

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anita BAHOR

**OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE SURFAKTINA Z
MANIPULACIJO SISTEMA ZA ZAZNAVANJE
CELIČNE GOSTOTE TER GOJIŠČA PRI
BAKTERIJI *Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anita BAHOR

**OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE SURFAKTINA Z MANIPULACIJO
SISTEMA ZA ZAZNAVANJE CELIČNE GOSTOTE TER GOJIŠČA
PRI BAKTERIJI *Bacillus subtilis***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**OPTIMIZATION OF SURFACTIN PRODUCTION WITH
MANIPULATION OF QUORUM SENSING SYSTEM AND GROWTH
MEDIUM USING BACTERIUM *Bacillus subtilis***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija.
Delo je bilo opravljeno na Katedri za Mikrobiologijo Oddelka za živilstvo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorja asist. dr. Iztok Dogša in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčić.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: asist. dr. Iztok Dogša
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Kristina Sepčić
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anita Bahor

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 604.2: 661.185 (043.2)
KG	Biosurfaktanti/surfaktin/ <i>Bacillus subtilis</i> /proizvodnja/biosinteza
AV	BAHOR, Anita
SA	MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/DOGŠA, Iztok (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE SURFAKTINA Z MANIPULACIJO SISTEMA ZA ZAZNAVANJE CELIČNE GOSTOTE TER GOJIŠČA PRI BAKTERIJI <i>Bacillus subtilis</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XII, 58, [4] str., 6 pregl., 18 sl., 3 pril., 88 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Surfaktin uvrščamo v skupino lipopeptidnih biosurfaktantov. Sestavljen je iz β -hidroksi maščobne kisline, katera je preko laktonske vezi povezana s peptidom, ki je sestavljen iz sedmih α -amino kislin. Naravni surfaktin proizvajajo sevi bakterije <i>Bacillus subtilis</i> . Encimi za sintezo surfaktina so zapisni na operonu <i>srfA</i> , izražanje tega operona pa je uravnavano s sistemom za zaznavanje celične gostote ali kvorum, ki je kodiran na operonu <i>comQXPA</i> . Surfaktin je kot biosurfaktant zanimiv za industrijsko uporabo, vendar je njegova proizvodnja omejena zaradi nizkih donosov in visokih stroškov proizvodnje, zato se raziskave usmerjajo v razvoj optimalnih pogojev bioprocesa za pridobivanje surfaktina. Glavni namen te naloge je bil izboljšati produkcijo surfaktina pri bakteriji <i>Bacillus subtilis</i> z izbiro ustreznega gojišča, ki omogoča povečano izražanje surfaktina in z manipulacijo sistema za zaznavanje celične gostote. Na podlagi literature smo najprej izbrali primerno gojišče in nato proučevali vpliv peptidnega feromona ComX na sintezo surfaktina. Za detekcijo surfaktina v vzorcih smo uporabili dve metodi: kapljični test in HPLC. Pokazali smo, da a) z izbiro primernega gojišča povečamo produkcijo surfaktina, b) z dodatkom feromona ComX v gojišče dolgoročno ne uspemo povečati sinteze surfaktina in da c) za namen ugotavljanja količine surfaktina v gojišču kapljični test in metoda HPLC zelo dobro korelirata.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDK 604.2: 661.185 (043.2)
CX Biosurfactants/surfactin/*Bacillus subtilis*/production/biosynthesis
AU BAHOR, Anita
AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/ DOGŠA, Iztok (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2016
TI OPTIMIZATION OF SURFACTIN PRODUCTION WITH MANIPULATION OF QUORUM SENSING SYSTEM AND GROWTH MEDIUM USING BACTERIUM *Bacillus subtilis*
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XII, 58, [4] p., 6 tab., 18 fig., 3 ann., 88 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Surfactin is a lipopeptid biosurfactant. It is composed of a β -hydroxy fatty acid linked through the lactonic bond to a peptid composed of seven α -amino acids. Natural surfactin is produced by various *Bacillus subtilis* strains and enzymes responsible for its synthesis are encoded by the srfA operon, which is under the quorum sensing control. As a biosurfactant, surfactin is of great interest to various industrial applications. However, the main problems of surfactin production are its high production costs and low yield. Therefore studies addressing optimisation of surfactin production are of high interest. The main purpose of this thesis was to improve *B. subtilis* surfactin production by selecting the growth medium that would positively affect the surfactin production, and by modulating the *B. subtilis* ComX-dependent QS signaling, whose components are encoded by the comQXPA operon. Surfactin production was monitored by the use of »drop-collapse test« and HPLC. We have demonstrated i) that with the selection of suitable production medium we can increase surfactin production, b) that ComX does not have a long-term positive effect on surfactin production but rather regulates it transiently and c) to determine surfactin concentrations, both »drop-collapse test« and HPLC can be applied as the results of both tests show high correlation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	2
1.2 CILJI IN NAMEN DELA	2
1.3 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOSURFAKTANTI	3
2.1.1 Skupine biosurfaktantov	4
2.2 SURFAKTIN	5
2.2.1 Struktura surfaktina	6
2.2.2 Genetska regulacija in organizacija surfaktinskega operona	7
2.2.3 Sistem zaznavanja celične gostote (ang. quorum sensing)	7
2.2.4 Biosinteza surfaktina	9
2.2.5 Izločanje surfaktina iz bakterijske celice	11
2.3 BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA SURFAKTINA	11
2.3.1 Vpliv hrani	11
2.3.3 Vpliv procesnih parametrov	12
2.3.4 Mutante in rekombinantni sevi bakterij	13
2.3.5 Zaključni procesi in analizne metode	13
2.3.6 Analitske metode določanja surfaktina	14
2.4 APLIKACIJE SURFAKTINA V INDUSTRIJI	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Oprema	15
3.1.2 Kemikalije	15
3.1.3 Laboratorijske naprave	17

3.1.4	Bakterijski sevi.....	18
3.1.5	Priprava tekočih gojišč.....	18
3.1.5.1	Priprava Luria-Bertani (LB) tekočega gojišča	18
3.1.5.2	Priprava tekočega kompetenčnega gojišča (CM)	19
3.1.5.3	Priprava tekočega gojišča MMS	20
3.1.5.4	Priprava tekočega minimalnega gojišča M9 (100 ml).....	21
3.1.5.4.1	Priprava M9 soli (100ml)	21
3.1.5.5	Priprava 1 % amonijevega hidroksida.....	22
3.1.6	Priprava trdih LB agarnih plošč brez in z različnimi antibiotiki	22
3.2	METODE	22
3.2.2	Priprava prekonočne kulture <i>B. subtilis</i>	23
3.2.3	Pridobitev izrabljenih gojišč <i>B. subtilis</i>	23
3.2.4	Priprava bakterijske kulture <i>E. coli</i> za pridobitev peptida ComX	23
3.2.5	Priprava vzorcev za merjenje koncentracije surfaktina v izrabljenem gojišču	24
3.2.5.1	Metoda s filtriranjem izrabljenega gojišča <i>B. subtilis</i>	24
3.2.5.2	Metoda z dodajanjem etanola v izrabljeno gojišče <i>B. subtilis</i>	24
3.2.6	Kapljični test	24
3.2.7	Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC).....	25
3.2.7.1	Priprava mobilnih faz	27
3.2.7.1.1	Mobilna faza iz 20 % ACN in 0.1 % TFA (črpalka B)	27
3.2.7.1.2	Mobilna faza iz 100 % ACN in 0.1 % TFA (črpalka A)	27
3.2.8	Dodajanje in izolacija zunanjega signala ComX s HPLC	28
4	REZULTATI	29
4.1	PRIMERJAVA METOD ZA DETEKCIJO IN DOLOČANJE KONCENTRACIJE SURFAKTINA	29
4.2	OPTIMIZACIJA METODE ZA PRIDOBITEV DELNO OČIŠČENEGA SURFAKTINA.....	31
4.3	PRIMERJAVA DVEH GOJIŠČ ZA PRODUKCIJO SURFAKTINA.....	32
4.4	PRODUKCIJA SURFAKTINA IN RAST SEVOV <i>B. subtilis</i> V GOJIŠČU MMS.....	33
4.5	VPLIV DODANEGA ZUNAJCELIČNEGA ComX NA PROIZVODNJO SURFAKTINA V GOJIŠČU MMS	39
5	RAZPRAVA	42

5.1	PRIMERJAVA METOD ZA DETEKCIJO IN DOLOČANJE KONCENTRACIJE SURFAKTINA	42
5.2	OPTIMIZACIJA METOD ZA IZOLACIJO SURFAKTINA	43
5.3	GOJENJE SEVOV <i>B. subtilis</i> V GOJIŠČIH CM IN MMS	44
5.4	RAST IN SINTEZA SURFAKTINA SEVOV <i>B. subtilis</i> V GOJIŠČU MMS	45
5.4.1	Spremljanje rasti in sinteze surfaktina	45
5.4.2	Producija surfaktina v gojišču z dodanim zunanjim signalom ComX....	46
5.4.3	Vpliv raznih dejavnikov na koncentracijo surfaktina	46
6	SKLEPI	48
7	POVZETEK.....	49
8	VIRI	51

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavne skupine biosurfaktantov in njihovi producenti (Cooper in Paddock, 1984; Desai in Banat, 1997; Rosenberg in Ron, 1999; Deleu in Paquot, 2004)	5
Preglednica 2: Laboratorijska oprema (zraven so navedeni proizvajalci), ki smo jo uporabili pri delu	15
Preglednica 3: Seznam kemikalij (zraven so navedeni proizvajalci), ki smo jih uporabili pri delu	15
Preglednica 4: Seznam laboratorijskih naprav (zraven so navedeni proizvajalci), ki smo jih uporabili pri delu	17
Preglednica 5: Bakterijski sevi uporabljeni v magistrskem delu.....	18
Preglednica 6: Seznam bakterijskih sevov glede na odpornost na posamezen antibiotik ...	22

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz fizikalnih lastnosti (topnosti, površinske in medfazne napetosti) kot funkcije koncentracije surfaktanta. CMC prikazuje kritično micelarno koncentracijo (Mulligan, 2005).....	4
Slika 2: Prikaz treh vrst surfaktantov: A) ravnolipid, B) fosfatidiletanolamina in C) emulzana (Desai in Banat, 1997; Rosenberg in Ron, 1999).....	5
Slika 3: Struktura surfaktina (Mulligan, 2005).....	6
Slika 4: Kaskadne reakcije izražanja surfaktinskega operona. Prikazano je delovanje posameznih komponent, ki sodelujejo v sistemu za zaznavanje celične gostote (Jung, 2012)	9
Slika 5: Prikaz sinteze surfaktina s pomočjo modularnega kompleksa peptidne sintetaze (Bruner in sod., 2002).....	10
Slika 6 : Prikaz priprave redčitev vzorcev izrabljenega gojišča <i>B. subtilis</i> v mikrotitrski plošči za izvedbo kapljičnega testa.....	25
Slika 7: Diagram poteka delovanja sistema HPLC, ki smo ga uporabili za analizo surfaktina	27
Slika 8: Rezultati kapljičnega testa vzorcev izrabljenega gojišča seva <i>B. subtilis</i> PS-216 wt (<i>srfA-cfp</i>), ki smo ga gojili v gojišču CM in MMS.	29
Slika 9: Prikaz korelacije med oceno oziroma meritvami količine surfaktina pridobljenimi s kapljičnim testom oziroma s HPLC.	30
Slika 10: Primerjava koncentracije surfaktina v vzorcih gojišča MMS ekstrahiranih z etanolom (modri stolpci) ali filtriranih (rdeči stolpci).	31
Slika 11: Primerjava koncentracij surfaktina (mg/l), ki jih je sintetiziral sev <i>B. subtilis</i> PS-216 wt (<i>srfA-cfp</i>) v gojišču CM in MMS..	32
Slika 12: Prikaz rastnih krivulj in spremenjanja koncentracije proizvedenega surfaktina treh različnih sevov <i>B. subtilis</i> (PS-216 wt, PS-216 ΔcomQ in PS-216 ΔcomQXP) v gojišču MMS.	34
Slika 13: Kromatogram standarda surfaktina (Sigma Aldrich) s koncentracijo 0,5 mM (standard s tako koncentracijo smo pripravili sami, glej točko 3.2.7.), ≥ 98% čistost.	35
Slika 14: Kromatogram surfaktina proizvedenega z sevom <i>B. subtilis</i> PS-216 (wt) v gojišču MMS.	36
Slika 15: Kromatogram surfaktina proizvedenega z sevom <i>B. subtilis</i> PS-216 ΔcomQ v gojišču MMS.	37
Slika 16: Kromatogram surfaktina proizvedenega z sevom <i>B. subtilis</i> PS-216 ΔcomQXP v gojišču MMS.	38
Slika 17: Prikaz rezultatov kapljičnega testa.	40
Slika 18: Prikaz koncentracij surfaktina (mg/l), ki smo jih določili z metodo HPLC.	41

KAZALO PRILOG

PRILOGA A

Uporabljeni programi za izvedbo HPLC v aplikaciji Eurochrom

Priloga A1: Prikaz programa napisanega za identifikacijo in kvantifikacijo surfaktina z metodo HPLC v aplikaciji Eurochrom.

