya terhadap asam glutamat tinggi \Rightarrow dapat diekstresikan keluar sel.

- Konsentrasi kritis biotin : $0.5\mu\text{g/l}$.

Elisa Julianti - THP-FP-USU

Mutan Yang Resisten Terhadap Pengaturan Umpan Balik

- Penumpukan metabolit primer juga bisa terjadi pada mutan yang tahan terhadap penghambatan umpan balik.
- Cara memperoleh mutan tsb : dengan menumbuhkan suatu populasi mikrobia di dalam medium yang mengandung senyawa analog yang bersifat toksik.
- Senyawa analog : senyawa yang mempunyai sifat penghambatan seperti substrat atau metabolit, tetapi tidak dapat bergabung dan menggantikan senyawa alami dalam proses biosintesa makromolekul.

Elisa Julianti - THP-FP-USU

- Dalam medium yang mengandung senyawa analog, mikrobia yang resisten akan hidup dan yang tidak akan mati.
- Contoh : *Salmonella typhimurium* \Rightarrow tahan terhadap penghambatan aktivitas enzim, dapat mengkonversi glukosa menjadi leusin di atas 50% dan perhitungan teoritis.
- Candida petrophilum* resisten terhadap etionin \Rightarrow dapat menghasilkan metionin 40% lebih tinggi dari sel normal yaitu dari 9 menjadi 13 mg/g sel kering.

Elisa Julianti - THP-FP-USU

Tabel 2. Beberapa mutan yang resisten terhadap senyawa analog

Produk	Mikrobia	Resisten Analog	Substrat	Potensi (g)
L-Arginin	<i>C. Glutamicum</i>	D-Arginin, Arginin, Hidroxamatate	Glukosa	20
L-Histidin	<i>C. Glutamicum</i>	Treazoleamat	Glukosa	8
L-Isoleusin	<i>B. Flavum</i>	Aminohidroksiv alerat O-metilthreonin	Glukosa	15
L-Threonin	<i>B. flavum</i>	Amino-hidroksivalerat	Glukosa	14

Elisa Julianti - THP-FP-USU

II. BIOSINTESIS METABOLIT SEKUNDER

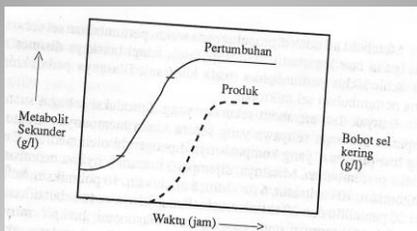
- Metabolit sekunder : hasil metabolisme yang disintesis oleh beberapa mikrobia yang tidak merupakan kebutuhan pokok mikrobia untuk hidup dan tumbuh.
- Contoh : antibiotika, pigmen, vitamin dan steroid
- Dapat berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk bertahan hidup.
- Diproduksi pada akhir siklus pertumbuhan (idiofase)
- Banyak yang diproduksi sebagai campuran beberapa senyawa yang secara kimia mempunyai struktur yang hampir sama, dan komposisinya dipengaruhi oleh medium serta kondisi pertumbuhan.
- Contoh : ada 3 macam senyawa neomisin, 5 mitomisin, 10 basitrasin, 6 tiroksin, 8 aflatoxin, 10 polimiksin, > 20 penisilin dan 2- aktinomisin \Rightarrow dihasilkan oleh mikroba yang secara taksonomi hampir mirip.

Elisa Julianti - THP-FP USU

1. Tropofase dan Idiofase

- Metabolit sekunder diproduksi pada idiofase (fase dengan populasi sel tetap, sel tumbuh=sel mati)
- Pada idiofase mikroba lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti suhu terlalu tinggi atau rendah, radiasi, bahan kimia dan metabolit sekunder yang dihasilkan.
- Hubungan antara pertumbuhan sel dengan produksi metabolit sekunder terlihat pada Gambar 4.

Elisa Julianti - THP-FP USU



Gambar 4. Sintesis metabolit sekunder selama pertumbuhan sel (dimulai pada akhir tropofase/fase logaritmik)

Elisa Julianti - THP-FP USU

- Sintesis metabolit sekunder dimulai pada saat habisnya beberapa zat gizi dalam medium pertumbuhan \Rightarrow karena keterbatasan zat gizi menyebabkan terakumulasinya inducer enzim metabolit sekunder, terlepasnya gen-gen untuk sintesis metabolit sekunder dan represi katabolit.

Elisa Julianti - THP-FP USU

Tabel 3. Beberapa enzim yang muncul pada akhir tropofase, dan enzim tersebut berkaitan dengan sintesis metabolit sekunder

Enzim	Metabolit
Amidinotransferase	Streptomisin
Asiltransferase	Penisilin
Phenylacetate activating enzim	Tilosin
Oksidoreduktase transmetilase	Gramisidin S
Sintetase I dan II	Ergot Alkaloid
Dimetilaliltransferase	Aktinomisin
Fenoksazinon sintetase	Khanoklavin-I-siklase
GTP-8-formilhidrolase	Pirropirimidin Nukleosid

Elisa Julianti - THP-FP USU

2. Peranan Induksi Enzim

- Biosintesis metabolit sekunder berkaitan dengan terjadinya induksi enzim oleh senyawa tertentu yang ditambahkan dari luar atau berasal dari hasil metabolisme sel.
- Beberapa komponen yang dapat memberikan efek induksi enzim pada biosintesis metabolit sekunder.
 - a. Triptofan
 - b. Metionin
 - c. Dietilbarbiturat