Priloga A2: Prikaz programa napisanega za identifikacijo signala ComX v izrabljenem gojišču *E. coli* z metodo HPLC v aplikaciji Eurochrom.

PRILOGA B

Prikaz dela kromatograma peptida ComX . Prikazan je le del kromatograma kjer se nahaja ComX t.j. od 34 minute do 35 minute. V tem času smo zbirali 1 ml frakcije vzorca in jih nato obdelali za nadaljnjo uporabo.

PRILOGA C

Primerjava rezultatov koncentracij surfaktina v gojišču MMS pridobljenih s kapljičnim testom in HPLC

Priloga C1: Koncentracije surfaktina (mg/l) pridobljene s HPLC in število pozitivnih kapljic (kapljice, ki se pri izvedbi kapljičnega testa »razlezejo« na površini parafilma zaradi prisotnosti surfaktina) v gojišču MMS brez dodanega zunanjega signala ComX

Priloga C2: Koncentracije surfaktina (mg/l) pridobljene s HPLC in število pozitivnih kapljic (kapljice, ki se pri izvedbi kapljičnega testa »razlezejo« na površini parafilma zaradi prisotnosti surfaktina) v gojišču MMS z dodanim zunanjim signalom ComX

Priloga C3: Koncentracije surfaktina (mg/l) pridobljene s HPLC in število pozitivnih kapljic (kapljice, ki se pri izvedbi kapljičnega testa »razlezejo« na površini parafilma zaradi prisotnosti surfaktina) v gojišču MMS z dodanim predhodno dvakrat redčenim zunajim signalom ComX.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACN	acetonitril
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozin trifosfat
CM	kompetenčno gojišče (ang. <i>competence medium</i>)
CMC	kritična micelarna koncentracija (ang. <i>critical micellar concentration</i>)
CSF	stimulirajoči faktor kompetence
Fe ²⁺	železovi ioni
Glu	glutaminska kislina
HCl	klorovodikova kislina
dH ₂ O	destilirana voda
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. <i>high pressure liquid chromatography</i>)
IPTG	Izopropil β-D-1-tiogalaktosid
K ⁺	kalijevi ioni
LB gojišče	Luria-Bertani gojišče
Leu	levcin
MMS gojišče	gojišče z minimalno vrednostjo mineralnih soli (ang. <i>minimal mineral salts medium</i>)
Mn ²⁺	manganovi ioni
MS	masna spektrometrija
NaCl	natrijev klorid
NMR	jedrska magnetna resonanca
NRPS	neribosomska peptidna sintetaza (ang. <i>nonribosomal peptid synthetase</i>)
OD	optična gostota
OPR	odprt bralni okvir
QS	sistem za zaznavanje celične gostote ali kvorum (ang. <i>quorum sensing</i>)
PCP	peptidil prenašalni protein
Rcf	relativna centrifugalna sila (ang. <i>relative centrifugation force</i>)
Rpm	vrtljaji na minuto (ang. <i>revolutions per minute</i>)
TE	tioesterazna domena

TFA	trifluoroocetna kislina
Val	valin

1 UVOD

Surfaktin je vodotopna amfifilna molekula (ima hidrofobne in hidrofilne lastnosti) in jo uvrščamo v skupino biosurfaktantov. Amfifilnost ji omogoča, da se lahko nahaja med dvema fazama različnih polarnosti (voda/olje, zrak/voda). Značilne lastnosti surfaktinskih molekul so: zmanjšanje površinske in medfazne napetosti, biorazgradljivost, nizka toksičnost, nizka kritična micelarna koncentracija (CMC), delujejo kot detergenti, omogočajo nastajanje pene in povečujejo topnost hidrofobnih molekul (Shaligram in Singhal., 2010; Shete in sod., 2005; Soberon-Chavez, 2011). Biosurfaktante nekateri razvrščajo v dve večji skupini, in sicer v biosurfaktante z nizko molekulsko maso (glikolipidi, lipopeptidi (lipoproteini), fosfolipidi in maščobne kisline) ter biosurfaktante z visoko molekulsko maso (polimerni surfaktanti in surfaktanti v obliki delcev) (Desai in Banat, 1997; Rosenberg in Ron, 1999; Deleu in Paquot, 2004).

Surfaktin je lipopeptidni surfaktant, ki je sestavljen iz β -hidroksi maščobne kisline, katere dolžina verige se lahko razlikuje v številu ogljikovih atomov. Preko laktonske vezi je maščobna veriga povezana s peptidom, ki je sestavljen iz sedmih α -amino kislin (Glu-Leu-DLeu-Val-Asp-D-Leu-Leu) (Marahiel in sod., 1993). Naravni surfaktini, ki jih proizvajajo različni sevi *Bacillus subtilis* so prisotni kot mešanica izoformnih oblik, ki imajo podobno kemično zgradbo. Razlike najdemo v aminokislinski sestavi sestavi lipopetida in dolžini maščobne kisline (C13-C15), kar vpliva na fizikalno-kemične lastnosti tega surfaktanta (Kowall in sod., 1998). Operon *srfA* kodira surfaktinski sintetazni kompleks (NRPS-neribosomska peptidna sintetazo). Na sintezo surfaktina pa vplivata tudi gena *comA* (Nakano in sod., 1991, 1993) in *sfp* (Nakano in sod., 1992; cit. po Sullivan, 1998). Prvi kodira ComA, odzivni regulator (Weinrauch in sod., 1998), ki se veže na promotorsko regijo operona *srfA* (Nakano in sod., 1991, 1993), vendar le po fosforilaciji aspartatnega ostanka (Roggiani in Dubnau, 1993), ki jo katalizira membranska histidin kinaza ComP v pogojih povečane celične gostote (cit. po Claverys in sod., 2006). Oba proteina sta namreč ključni komponenti sistema za zaznavanje kvorum (Weinrauch in sod., 1990) poleg signalnega peptida ComX in proteina ComQ, ki je odgovoren za procesiranje in modifikacijo peptida ComX v aktiven signalni peptid (Ansaldi in sod., 2002).

Surfaktin je kot biosurfaktant zanimiv za industrijsko uporabo, vendar je njegova proizvodnja omejena zaradi nizkih donosov in visokih stroškov proizvodnje, zato se raziskave usmerjajo v razvoj optimalnih pogojev bioprocesa za pridobivanje surfaktina (Mukherjee in sod., 2006). Zato je še vedno večina surfaktantov pridobljena v kemični industriji (Shaligram in sod., 2010). Zaradi izrednih lastnosti sodi surfaktin med spojine, ki so zanimive za aplikacije v raznih industrijah kot so prehranska, kozmetična, farmacevtska, tekstilna, kmetijska, petrokemična ter v naravovarstvu in medicini (Shaligram in sod., 2010; Shete in sod., 2005; Soberon-Chavez, 2011).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Biosurfaktanti so površinsko aktivne molekule, ki jih izločajo bakterije, med njimi tudi *Bacillus subtilis* ter imajo zaradi svojih lastnosti velik pomen za uporabo v industriji. Surfaktin je poznan kot eden najbolj učinkovitih biosurfaktantov. Kljub velikemu industrijskemu interesu ostaja surfaktin neizkoriščen, saj veliki proizvodni stroški in nizek donos predstavlja oviro za industrijo,. Zato so potrebne strategije, ki bi odpravile te omejitve. Ena izmed možnih strategij je izboljšanje produkcijskega gojišča druga strategija pa je manipulacija genov, ki vplivajo na izražanje surfaktinskega operona pri bakteriji *Bacillus subtilis* (Wei in sod., 2007).

1.2 CILJI IN NAMEN DELA

Glavni namen naloge je izboljšati produkcijo surfaktina pri bakteriji *Bacillus subtilis* z: (i) spremjanjem sestave produkcijskega gojišča in (ii) manipulacijo signaliziranja, ki vpliva na produkcijo surfaktina.

1.3 HIPOTEZE

- Sestava gojišča vpliva na količino proizvedenega surfaktina.
- Sprememba količine signalne molekule ComX vpliva na količino proizvedenega surfaktina.

2 PREGLED OBJAV

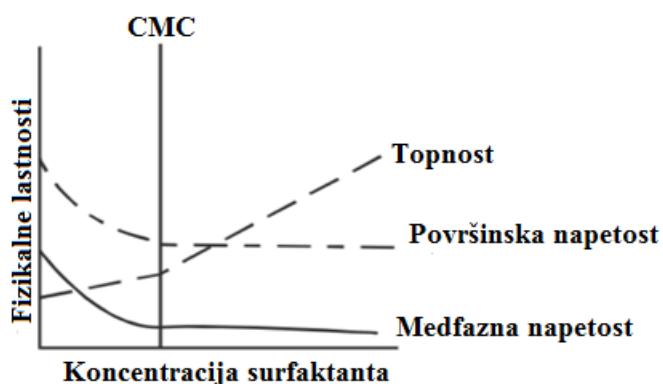
2.1 BIOSURFAKTANTI

Biosurfaktanti so vodotopne amfifilne molekule (imajo hidrofobne in hidrofilne lastnosti), kar jim omogoča, da se lahko nahajajo med dvema fazama različnih polarnosti (voda/olje, zrak/voda). Tvorijo vmesni medfazni molekularni film in zmanjšajo površinsko napetost tekočin oziroma zmanjšajo medfazno napetost med dvema tekočinama, kar pomeni, da lahko fazi med seboj reagirata in se pomešata. Tako surfaktanti lahko vplivajo na reološke lastnosti in masni prenos snovi. Njihove ostale lastnosti so:

- biorazgradljivost,
- majhna toksičnost,
- nizka kritična micelarna koncentracija (CMC),
- delujejo kot detergenti,
- omogočajo nastajanje pene in topnost hidrofobnih molekul,
- stabilnost pri različnih pH in temperaturnih vrednostih,
- protimikrobna, protivirusna in protiglivna aktivnost,
- sposobnost emulzifikacije.

Omenjene lastnosti uvrščajo surfaktante med spojine, ki so zanimive za razne aplikacije v industriji kot so uporaba v prehranski industriji (sprožijo tvorjenje pene in stabilizacijo emulzij), kot detergenti za čiščenje, v kozmetični industriji (disperzija faz), v tekstilni industriji, kmetijski panogi (povečanje topnosti agrokemikalij), petrokemični industriji (lubrikanti pri vrtanju nafte) in bioremediaciji nevodotopnih onesnažil (povzeto po Shaligram in sod., 2010; Shete in sod., 2005; Soberon-Chavez 2011; Nitschke in Costa, 2007).

Ob višanju koncentracije biosurfaktantov v raztopini se bo površinska oz. medfazna napetost zmanjševala dokler njihova koncentracija ne doseže tako imenovane kritične micelarne koncentracije (CMC). Pri dosegu CMC koncentracija prostega (nemicelarnega) surfaktanta postane skoraj konstantna zaradi medfazne zasičenosti z molekulami surfaktanta. Ko se preseže vrednost CMC, se površinska oz. medfazna napetost več ne zmanjšuje. Obratno pa je s topnostjo surfaktantov (slika 1). Pri CMC se biosurfaktanti v obliki monomerov začnejo spontano združevati v struktурno organizirane aggregate kot so miceli, vezikli ali lamele. Agregati se tvorijo kot posledica številnih šibkih kemičnih reakcij (nastanek hidrofobnih, Van der Walsovih in vodikovih vezi) med polarnim delom (glava) in nepolarnim delom (rep) molekul biosurfaktanta. Ko se molekule surfaktantov uredijo v oblike micelov, so okolju izpostavljeni njihovi polarni deli, zaradi česar se začne v vodnih raztopinah topnost surfaktantov višati. Vrednost CMC se razlikuje med posameznimi biosurfaktanti, saj je odvisna od njihove strukture in lastnosti (pH, ionska moč, temperatura) raztopine (Soberon-Chavez, 2011; Desai in Banat, 1997).



Slika 1: Prikaz fizikalnih lastnosti (topnosti, površinske in medfazne napetosti) kot funkcije koncentracije surfaktanta. CMC prikazuje kritično micelarno koncentracijo (Mulligan, 2005)

Biosurfaktante so sposobni proizvajati številni mikroorganizmi, predvsem bakterije in v manjšem obsegu kvasovke. Najbolj znani proizvajalci izhajajo iz bakterijskih rodov *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp. ter nekaterih vrst kvasovk (*Candida*, *Torulopsis*) (Schete in sod., 2006). Producentski organizmi izločajo biosurfaktante iz celic v okolico ali pa so ti vezani na dele celic, predvsem takrat, ko bakterije rastejo na substratih, ki se ne mešajo z vodo (Desai in Banat, 1997).

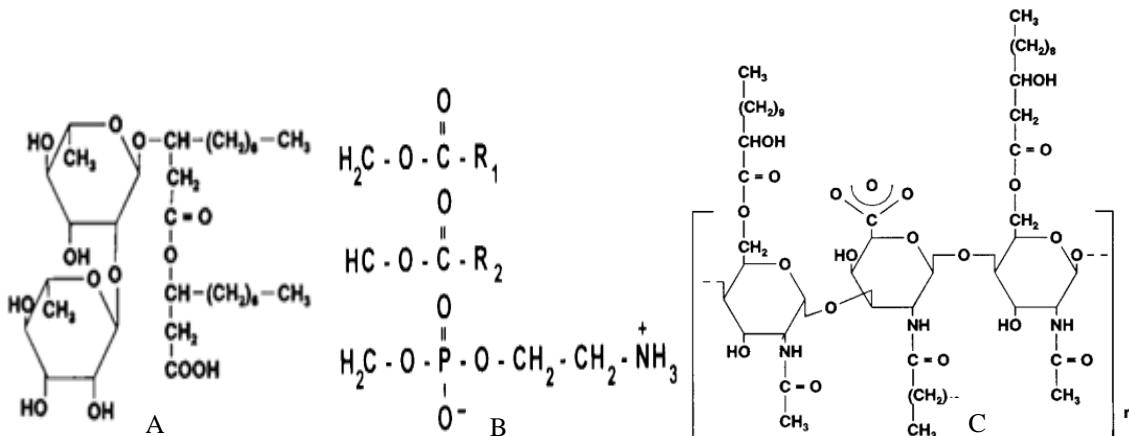
Kot je že omenjeno so biosurfaktanti amfifilne molekule, ki so večinoma anionske ali nevtralne narave. Kationski so samo tisti, ki vključujejo v strukturi amino kisline. V svoji strukturi vsebujejo hidrofilni del, ki vključuje aminokislinske (peptidne) anione oz. katione, ciklične peptide, mono-, di- oz. polisaharide, fosfatne in alkoholne skupine ter hidrofobni del, katerega sestavlja dolgoverižne nenasičene oz. nasičene maščobne kisline ali njihovi derivati. Zatorej poznamo različne skupine biosurfaktantov, ki jih razvrščamo glede na njihovo kemijsko zgradbo in izvor (Desai in Banat, 1997; Nitschke in Costa, 2007).

2.1.1 Skupine biosurfaktantov

Glavne skupine biosurfaktantov predstavljajo biosurfaktanti z nizko molekulsko maso kot so glikolipidi, lipopeptidi (lipoproteini), fosfolipidi in maščobne kisline ter biosurfaktanti z visoko molekulsko maso kot so polimerni surfaktanti in surfaktanti v obliki delcev (ang. particulate surfactant) (Desai in Banat, 1997; Rosenberg in Ron, 1999; Deleu in Paquot, 2004).

Preglednica 1: Glavne skupine biosurfaktantov in njihovi producenti (Cooper in Paddock, 1984; Desai in Banat, 1997; Rosenberg in Ron, 1999; Deleu in Paquot, 2004)

Vrste biosurfaktantov	Mikroorganizmi
Glikolipidi	
-ramnolipidi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-trehalolipidi	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp., <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Corynebacterium</i>
-soforolipidi	<i>Torulopsis magnoliae</i> , <i>Candida bombicola</i>
Lipopeptidi / lipoproteini	
-surfaktin	<i>B. subtilis</i>
-fengicin	<i>B. subtilis</i>
-iturin	<i>B. subtilis</i>
-gramicidin	<i>B. brevis</i>
-polimiksini	<i>B. polymyxa</i>
-seratamolid	<i>Serratia marcescens</i>
Maščobne kisline, fosfolipidi	
-korinomikolna kislina	<i>C. lepus</i> , <i>N. erythropolis</i>
-fosfatidiletanolamin	<i>Acinetobacter</i> spp.
Polimerni biosurfaktanti	
-emulzan	<i>A. calcoaceticus</i>
-lipozan	<i>Candida lipolytica</i>
-manoproteini	<i>Candida tropicalis</i>
Biosurfaktanti v obliki delcev (ang. particulate)	
-izvencelični membranski vezikli in fimbriji	<i>A. calcoaceticus</i> , <i>Acinetobacter</i> sp.



Slika 2: Prikaz treh vrst surfaktantov: A) ramnolipid, B) fosfatidiletanolamin in C) emulzan (Desai in Banat, 1997; Rosenberg in Ron, 1999)

2.2 SURFAKTIN

Surfaktin, izoliran iz kulture *Bacillus subtilis*, so prvič opisali Arima in sod. leta 1968. Takšno ime je dobil zaradi svojega izjemnega delovanja kot surfaktant kar dokazuje dejstvo, da lahko zmanjša površinsko napetost vode iz 72 na 27 mN/m pri 0.005% koncentraciji (Arima in sod., 1968; Peypoux in sod., 1999; Wei in sod., 2007). Medfazno

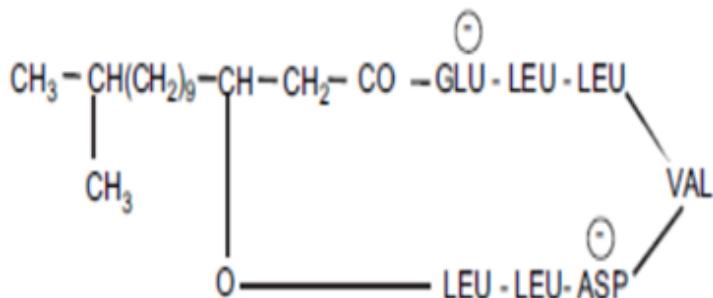
napetost med vodo in heksadekani lahko zniža do 1 mN/m (Rosenberg in Ron, 1999). Njegova CMC v vodi je 24 µM (Desai in Banat, 1997).

Sprva so nameravali uporabljati surfaktin kot inhibitor strjevanja krvi in odkrili, da ima sposobnost lize eritrocitov, protoplastov in sferoplastov (Arima in sod., 1968; Cooper in sod., 1981). Največjo omejitev za uporabo surfaktina v komercialnih aplikacijah predstavljajo visoki proizvodni stroški. Zato mnogi skušajo najti rešitve za odpravo te omejitve. Raziskave na tem področju se predvsem usmerjajo v smeri izboljšanja produkcijskih organizmov, optimizacije gojišč, načina pridobivanja (vrste biopresesov, dizajn bioreaktorjev) in uporabe agroindustrijskih odpadkov kot vira hranila za produkcijske organizme, s čimer bi zmanjšali stroške vhodni surovini (Yeh in sod., 2006).

2.2.1 Struktura surfaktina

V skupino surfaktinov uvrščajo okrog 20 različnih lipopeptidov, ki imajo podobno sestavo, a se razlikujejo v dolžini maščobne kisline in aminokislinski sestavi peptidnega dela molekule. Njihovo strukturo lahko natančno analizirajo s pomočjo metod tekočinske kromatografije (ang. *liquid chromatography*, LC) in masne spektrometrije (MS) (Jacques, 2011).

Surfaktin je sestavljen iz β-hidroksi maščobne kisline, katere dolžina verige se lahko razlikuje v številu ogljikovih atomov, med katerimi je najpogosteje prisotno 13-15 ogljikovih atomov (slika 3). Maščobna kisline je preko laktonske vezi povezana s petidom, ki je sestavljen iz sedmih α-amino kislin (Glu-Leu-DLeu-Val-Asp-D-Leu-Leu) (Marahiel in sod., 1993).



Slika 3: Struktura surfaktina (Mulligan, 2005)

Naravni surfaktini, ki ga proizvajajo razni sevi *B. subtilis* so prisotni v gojišču kot mešanica v več izoformnih oblikah, ki imajo podobno kemično zgradbo, v manjši meri pa se razlikujejo v svojih fizikalno-kemičnih lastnostih (Kowall in sod., 1998). V literaturi lahko zasledimo, da lahko določen bakterijski sev proizvede šest izoformnih oblik surfaktina (Wei in sod. 1998), nekateri pa trdijo, da izbrani sevi proizvedejo celo devet ali več oblik (Nakayama in sod. 1997; Abdel-Mawgoud in sod., 2008). Na raznolikost molekul vpliva izbira seva *B. subtilis* in pogoji gojenja (hranila in okolje), še posebno

dodajanje različnih aminokislinskih ostankov v gojišče (Kowall in sod., 1998). Pri sintezi surfaktina namreč sodelujejo neribosomske peptidne sintetaze (NRPS), sestavljene iz več modulov, ki lahko vključijo na določenih mestih specifične aminokisline v nastajajočo molekulo surfaktina (Reuter in sod., 1999; Bruner in sod., 2002).