Elisa Julianti - THP-FP USU

ad.a. Triptofan

- Berkaitan dengan induksi enzim yang dibutuhkan untuk produksi alkaloid pada *Claviceps*, karena :
 - ✓ Analog triptofan tidak dapat bertindak sebagai prekursor, juga dapat merangsang produksi metabolit sekunder
 - ✓ Harus ditambahkan selama tropofase dan penambahan pada idiofase tidak berpengaruh
 - ✓ Produksi metabolit sekunder tetap tinggi, meski triptofan yang ditambahkan pada tropofase diambil kembali

Elisa Julianti - THP-PP USU

ad.b. Metionin

- Berfungsi sebagai donor sulfur
- Menginduksi pembentukan enzim yang dibutuhkan untuk sintesa cephalosporin.
- Ditambahkan pada tropofase

ad.c. Dietilbarbiturat

- pada sintesis rifanisin oleh *Nocardia mediteranei*

Elisa Julianti - THP-PP USU

Tabel 4. Beberapa prekursor untuk sintesis metabolit sekunder

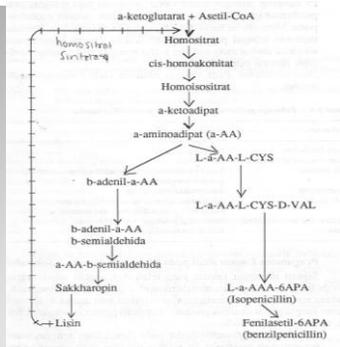
Prekursor	Metabolit Sekunder
Asam Fenilasetat	Penisilin
Asam Benzoat Tersubstitusi	Novobiosin
Unit Isoprena	Senyawa isoprenoid (terpena, ubiquinon, vitamin K, geosmin, sesquiterpena)
Asam Amino	Antibiotika homopeptida
Gula Amino	Antibiotika : tetrasiklin, antrasiklin, antibiotika nukleosida, aminosiklimasin dan makrolida
Sikliton dan Aminosikliton	Antibiotika golongan aminoglikosida
Purin	Kafein dan Theofilin

Elisa Julianti - THP-PP USU

3. Pengaturan Umpan Balik

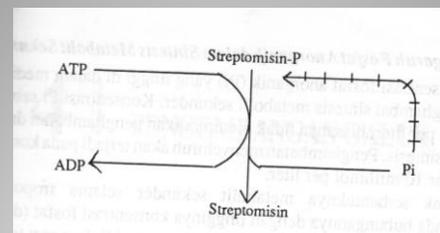
- Contoh :
 - ✓ Sintesis asam 6-metilsalisilat pada *Penicillium urticae* ⇒ penambahan metabolit itu pada idiofase akan menghambat sintesis metabolit itu sendiri.
 - ✓ Sintesis penisilin pada *P. chrysogenum* dihambat oleh L-lisin yang merupakan produk akhir dari cabang lain dari jalur biosintesis penisilin (Gambar 5).
 - ✓ Sintesis streptomisin oleh *Streptomyces griseus* dihambat oleh fosfatase. Biosintesis streptomisin didahului dengan pembentukan streptomisin fosfat yang tidak aktif. Aktifitas enzim yang bekerja untuk pembebasan fosfat dari Streptomisin-P dihambat oleh fosfat yang dibebaskan tersebut → jika fermentasi dilakukan pada media dengan kandungan fosfat tinggi, maka yang dihasilkan adalah Streptomisin-P yang tidak aktif.

Elisa Julianti - THP-PP USU



Gambar 5. Jalur sintesis penisilin (Lisin pada cabang kiri menghambat homositrilat sintetase)

Elisa Julianti - THP-PP USU



Gambar 6. Pada ujung jalur biosintesis streptomisin, fosfat (Pi) dibebaskan dari Streptomisin yang mempunyai keaktifan sebagai antibiotik. Pi yang dibebaskan ini dapat menghambat pembentukan streptomisin aktif.

Elisa Julianti - THP-PP USU

4. Pengaturan Katabolit

- Biosintesis metabolit sekunder dapat dihambat oleh penggunaan nutrisi yang dikonsumsi secara cepat oleh mikrobia
- Contoh :
 - ✓ Pada fermentasi penisilin dengan glukosa sebagai sumber C. Jika digunakan 2 sumber C yaitu glukosa dan laktosa, maka glukosa akan dikonsumsi secara cepat pada tropofase, dan setelah glukosa habis, penekanan (represi) terhadap laktosa hilang, kemudian mikroba memasuki idiofase dan mengonsumsi laktosa secara lambat.

Elisa Julianti - THP-FP-USU

- ✓ Sintesis novobiosin oleh *Streptomyces nives* yang dapat mengonsumsi asam sitrat dan glukosa sebagai sumber C. Bila dalam media terdapat kedua sumber C tersebut, maka yang mula-mula dikonsumsi adalah asam sitrat dan setelah habis, maka mikroba akan memasuki tahap idiofase dengan mengonsumsi glukosa secara lambat.

Elisa Julianti - THP-FP-USU

5. Pengaruh Fosfat Anorganik

- Konsentrasi fosfat anorganik (Pi) yang tinggi dalam medium dapat menghambat sintesis metabolit sekunder
- Konsentrasi Pi 1 milimol/liter tidak menghambat, dan [] 10 mmol akan menghambat
- Selama tropofase metabolit sekunder tidak dihasilkan, karena pada fase tsb [] fosfat tinggi (dalam bentuk ATP), dan pada idiofase [] fosfat menurun.
- [] fosfat yang tinggi dapat menstimulasi pertumbuhan sel sehingga metabolit sekunder tidak terjadi.
- Fosfat anorganik juga dapat menghambat enzim fosfatase yang diperlukan dalam sintesis metabolit sekunder

Elisa Julianti - THP-FP-USU