2.2.2 Genetska regulacija in organizacija surfaktinskega operona

Nakano in sod. (1991) so prvi odkrili vlogo operona *srfA* pri sintezi sekundarnega metabolita surfaktina kot tudi vpliv tega operona na razvoj kompetence in sporulacije pri *B. subtilis*. Kot smo že omenili, operon *srfA* kodira kompleks encimov za sintezo surfaktina. Transkripcijo operona uravnava *comA* (Nakano in sod., 1991; Sullivan, 1998; Abushady in sod., 2005) ter regulatorja CodY (Serror, 1996) in PerR (Hayasi in sod., 2005). Gen *comA* kodira transkripcijski aktivator ComA, ki se direktno veže na promotor *srfA* (Roggiani in Dubnau, 1993). Poleg ComA izražanje *srfA* uravnava tudi transkripcijski aktivator PerR, ki se direktno veže na dve mesti na promotorski regiji *srfA*, vendar mehanizem delovanja PerR še ni pojasnjen. Peroxidni stres inaktivira aktivnost PerR tako, da mu onemogoči vezavo na DNK (Hayasi in sod., 2005). CodY negativno regulira transkripcijo *srfA* tako, da se vezavno mesto CodY prekriva z vezavnim mestom RNA polimeraze (Serror in Sonenshein, 1996).

Surfaktinski operon je sestavljen iz štirih odprtih bralnih okvirjev (Orf 1.2.3,4). Orf1 (*srfAA*) kodira podenoto peptidne sintetaze, ki ima funkcijo vključevanja aminokislin v peptidno verigo (glutamata in dveh levcinov). Orf 2 (*srfAB*) kodira podenoto, ki vključuje dodajanje aspartata, valina in levcina. Orf 3 (*srfAC*) pomaga pri vključevanju levcina. Orf 4 (*srf AD*) pa ni potreben za produkcijo tega surfaktanta (Marahiel in sod., 1993). Zaradi tega dejstva v mnogih publikacijah navajajo, da surfaktinski operon sestavlja samo prvi trije čitalni okvirji.

2.2.3 Sistem zaznavanja celične gostote (ang. quorum sensing)

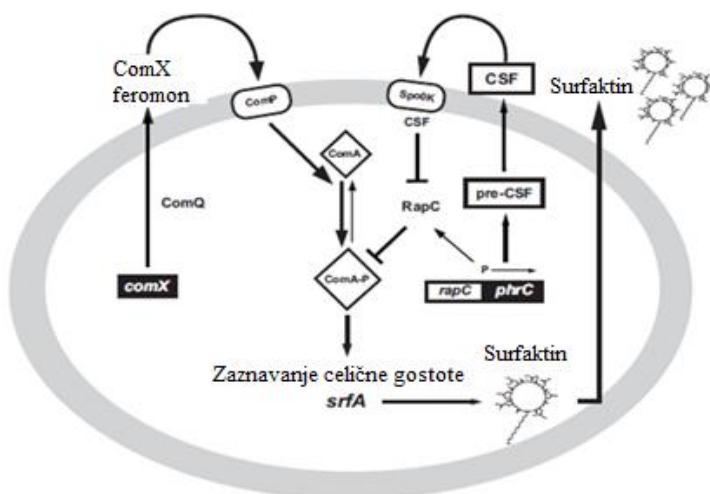
Bakterije imajo sposobnost, da lahko med seboj komunicirajo s pomočjo signalnih molekul (npr. peptidnih feromonov), ki se kopijo v rastnem gojišču bakterij in ko dosežejo določeno koncentracijo, sprožijo različne prilagoditvene odzive. Prevladujoče mnenje je, da ti sistemi omogočajo zaznavanje celične gostote ali kvoruma na nivoju populacije (Miller in Bassler, 2001; Rutherford in Bassler, 2012). Pri bakteriji *B. subtilis* je sistem za zaznavanje kvoruma zapisan na operonu *comQXPA* (Weinrauch in sod., 1990; Solomon in sod., 1995). Tortosa in sod. (2001) so odkrili, da obstajajo ferotipi- oziroma ozko specifične komunikacijske podskupine znotraj vrste *Bacillus subtilis*. Med sevi enakega ferotipa komunikacija poteka med ferotipi pa ne (Totrosa in sod., 2001; Tran in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Mandič- Mulec in sod., 2003; Štefanič in Mandič-Mulec, 2009). Na nivoju analize genomov je ta sistem za zaznavanje kvoruma zaznati pri različnih vrstah

debla Firmicutes, medtem ko je bila vloga *comQXPA* v sintezi surfaktina že takrat znana in pozitivno uravnava izražanje surfaktinskega operona (Nakano in sod., 1991).

V delovanje surfaktinskega operona sta udeleženi dve vrsti sistema zaznavanja gostote (slika 4):

- a) Prvi mehanizem vključuje signalni peptid (feromon) ComX. Ta najprej znotraj celice nastane v neaktivni prepeptidni obliki in se nato s pomočjo ComQ modificira v aktivno obliko peptida (Tortosa in sod., 2001), ki se kopiči zunaj celice in doseže mejne vrednosti ob pri visoki celični gostoti (Solomon in sod., 1995). ComX nato vzajemno deluje z dvokomponentnim sistemom na celični membrani. Ta sistem vsebuje membransko vezan ComP (histidinska kinaza) in odzivni regulator ComA. ComP zazna akumuliranje ComX in se ob njegovi kritični koncentraciji avtofosforilira. Nato avtofosforiliran ComP prenese fosfatno skupino na ComA. Fosforiliran ComA se specifično veže na promotorsko regijo gena *srfA* in s tem aktivira izražanje surfaktinskega operona (Roggiani in Dubnau, 1993; Sullivan, 1998).
- b) Drugi sistem zaznavanja celične gostote je kodiran s *phrC-rapC* geni: prvi kodira signalni peptid vključen v delovanje kompetence (ang. competence stimulating factor (CSF) in pa fosfatazo (RapC), ki inhibira delovanje ComA). CSF prehaja v celico s pomočjo oligopeptidne permeaze (SpoOK), se veže na RapC ter tako prepreči inhibicijo ComA. Pri višjih koncentracijah CSF inhibira izražanje *srfA* in stimulira sporulacijo. Pri nizkih koncentracijah pa CSF stimulira izražanje *srfA* tako, da inhibira delovanje RapC fosfataz (Solomon, 1995; Lazazzera, 1997; Sullivan, 1998).

Surfaktin je vpletен tudi v sintezo zunajceličnega matriksa. Deluje namreč kot parakrina molekula, ki aktivira membransko vezano histidin kinazo KinC. Ta nato fosforilira regulator Sp0A, kar postopno vodi do produkcije zunajceličnega matriksa preko SinI-SinR poti (Lopez in sod., 2009).



Slika 4: Kaskadne reakcije izražanja surfaktinskega operona. Prikazano je delovanje posameznih komponent, ki sodelujejo v sistemu za zaznavanje celične gostote (Jung, 2012)

2.2.4 Biosinteza surfaktina

Surfaktin je nizko molarna molekula neribosomskega izvora, kar pomeni da pri njegovi sintezi sodelujejo veliki encimski kompleksi imenovani neribosomske peptidne sintetaze (NRPS) (Reuter in sod., 1999; Bruner in sod., 2002). Celoten sintetazni kompleks je kodiran z inducibilnim operonom *srfA* (25 kb) (Hamoen in sod., 2003; Nakano in sod., 1991). Ta je sestavljen iz štirih genov, ki sodelujejo pri biosintezi surfaktina. Trije geni *srfA*, *srfB* in *srfC*, kodirajo tri encimske podenote, ki sestavljajo NRPS, in sicer SrfA (402 kDa), SrfB (401 kDa) in SrfC (144 kDa). Zadnji v skupini genov pa je *srfD*, ki kodira protein SrfD (40 kDa), ki je podoben encimu tioesterazi in ima vlogo popravljalnega encima pri sestavi peptida (Kraas in sod., 2010).

Encimske podenote NRPS so razporejene v module (slika 5). Vsak modul (skupno 7) peptidne sintetaze je sestavljen iz različnih domen in je odgovoren za dodajanje in spremjanje specifičnih gradnikov (aminokislina) na nastajajočo polipeptidno verigo. Podaljševanje verige se razlikuje med posameznimi moduli (Reuter in sod., 1999; Bruner in sod., 2002).

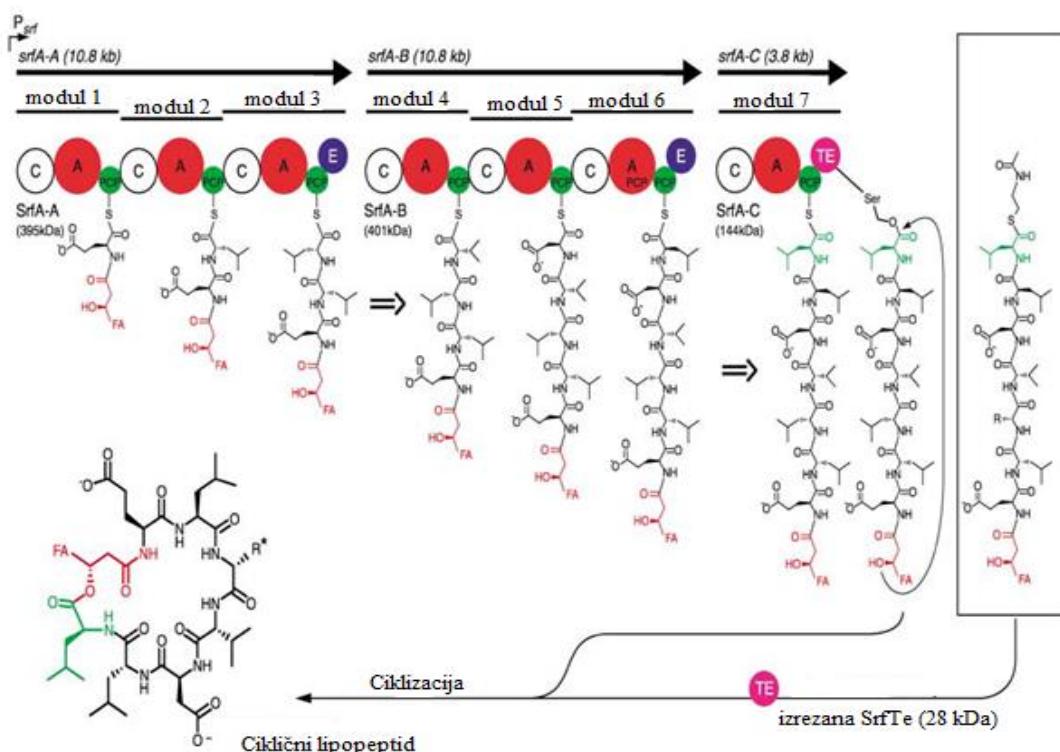
Pri večini NRPS so moduli sestavljeni iz več domen (Slika 5) (Quadri in sod., 1998; Reuter in sod. 1999; Bruner in sod., 2002; Stricker in sod., 2010):

- 1) Adenilacijska domena (A): izbere začetno aminokislino in jo spremeni v aktivno obliko imenovano amino acil adenilat.
- 2) Peptidil prenašalni protein (PCP) ali tiolacijska domena (T): vsebuje 4'-fosfopantetonil prostetično skupino (deluje kot kofaktor) na katere se preko tioesterske vezi kovalentno poveže aktivirana aminokislina. PCP domena je

aktivirana z encimom fosfopantetonil transferazo (Sfp), ki nanjo prenese 4'-fosfopantetonil prostetično skupino iz koencima A (CoA).

- 3) Kondenzacijska domena (C): katalizira direktno kondenzacijo tioesterificiranega intermediata na naraščajočo verigo tj. katalizira nastanek peptidne vezi z amino acilnim substratom (vez med ogljikom in dušikom) vezanim na PCP naslednjega modula.
- 4) Tioesterazna domena (TE): nahaja se samo na zadnjem modulu peptidil sintetaznega kompleksa. TE domene so lahko semiautonomni proteini, veliki okoli 25-30 kDa in izvajajo ciklizacijo molekule surfaktina.

V katalizo peptidov so lahko vpleteni tudi encimi, ki lahko spremenijo njegovo strukturo. Epimerizacijska (E) domena katalizira epimerizacijo aminokisline, ki je vezana na PCP. Ta domena se nahaja samo na encimskih podenotah SrfA in Srf B, in sicer na njunih zadnjih modulih PCP (Bruner in sod., 2002; Strieker in sod., 2010).



Slika 5: Prikaz sinteze surfaktina s pomočjo modularnega kompleksa peptidne sintetaze. Prikazani so geni, ki kodirajo posamezne encimske podenote: SrfA-A in SrfA-B, ki ju sestavljajo trije moduli ter SrfA-C ki vsebuje en modul. Moduli so sestavljeni iz naslednjih domen: C – kondenzacijska domena, A – adenilacijska domena, PCP - peptidil prenašalni protein, E – epimerizacijska domena, TE – tioesterazna domena (Bruner in sod., 2002)

2.2.5 Izločanje surfaktina iz bakterijske celice

Področje izločanja surfaktina iz celic še ni povsem dobro raziskano in zato mehanizmi, ki delujejo pri tem še niso povsem pojasnjeni. Li in sod. (2015), predvidevajo, da tok surfaktina iz celic poteka preko transmembranskih transporterjev, ki za delovanje potrebujejo energijo v obliki protonov (*ang. proton motive force*) in je neodvisen od ATP hidrolize. V študiji so uporabili sev *B. subtilis* THY-7, v katerem so posamezno prekomerno izrazili različne gene za lipopeptidne transporterje YerP, YcxA and KrsE. Pri vseh so zaznali povišan prenos surfaktina iz celic, najvišji transport surfaktina pa je bil dosežen v sevu s prekomernim izražanjem transporterja YerP. Mehanizmi transmembranskega prenosa molekul surfaktina so izjemnega pomena za pridobitev visokih koncentracij surfaktina, zato so potrebne nadaljnje študije, ki bi lahko privedle do rešitev za zmanjšanje stroškov pri proizvodnji surfaktina (Li in sod., 2015).

2.3 BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA SURFAKTINA

Komercializacija vsakega biotehnoološkega produkta je odvisna od ekonomike bioprocesa (Shaligram in Singhal, 2010). Proizvodnja biosurfaktantov na industrijskem nivoju je omejena zaradi nizkih donosov in visokih stroškov proizvodnje, zato so raziskave usmerjene v razvoj optimalnih pogojev (Mukherjee in sod., 2006). Samo zaključni procesi (postopki za pridobitev čistega surfaktina) predstavljajo približno 60% vseh stroškov proizvodnje biotehnooloških produktov (Khire, 2010). Večina surfaktantov je danes pridobljena s kemičnimi postopki. Surfaktanti biološkega izvora pa zadnja leta vse bolj pridobivajo na pomenu in z izboljšanjem postopkov poizkušajo prehiteti sintetične glede na količino proizvodnih stroškov, funkcionalnosti in končnega izkoristka (Shaligram in Singhal., 2010).

2.3.1 Vpliv hranil

Za čim bolj optimalno produkcijo surfaktina je potrebno vzdrževati v gojišču določene koncentracije hranil. Še posebej je potrebno paziti na hranila, ki predstavljajo limitirajoč faktor rasti mikroorganizmov. Eden teh je glukoza in amonijeve soli, ki predstavljata glavni vir ogljika in dušika za produkcijski mikroorganizem. Vpliv na sintezo surfaktina so preučevali pri *B. subtilis* pri različnih začetnih koncentracijah glukoze (0-60 g/L). V kulturah pri začetni koncentraciji glukoze 40 g/L je bila produkcija surfaktina najvišja. Pri nižanju koncentracije glukoze v gojišču je začela upadati tudi koncentracija surfaktina, ker celice verjetno uporabljajo surfaktin kot vir ogljika za rast. Opažena pa je bila tudi inhibicija produkcije pri višjih koncentracijah glukoze, saj se je le-ta začela kopićiti v gojišču, kar je povzročilo znižanje pH (Yeh, 2005).

Davis in sod. (1999) so preučevali vpliv dušika na rast *B. subtilis*. Najvišjo produkcijo surfaktina so dosegli v definiranem gojišču z amonijevim nitratom kot virom dušika.

Predvidevajo, da nitrat spodbuja k delovanju sekundarnega metabolizma. Z dovajanjem nitrata v gojišče med samim procesom so podaljšali izrabo nitrata in povišali produkcijo surfaktina.

Glukoza in amonijeve soli vplivajo na rast bakterij, ne prispevajo pa k povišanju sinteze surfaktina. Medtem, ko pa prisotnost železa in mangana znatno poveča produkcijo surfaktina, saj obstaja sistem aktivnega transporta za železo in mangan, ki delujeta kot kofaktorja za encime v biosintezi poti (Cooper in sod., 1981; Sen, 1997). Wei in Chu, (1998, 2002), sta dosegla z dodatkom Fe^{2+} in Mn^{2+} ionov ter vzdrževanjem pH izboljšanje produkcije surfaktina s strani bakterije *B. subtilis* in dosegla donose surfaktina 3 g/L ali več. V nadalnjih raziskavah so Wei in sod. (2007) dokazali, da so poleg Fe^{2+} in Mn^{2+} pomembni tudi magnezijevi (Mg^{2+}) in kalijevi (K^+) ioni.

Največji strošek pri proizvodnji predstavlja materiali, ki vstopajo v proces, zato skušajo najti čim cenejše substrate, kot so rastlinska olja, odpadna olja, odpadni škrob, odpadke pri destilaciji in odpadne vode. Vendar so za uporabo zgoraj omenjenih substratov za industrijske namene potrebne še mnoge raziskave (Thompson in sod., 2000, 2001; Noah in sod., 2002, 2005; Nitschke in Pastore, 2003, 2006; Mukherjee in sod., 2006).

2.3.3 Vpliv procesnih parametrov

Okolje in rastni pogoji (temperatura, pH, mešanje in dostopnost kisika) posredno vplivajo na produkcijo biosurfaktantov preko vpliva na celično rast in na celično aktivnost (Abushady in sod., 2005). Pomembno vlogo pri kinetiki nastajanja surfaktina imata prenos kisika in hranil v gojišče. Pri višjih hitrostih mešanja (200-300 rpm) je potrebno povečati stopnjo prezračevanja (dovajati kisik v bioreaktor), ker pride do povečanega tvorjenja pene, pri čimer pena zmanjšuje prenos kisika v gojišče in dobimo manj surfaktina (Yeh in sod., 2005, 2006).

Poleg mešanja in prezračevanja, sta Sen in Swaminathan (1997) preučevala vpliv pH in temperature na donos surfaktina. Najboljši donos surfaktina sta dosegla pri pH 6.75 in temperaturi 37.4°C ter stopnji mešanja 140 rpm. Pri vrednosti pH pod 5.0 pride do zakisanja brozge in precipitacije surfaktina (Wei in Chu, 1998, 2002). Optimalna vrednost pH naj bi bila nekje med 6.3-6.7 (Yeh in sod., 2005).

Na začetku proizvodnje surfaktina je potrebno optimizirati tudi lastnosti inokuluma (bakterije), njegovo starost in količino. Ti dve lastnosti direktno vplivata na fazo prilagajanja bakterije, specifično hitrost rasti, nastajanje biomase, sporulacijo ter zmožnost proizvajanja surfaktina. Priprava inokuluma v dveh stopnjah (primarni inokulum in sekundarni inokulum pridobljen iz primarnega) je pripomogla k višjemu donosu surfaktina (Sen in Swaminathan, 2004).

2.3.4 Mutante in rekombinantni sevi bakterij

Genetika mikroorganizmov, ki jih uporabimo za proizvajalce določenih produktov, je zelo pomemben faktor, saj so zelo zaželeni takšni organizmi, ki so sposobni proizvesti določen produkt v visokih koncentracijah. Poleg uporabe sevov bakterij, ki že po naravi proizvajajo večje količine biosurfaktantov, se uporablajo tudi gensko spremenjeni sevi s povečano zmožnostjo proizvodnje biosurfaktantov (Mukherjee in sod., 2006). Pri tem je potencialno pomemben vpliv na regulacijo surfaktinskega operona (npr. povečanje izražanja signalnega peptida *comX* in *phrC*) (Jung in sod., 2012). Primer gensko spremenjenega seva je *B. subtilis* MI133, kateremu so vstavili gen *lpa-14*, ki sodeluje pri proizvodnji surfaktina in je izoliran iz divjega tipa *B. subtilis*. Ta sev so uporabili za pridobivanje surfaktina s pomočjo »solid state« bioprosesa na ostankih soje in pri tem opazili tudi do osemkrat višjo produkcijo surfaktina kot pri naravnem sevu (Ohno in sod., 1995). Z uporabo naključne mutageneze so ustvarili sev *B. subtilis*, ki pri rasti na substratu iz sojine moke proizvede od 8-50 g/L surfaktina (Yoneda in sod., 2004).

Slaba lastnost surfaktina, ki omejuje njegovo uporabo v terapevtske namene, je njegova zmožnost lize eritrocitov. Z modifikacijo peptidne sintetaze, in sicer odstranitvijo dela, ki vsebuje modul za vstavljanje aminokislin, so ustvarili rekombinantni sev *B. subtilis*, ki proizvaja lipopeptid z zmanjšano toksičnostjo proti eritrocitom (Symmank in sod. 2002).

2.3.5 Zaključni procesi in analizne metode

Pri proizvodnji biosurfaktantov v bioreaktorjih se le-ti preferenčno akumulirajo na vmesni fazni med gojiščem in zrakom. To fazo je potrebno od ostale biopresesne brozge ločiti in izolirati biosurfaktante z ustrezeno metodo (Baker and Chen, 2010). V začetkih proizvodnje, so izolirali surfaktin iz brozge s precipitacijo s kislinami (HCl) čemur je sledila ekstrakcija z metanolom ali drugimi organskimi topili. Za čiščenje in koncentriranje surfaktina so se pozneje uveljavile tudi druge metode kot so kristalizacija in centrifugiranje, ekstrakcija med dvema fazama, ultrafiltracija, adsorpcija na trdne nosilce (aktivni ogljik), visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. *high pressure liquid chromatography*, HPLC) ter frakcionacija pene (Baker and Chen, 2010). Predvsem metodi frakcionacija pene (ang. *foam fractionation*) in ultrafiltracija sta uporabni za industrijsko proizvodnjo, saj lahko z njima kontinuirno odstranjujejo surfaktin iz biopresesne brozge ter zagotavljajo visoko čistost produkta (Davis in sod., 2001; Noah in sod., 2002; Sen in Swaminathan, 2005). Za izolacijo in čiščenje produkta je mnogokrat potrebno zaporedno uporabiti več stopenj zaključnih procesov. Nečisti surfaktin pridobljen v začetnih stopnjah izolacije je primeren za uporabo v okoljskih aplikacijah, naftni industriji, barvni in tekstilni industriji. Surfaktin, kot ga zahtevajo farmacevtska, kozmetična in prehrambna industrija, pa mora imeti visoko stopnjo čistosti in je zato potrebnih več korakov čiščenja kar privede do višjih stroškov in posledično višje cene končnega izdelka (Mukherjee in sod., 2006).

2.3.6. Analitske metode določanja surfaktina

Surfaktin v gojišču najpogosteje določajo z oceno hemolitične aktivnosti, saj pri določeni koncentraciji biosurfaktanti inducirajo hemolizo zaradi njihove amfifilne narave. Hemolitično aktivnost določimo z uporabo krvnega agarja ali suspenzije rdečih krvnih celic (Moran in sod., 2002; Couette in sod., 2010). Izbrani sev se nacepi na krvni agar in se nato po določenem času inkubacije preveri pojav brezbarvnega obroča okrog kolonij kateremu se lahko izmeri premer (Couette in sod., 2010). Z uporabo suspenzije rdečih krvnih celic, ki jih dodamo v vzorec surfaktanta pa je omogočeno merjenje optične gostote vzorcev – primerjava OD mešanice brez dodanega vzorca in mešanice z dodanim vzorcem (Moran in sod., 2002). Na ta način določimo minimalno litično koncentracijo surfaktina (oz. mikroorganizma), ki je potrebna, da krvničke lizirajo. Za določanje koncentracije surfaktina v tekočih gojiščih, se tudi uporablja merjenje površinske napetosti s čimer določijo kritično micelarno koncentracijo (Shaligram in Singhal, 2010). Kot alternativo tem metodam smo mi za določanje surfaktina v vzorcih uporabili kapljični test.

2.4 APLIKACIJE SURFAKTINA V INDUSTRIJI

Zaradi velike uporabnosti biosurfaktantov in posledično veliko raziskav na tem področju lahko najdemo veliko potencialnih aplikacij, ki vključujejo njihovo uporabo. Najbolj atraktivno področje aplikacij za biosurfaktante predstavlja bioremediacija onesnažene prsti in vode z ogljikovodiki ter težkimi kovinami (Mulligan in sod., 2005; Cameotra in Makkar, 2010). Vedno več pa je zaslediti raziskav na področju medicine, farmacije in kozmetične industrije. Odkritja na medicinskem in farmacevtskem področju so pokazala možnost uporabe surfaktina kot inhibitorja tvorjenja biofilmov na površinah medicinskih pripomočkov (Mireles in sod., 2001), inaktivatorja različnih virusov (herpes in retrovirusi) ter antimikoplazemskega dejavnika (Vollenbroich in sod., 1997a, 1997b), protivnetnega dejavnika (Kim in sod., 1998), dejavnika hemolize in zaviralca tvorjenja strdkov v krvi (Rodriguez in sod., 2006). Surfaktin ima tudi potencial za zdravljenje bolezni, ki jih povzročajo komarji (malaria, encefalitis) (Das in Mukherjee, 2006). Na področju kozmetične industrije pa je surfaktin zaradi svojih lastnosti zaželen kot dodatek v raznih kozmetičnih izdelkih (Kanlayavattanakul in Lourith, 2010).

Poleg medicine, farmacije in kozmetične industrije zahteva za uporabo zelo čist surfaktin tudi prehranska industrija. Na tem področju so se raziskave osredotočile na uporabo surfaktina kot sestavine za formulacijo jedi in kot antiadhezivnega agensa ter za preprečevanje tvorjenja bakterijskih biofilmov na kuhalnih površinah (Nitschke in Costa, 2007). Kemična industrija vključuje surfaktin predvsem v aplikacije povezane z detergenti, kjer se tudi uporablja največ surfaktantov (Mukherjee, 2007). Veliko raziskav poteka tudi na področju kmetijstva, kjer dajejo največji poudarek surfaktinu za zaščito rastlin pred glivnimi boleznimi (Ongena in sod., 2005; Ongena in Jacques, 2008) ter za tretiranje glivnih in bakterijskih hokuzb rastlin (Shete in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Oprema

Preglednica 2: Laboratorijska oprema (zraven so navedeni proizvajalci), ki smo jo uporabili pri delu

Oprema	Proizvajalec
Petrijevke	Golias (Slovenija)
Pipete	Brand, Eppendorf (Nemčija)
Erlenmajerice s stranskim vratom	Brand, Schott (Nemčija)
Filtri 0, 20 (modri) in 0, 45µm (rumeni)	Sartorius (Nemčija)
Mikrotitrske plošče s 96 jamicami	Brand (Nemčija)
Centrifugirke (50 ml)	Isolab (Nemčija)
Mikrocentrifugirke (1,5 in 2 ml)	Isolab (Nemčija)

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 3: Seznam kemikalij (zraven so navedeni proizvajalci), ki smo jih uporabili pri delu

Kemikalija	Proizvajalec
Acetonitril	Sigma-Aldrich (ZDA)
Ampicilin	Sigma-Aldrich (ZDA)
Natrijev citrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$)	Merck (ZDA)
$CaCl_2 \times 2H_2O$	Sigma-Aldrich (ZDA)
Fenilalanin	Sigma-Aldrich (ZDA)
$FeSO_4 \times 7H_2O$	Merck (ZDA)
Glukoza $C_6H_{12}O_6$	Sigma-Aldrich (ZDA)
Glutaminska kislina	Sigma-Aldrich (ZDA)
Histidin	Sigma-Aldrich (ZDA)
IPTG	Sigma-Aldrich (ZDA)
Kanamicin	Sigma-Aldrich (ZDA)
Kazein hidrolizat	BD (ZDA)
KH_2PO_4	Merck (ZDA)

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3. Seznam kemikalij (zraven so navedeni proizvajalci), ki smo jih uporabili pri delu

Kemikalija	Proizvajalec
K ₂ HPO ₄	Kemika (Hrvaška)
Kloramfenikol	Sigma-Aldrich (ZDA)
Kvasni ekstrakt	Biolife (Italija)
LB agar	Sigma-Aldrich (ZDA)
LB broth	Sigma-Aldrich (ZDA)
Levcin	Merck (ZDA)
Metionin	Sigma-Aldrich (ZDA)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (ZDA)
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Merck (ZDA)
MnSO ₄ x 7H ₂ O	Merck (ZDA)
NaEDTA	Promega (ZDA)
NaCl	Merck (ZDA)
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck (ZDA)
NH ₄ Cl	Merck (ZDA)
NH ₄ NO ₃	Riedel de Haen (Nemčija)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (ZDA)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck (ZDA)
Serin	Sigma-Aldrich (ZDA)
Surfaktin, ≥98% (standard)	Sigma-Aldrich (ZDA)
Trifluoroocetna kislina	Sigma-Aldrich (ZDA)

3.1.3 Laboratorijske naprave

Preglednica 4: Seznam laboratorijskih naprav (zraven so navedeni proizvajalci), ki smo jih uporabili pri delu

Naprava	Proizvajalec
Analitska tehnica	Mettler toledo (Švica)
Avtoklav	Kambič Laboratorijska oprema (Slovenija)
Centrifuga 3K30	Sigma Laboratory Centrifuges (Velika Britanija)
Črpalka za HPLC	Knauer (Nemčija)
Digestorij	Brest Cerknica (Slovenija)
Eksikator (desiccator)	Vakuumfest (Nemčija)
Grelni blok	Stuart (Velika Britanija)
Kromatografska kolona C ₁₈	Macherey-Nagel (Nemčija)
Laminarij	ESCO (ZDA)
Magnetni mešalnik z gretjem	Tehtnica (Slovenija)
Namizna centrifuga (Centrifuge 5424)	Eppendorf (Nemčija)
pH meter	WTW (Nemčija)
Spektrofotometer MA 9510	Iskra (Slovenija)
Steklena brizga za HPLC (100 µl)	Sigma Aldrich (ZDA)
Stresalnik	Tehtnica (Slovenija)
UV/VIS detektor za HPLC	Knauer (Nemčija)
Vodna kopel	Julabo (Nemčija)

3.1.4 Bakterijski sevi

Preglednica 5: Bakterijski sevi uporabljeni v magistrskem delu

Številka seva (zbirka katedre za mikrobiologijo)	Oznaka seva	Genotip	Vir
BM1353	<i>B. subtilis</i> PS-216 (<i>srfA-cfp</i>)	<i>srfA-CFP</i> (Cm)	Oslizlo in sod., 2014
BM1365	<i>B. subtilis</i> PS-216 ΔcomQ (<i>srfA-cfp</i>)	<i>srfA-CFP</i> (Cm), comQ::Kn	Oslizlo in sod., 2014
	<i>B. subtilis</i> PS-216	divji tip (wt)	Štefanič in Mandic-Mulec, 2009
BM1400	<i>B. subtilis</i> PS-216 ΔcomQ	comQ::Kn	Oslizlo in sod., 2014
BM1418	<i>B. subtilis</i> PS-216 ΔcomQXP	ΔQXP (Kn)	Oslizlo in sod., 2014
EM1048	<i>E. coli</i> ED367	pET22(b)-168, Amp	Ansaldi in sod., 2002

Sevi *B. subtilis*, ki imajo vnešene rezistenčne markerje (rezistenca na kanamicin ali kloramfenikol) v omenjenem genu le tega ne proizvajajo. Sev *E. coli* ED367 smo uporabili kot vir signalnega peptida ComX, ki se v tej bakteriji izraža heterologno in ki smo ga dodajali v gojišče z *B. subtilis*.

V začetku izvajanja poiskusa smo uporabili seve *B. subtilis* PS-216 (*srfA-cfp*). Ta sev ima v genski zapis (v surfaktinski operon) vključen gen za CFP (ciano fluorescenčni protein), kar nam omogoča da lahko celice, ki izražajo operon *srfA* vidimo pod fluorescenčnim mikroskopom.

3.1.5 Priprava tekočih gojišč

3.1.5.1 Priprava Luria-Bertani (LB) tekočega gojišča

Uporabili smo pripravljeno mešanico LB broth (Sigma-Aldrich), ki vsebuje tripton (10 g/L), kvasni ekstrakt (5 g/L) in NaCl (5 g/L). Zatehtali smo določeno količino mešanice (20 g/L) in raztopili s pomočjo mešanja na mešalu v posodi z ustrezno količino vode ter avtoklavirali 15 minut na 121 °C. Po končanem avtoklaviranju smo pustili, da se gojišče ohladi in nato porazdelili po 25 mL gojišča v 100 mL erlenmajerice s stranskim vratom.

3.1.5.2 Priprava tekočega kompetenčnega gojišča (CM)

Za pripravo tekočega gojišča CM smo pripravili naslednje založne raztopine:

- 1 X SS raztopina

V 1000 mL destilirane vode dodamo po zapisanem vrstnem redu naslednje reagente:

- 6 g KH₂PO₄
- 14 g K₂HPO₄
- 2 g (NH₄)SO₄
- 1 g C₆H₅Na₃O₇ X 2H₂O
- 0,2 g Mg SO₄ X 7H₂O

Posamezen reagent raztopimo z mešanjem na magnetnem mešalu pred dodatkom naslednjega.

- 50 % (w/w) glukoza

V 250 mL časi zatehtamo 50 g glukoze in dodamo na tehnicu do 100 g destilirane vode. Glukozo mešamo na magnetnem mešalu s segrevanjem, da se le ta prej raztopi. Čašo lahko pokrijemo s folijo, da ne izhlapi preveč vode.

- 2 % kazein hidrolizat

Dodamo 2 g kazein hidrolizata v 100 mL dH₂O.

- 10 % kvasni ekstrakt

Dodamo 10 g kvasnega ekstrakta v 100 mL dH₂O.

- Histidin

Dodamo 1 g histidina v 100 mL dH₂O.

- Levcin

Dodamo 1 g levicina v 100 mL dH₂O.

- Metionin

Dodamo 1g metionina v 100 mL dH₂O.

- 1 M MgCl₂

Dodamo 9,51 g MgCl₂ v 100 mL dH₂O.

Pripravljene založne raztopine pred uporabo avtoklaviramo na 121 °C za 15 minut. Kvasni ekstrakt, kazein hidrolizat in aminokisline avtoklaviramo 30 min pri temperaturi 110 °C. Zmešamo naslednje količine posameznih sterilnih založnih raztopin:

- 400 mL 1X SS raztopine
- 4 mL 50 % glukoze
- 4 mL 2 % kazein hidrolizata
- 4 mL 10 % kvasnega ekstrakta
- 2 mL histidina
- 2 mL levcina
- 2 mL metionina
- 1 mL MgCl₂ (1 M)

3.1.5.3 Priprava tekočega gojišča MMS

Za pripravo tekočega gojišča MMS smo pripravili naslednje založne raztopine z navedenimi koncentracijami:

- 400 mL raztopine soli
 V 400 mL dH₂O dodamo v naslednjem vrstnem redu:
 1,60 g NH₄NO₃ (50 mM), 0,91 g KH₂PO₄ (16,7 mM), 4,75 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O (66,7 mM), 1,76 g (NH₄)₂HPO₄ (33,3 mM). Ko smo dodali posamezno komponento, smo počakali, da se raztopi preden smo dodali naslednjo. Pri tem smo si pomagali z magnetnim mešalom.
- 400 mL 0,6M glukoze
- 1 mL CaCl₂ x 2 H₂O (50 mM)
- 1 mL MnSO₄ x H₂O (40 mM)
- 1 mL NaEDTA (15 mM)
- 1 mL FeSO₄ x 7 H₂O (20 mM)
- 40 mL MgSO₄ x 7 H₂O (60 mM)

Pripravljene založne raztopine smo pred uporabo avtoklavirali na 121 °C za 15 minut. Izjema je bila raztopina FeSO₄ x 7 H₂O katero smo sterilno prefiltrirali skozi 0,25 µM filter.

Da smo dobili 25 mL končnega gojišča smo zmešali naslednje volumne založnih raztopin (navedene so tudi končne koncentracije raztopin):

- 9,2 mL glukoze (40 g/L)
- 15 mL NH₄NO₃ (30 mM), KH₂PO₄ (10 mM), Na₂HPO₄ x 2 H₂O (40 mM), (NH₄)₂HPO₄ (20 mM)
- 3,5 µL CaCl₂ x 2 H₂O (7 µM)
- 6,7 µL NaEDTA (4 µM)
- 1 mL MgSO₄ x 7 H₂O (2,4 mM)
- 10 µL FeSO₄ x 7 H₂O (0,008 mM)
- 6,25 µL MnSO₄ x H₂O (0,01 mM)

3.1.5.4 Priprava tekočega minimalnega gojišča M9 (100 mL)

M9 gojišče smo pripravili tako, da smo v 70 mL sterilne dH₂O dodali naslednje raztopine:

- 20 mL M9 soli
- 200 µL 1 M MgSO₄ x 7H₂O
- 800 µL 50 % glukoze
- 10 µL 1 M CaCl₂ x 2H₂O
- 1 mL mešanice aminokislin levcina, fenilalanina in serina (končna koncentracija v gojišču mora biti 40 µg/mL)
- 1 mL glutaminske kisline (končna koncentracija v gojišču mora biti 40 mg/mL)
- 400 µL histidina (končna koncentracija v gojišču mora biti 40 mg/mL)
- 400 µL metionina (končna koncentracija v gojišču mora biti 40 mg/mL)
- 100 µL ampicilina (koncentracija založne raztopine je 100 mg/mL)

Na koncu smo dodali še sterilno dH₂O do končnega volumna 100 mL.

3.1.5.4.1 Priprava M9 soli (100mL)

V 80 mL dH₂O smo dodali po vrstnem redu naslednje reagente:

- 6,4 g Na₂HPO₄ X 7H₂O
- 1,5 g KH₂PO₄
- 0,25 g NaCl
- 0,5 g NH₄Cl

Posamezni reagent smo raztopili z mešanjem na magnetnem mešalu pred dodatkom naslednjega. Na koncu smo dolili dH₂O do 100 mL in avtoklavirali 15 minut na 121°C.

3.1.5.5 Priprava 1 % amonijevega hidroksida

K 71,5 mL dH₂O smo dodali 28,5 mL NH₄OH.

3.1.6 Priprava trdih LB agarnih plošč brez in z različnimi antibiotiki

Za pripravo trdih LB plošč smo uporabili LB agar (35 g/L). Po avtoklaviranju (15 minut na 121 °C) smo gojišče prenesli v vodno kopel na 55 °C. V ohlajeno gojišče smo nato po potrebi dodali določeno vrsto antibiotika (preglednica 6). Zatem smo gojišče razlili v petrijevke in pustili do naslednjega dne, da se strdi. Pripravljene plošče smo hranili na temperaturi 4 °C.

Preglednica 6: Seznam bakterijskih sevov glede na odpornost na posamezen antibiotik. Navedene so tudi končne koncentracije posameznega antibiotika v trdnem gojišču.

Številka seva (zbirka katedre za mikrobiologijo)	Bakterijski Sev	Antibiotik in ustrezna končna koncentracija
BM1353	<i>B. subtilis</i> PS-216 (<i>srfA-cfp</i>)	Kloramfenikol 5µg/mL
BM1365	<i>B. subtilis</i> PS-216 ΔcomQ (<i>srfA-cfp</i>)	Kloramfenikol 5µg/mL
BM1400	<i>B. subtilis</i> PS-216 ΔcomQ	Kanamicin 5µg/mL
BM1418	<i>B. subtilis</i> PS-216 ΔcomQXP	Kanamicin 5µg/mL
EM1048	E. coli ED367	Ampicilin 0,2 mg/mL
	<i>B. subtilis</i> PS-216 (wt)	brez antibiotika

3.2 METODE

3.2.1 Merjenje optične gostote bakterijskih kultur pri 650 nm

Za spremeljanje rasti bakterijskih kultur smo merili optično gostoto pri valovni dolžini 650 nm. Uporabljali smo erlenmajerice s stranskim vratom.

3.2.2 Priprava prekonočne kulture *B. subtilis*

Sterilno tekoče gojišče LB smo porazdelili v erlenmajerice po 25 mL. Nato smo v posamezne erlenmajerice z inokulacijsko zanko nacepili določene seve bakterij, ki smo jih kultivirali na trdnem gojišču LB. Tako pripravljene kulture smo stresali pri 200 rpm in 28°C čez noč (16 ± 1 ura). Prekonočno kulturo smo naslednji dan uporabili za nadaljnje delo.

3.2.3 Pridobitev izrabljenih gojišč *B. subtilis*

Pridobljeno prekonočno kulturo smo naslednji dan uporabili kot inokulum. V erlenmajerice s stranskim vratom smo porazdelili po 25 mL gojišča CM ali MMS. Za vsak bakterijski sev smo uporabili po dve erlenmajerici. V posamezno erlenmajerico smo nato dodali 2 % (0, 5 mL) ustreznega inokuluma posameznih bakterijskih sevov. Pripravljene kulture smo inkubirali na 28 °C ter stresali na stresalniku pri hitrosti 200 rpm. Vsako uro inkubacije smo pomerili optično gostoto. Ko so bakterije dosegle stacionarno fazo smo ustavili inkubacijo. Ob določenih časovnih točkah rasti bakterij, ki smo jih določili glede na potek posameznega eksperimenta, smo odvezeli iz erlenmajeric nekaj mL (približno 2–3 mL) gojišča in ga prenesli v centrifugirke. Vzorce smo potem obdelali kot je opisano v točki 3.2.5.

3.2.4 Priprava bakterijske kulture *E. coli* za pridobitev peptida ComX

Pripravljeno gojišče LB z ampicilinom smo porazdelili po 25 mL v erlenmajerice s stranskim vratom. Za pripravo prekonočne kulture smo kolonije seva *E. coli* ED367 s trdnega gojišča LB agar z inokulacijsko zanko precepili v 25 mL tekočega gojišča LB. Tako pripravljeno kulturo smo dali stresati čez noč na 37 °C pri 200 rpm. Sev *E. coli* ED367 sintetizira feromon ComX, ker nosi plazmid z geni *comQ* in *comX*. Ker so ti geni pod uravnavo *lac* promotorja dosežemo z dodatkom IPTG-ja v gojišče povečano ekspresijo *comQX* in s tem sintezo peptida ComX, ki se izloča v gojišče (Ansaldi in sod., 2002).

Naslednji dan smo v dve 250 mL erlenmajerici s stranskim vratom porazdelili po 50 mL gojišča M9 z dodanimi ampicilinom. V vsako smo nacepili 1 % inokulum prekonočne kulture *E. coli* ED367 in dali stresati na 37 °C pri 200 rpm. Ko je bakterijska kultura dosegla $OD_{650} = 0,7$ a.e., smo dodali v obe erlenmajerici 250 μ L 100 mM IPTG ki inducira nastajanje signalnega peptida ComX. Po dodatku IPTG smo bakterijske kulture še štiri ure inkubirali pri istih pogojih kot prej. Sledilo je centrifugiranje 5 minut pri 8000 x g. Supernatant smo nato sterilno prefiltrirali v falkonke in jih ustrezeno označili. Pridobljena izrabljena gojišča smo hranili v hladilniku na 4 °C do uporabe (izolacija ComX s HPLC).

3.2.5 Priprava vzorcev za merjenje koncentracije surfaktina v izrabljenem gojišču

3.2.5.1 Metoda s filtriranjem izrabljenega gojišča *B. subtilis*

Bakterijske seve smo nagojili v gojišču CM ali MMS. Iz erlenmajeric s stranskim vratom smo sterilno prenesli nekaj mililitrov gojišča v centrifugirke in s centrifugiranjem (10 minut pri 4 °C pri 8200 rpm) sedimentirali bakterijske celice in jih tako ločili od gojišča. Pridobljen supernatant (izrabljeno gojišče) smo sterilno prefiltrirali skozi 0.20 µm oziroma 0.45 µm filtre (odvisno od gostote gojišča) v nove sterilne centrifugirke. Vzorce smo shranili do nadaljnje uporabe pri 4 °C.

3.2.5.2 Metoda z dodajanjem etanola v izrabljeno gojišče *B. subtilis*

Iz erlenmajeric s stranskim vratom smo sterilno odvzeli 400 - 500 µL izrabljenega gojišča MMS v 2 mL mikrocentrifugirke. Dodali smo 1200 - 1500 µL hladnega 96% etanola (trikratni volumen vzorca), ki ga pred uporabo hranimo v zamrzovalniku. Surfaktin je topen v nekaterih organskih topilih, tudi v etanolu (Abdel-Mawgoud in sod., 2008). Biomasa se skupaj s polimeri obori. Oborino ločimo od supernatanta s centrifugiranjem na 4 °C za 10 min pri 20.000 rcf. Pridobljen supernatant smo prenesli v nove sterilne mikrocentrifugirke. Medtem smo segreli termoblok na 50 °C in vanj položili mikrocentrifugirke s supernatantom ter jih segrevali par minut. Po prenosu v eksikator (ustvarimo vakuum) smo mikrocentrifugirko odprli, tako da je izhlapel ves etanol, ki je predstavljal 3/4 celotnega volumna. Vzorce smo pustili toliko časa v eksikatorju, da je ostalo v epicah približno 1/4 začetnega volumna. Vzorce smo shranili do nadaljnje uporabe pri 4 °C.

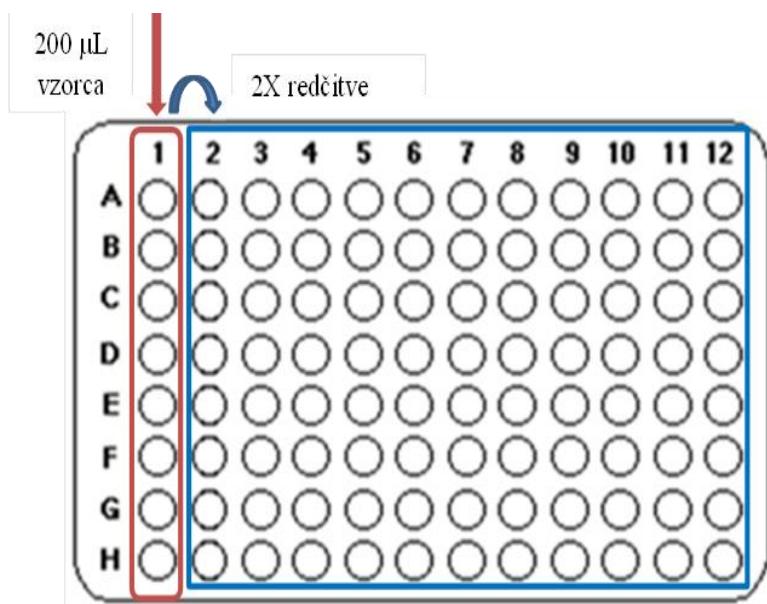
3.2.6 Kapljični test

Za izvedbo kapljičnega testa smo uporabili vzorce, ki so bili pripravljeni s filtriranjem ali z dodajanjem etanola v izrabljeno gojišče CM ali MMS. Vzorce smo pridobili ob določenem času gojenja sevov *B. subtilis*, ki smo ga sami določili glede na potrebe poizkusa (4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h ali 13 h). Za izvedbo testa potrebujemo:

- Kos parafilma
- Bel papir
- Mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami
- Gojišče za razredčitve
- Vzorec

V prvo luknjo ene vrstice mikrotitrske plošče smo vnesli 200 µL izrabljenega gojišča. Nadaljnje luknjice celotne vrste (od 2-12) smo napolnili z 100 µL gojišča. Prenesli smo 100 µL izrabljenega gojišča v naslednjo luknjico ter nato iz te v naslednjo in nadaljevali

postopek skozi celotno vrsto mikrotitrskih plošč. To pomeni, da smo vzorec vseskozi redčili za faktor 2. Pri večjih koncentracijah surfaktina smo lahko redčili vzorec za faktor 1,5 in temu primerno prilagodili volumne gojišč v posamezni luknji (od 2-12) mikrotitrskih plošč (slika 6).



Slika 6 : Prikaz priprave redčitev vzorcev izrabljenega gojišča *B. subtilis* v mikrotitrski plošči za izvedbo kapljičnega testa

Na hidrofobno površino (kos parafilma), prilepljeno na bel papir smo nanašali kapljice. Iz posameznih luknenj mikrotitrskih plošč smo vzeli po $30\mu\text{L}$ vzorca in nanesli na površino parafilma, kjer nastanejo »kapljice«. Ker je surfaktin surfaktant, se kapljice na površini parafilma razširijo, kjer je le ta prisoten. Nanešene kapljice v katerih ni prisotnega surfaktina pa ostanejo tesno skupaj zaradi hidrofobnih interakcij med tekočino in površino. Tako dobimo informacijo v katerih vzorcih je prisoten surfaktin in lahko približno ocenimo tudi koliko ga je.

3.2.7 Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC)

Vzorce, ki smo jih pripravili s filtriranjem oz.obarjanjem z etanolom smo nadalje uporabili za analizo z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Uporabili smo HPLC z reverzno fazo (*ang. reversed phase HPLC*). Za to je značilno, da je stacionarna faza nepolarna in mobilna faza polarna. Uporabili smo analizno kolono na osnovi silikagela na katerega so pritrjene oktadecilne alkilne skupine (C18). Predhodno smo pripravili tudi topila (dve komponenti mobilne faze) za izolacijo surfaktina (opisano v točki 3.2.7.1). Pred injiciranjem vzorca je bilo potrebno sprati kolono, da so se odstranile iz nje vse nezaželene spojine, ki bi motile analizo vzorcev. Sprali smo tudi injicirno zanko za vzorec.

Sterilno smo odvzeli 50 µL pripravljenega vzorca in ga prenesli v novo epico. Nato smo dodali 200 µL topila sestavljenega iz 100 % acetonitrila (ACN) in 0,1 % trifluoroacetne kisline (TFA) (priprava opisana pod točko 3.2.5.1.2). Vsebino mikrocentrifugirke smo dobro premešali in dali centrifugirati za 10 minut na 12000 rpm. Supernatant smo nato prenesli v nove mikrocentrifugirke in hranili na 4°C do uporabe. Za analizo smo odvzeli približno 40 µL vzorca z brizgo za injiciranje vzorcev in ga vbrizgali v 20 µL zanko.

Za pridobitev kromatogramov vzorcev s surfaktinom smo uporabili aplikacijo Eurochrom in v njen nastavljen program (priloga A). V programu so določeni parametri kot so čas (min) trajanja izolacije surfaktina, pretok mobilnih faz (mL/min), odstotek pretoka posamezne mobilne faze ter valovna dolžina merjenja absorbance (nm). V našem primeru je potekala analiza vzorcev 35 minut pri pretoku mobilne faze 1 mL/min. Skozi črpalko A smo črpali mobilno fazo sestavljeno iz 100% ACN + 0.1% TFA, skozi črpalko B pa 20 % ACN + 0.1 % TFA (za pripravo mobilnih faz glej točko 3.2.7.1.). Eluirano snov iz kolone smo merili z UV detektorjem pri valovni dolžini 205 nm. Na koncu smo dobili kromatogram posameznega vzorca.

Da smo lahko primerjali kromatograme vzorcev smo čez kolono spustili standard surfaktina (Sigma Aldrich) s koncentracijo 0,5 mM. Molekulska masa surfaktina je 1036.34 g/mol in ima ≥ 98 % čistost. Standard smo pripravili tako, da smo zmešali 4 µL založne raztopine standarda, 4 µL H₂O in 32 µL ACN. Tako smo pridobili referenčni kromatogram, ki nam je služil kot osnova za izračune koncentracij surfaktina v vzorcih. S primerjavo površine vrhov standarda surfaktina in površine vrhov posameznih vzorcev smo določili približno koncentracijo surfaktina v vzorcih. Pri površini vrhov standarda surfaktina smo upoštevali, da približno 98 % vse površine vrhov na kromatogramu predstavlja standard surfaktina, saj je navedeno, da je čistost standarda 98 %. Koncentracije surfaktina smo preračunali na naslednji način:

$$C_{vz.} = \frac{P_{stan.} \times C_{stan.}}{P_{vz.}} \times M_{srf} \quad \dots (1)$$

Pomen oznak:

C_{vz.} : masna koncentracija analiziranega vzorca

C_{stan.} : molska koncentracija standarda surfaktina

P_{vz.} : površina analiziranega vzorca

P_{stan.} : površina standarda surfaktina

M_{srf}: molska masa surfaktina (empirična formula surfaktina je C₅₃H₉₃N₇O₁₃)

Ustrezno še upoštevamo zraven redčitve in koncentriranja vzorcev.

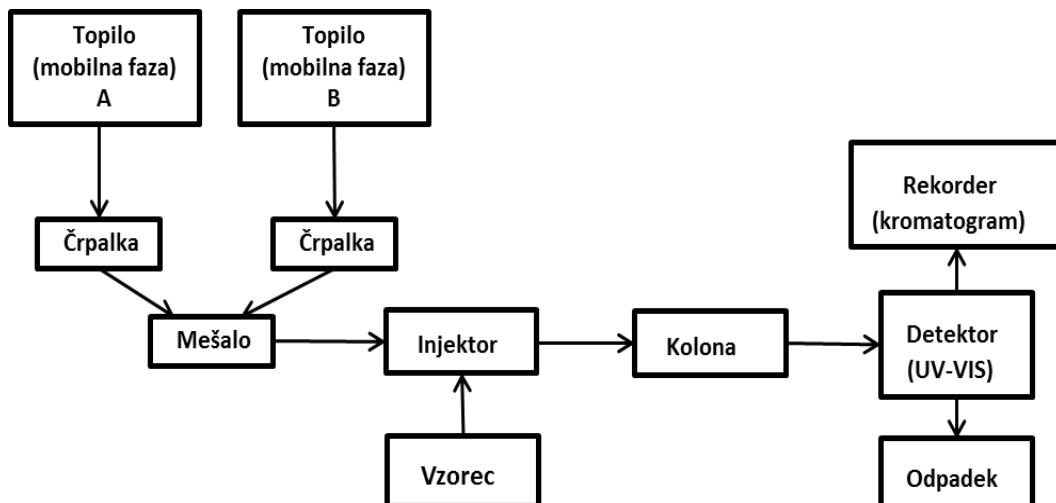
3.2.7.1 Priprava mobilnih faz

3.2.7.1.1 Mobilna faza iz 20 % ACN in 0.1 % TFA (črpalka B)

V 500 mL posodo smo odtehtali 90 g dH₂O. V majhno erlenmajerico smo odtehtali 9 g dH₂O in tarirali analitsko tehtnico. Dodali smo 0.5 g TFA (350-370 µl) in prekrili erlenmajerico s parafilmom, da smo preprečili izhlapevanje TFA. Vsebino erlenmajerice smo zlili v posodo z vodo. Erlenmajerico smo sprali s takšnim volumnom dH₂O, ki smo ga dobili, če smo od 1 mL odšteli volumen dodane TFA (1 mL - V_{TFA}) in zlili v posodo z vodo. Nato smo odtehtali 77,67 g ACN (približno 100 mL) in ga dodali v posodo z vodo. Na koncu smo dobro premešali, da ni bilo več vidne interfaze med ACN in vodo. Tako pripravljeno mobilno fazo smo priklopili na črpalko B v HPLC sistemu.

3.2.7.1.2 Mobilna faza iz 100 % ACN in 0.1 % TFA (črpalka A)

V 500 mL posodo smo odtehtali 153,786 g ACN. V epico smo odtehtali 1 g (1 mL) dH₂O in tarirali analitsko tehtnico. Nato smo dodali v epico 0,2 g TFA (140 µL – 150 µL). Vsebino mikrocentrifugirke smo zlili v posodo z ACN. Epico smo sprali s takšnim volumnom dH₂O, ki ga smo ga dobili, če smo od 1 mL odšteli volumen dodane TFA (1 mL - V_{TFA}) in zlili v posodo z ACN. Na koncu smo posodo dobro premešali. Tako pripravljeno mobilno fazo smo priklopili na črpalko A v HPLC sistemu. Obe pripravljeni mobilni fazi prekrijemo z aluminijasto folijo, saj je TFA občutljiv na svetlobo.



Slika 7: Diagram poteka delovanja sistema HPLC, ki smo ga uporabili za analizo surfaktina

3.2.8 Dodajanje in izolacija zunanjega signala ComX s HPLC

Zunanji signal ComX, ki sodeluje pri sintezi surfaktina smo izolirali iz izrabljenega gojišča rekombinantnega seva *E. coli* ED367. Izrabljeno gojišče smo odlili v centrifugirko (približno 4 mL) in dodali tolikšno količino 10 % TFA, da smo dobili pH vrednost vzorca okrog 2. Ta volumen je predstavljal 4/5 volumna končnega vzorca, ki ga nanesemo na HPLC. Nato smo dodali v vzorec še tolikšen volumen 100 % ACN, da je predstavljal preostalo 1/5 volumna končnega vzorca, ki ga nanesemo na HPLC. Pripravljen vzorec smo vbrizgali v 5 mL zanko na HPLC. Za gradientno izolacijo ComX iz izrabljenega gojišča *E. coli* smo uporabili aplikacijo Eurochrom. Med izolacijo se odstotek posamezne mobilne faze v pretoku spreminja (priloga B), program omogoča tudi nastavitev parametrov, kot so čas trajanja analize vzorca (65.40 min), pretok mobilnih faz (1 mL/min), valovne dolžine absorbance (214 nm) pri kateri izvajamo meritve. Skozi črpalko A smo črpali mobilno fazo sestavljeno iz 100 % ACN + 0.1 % TFA, skozi črpalko B pa 20 % ACN + 0.1 % TFA. S pomočjo kromatograma smo spremljali potovanje vzorca skozi kolono in zbirali frakcije volumna 1 mL v časovnih točkah kjer se je nahajal ComX (priloga C) in smo jih predhodno empirično določili z uporabo sevov biosenzorjev.

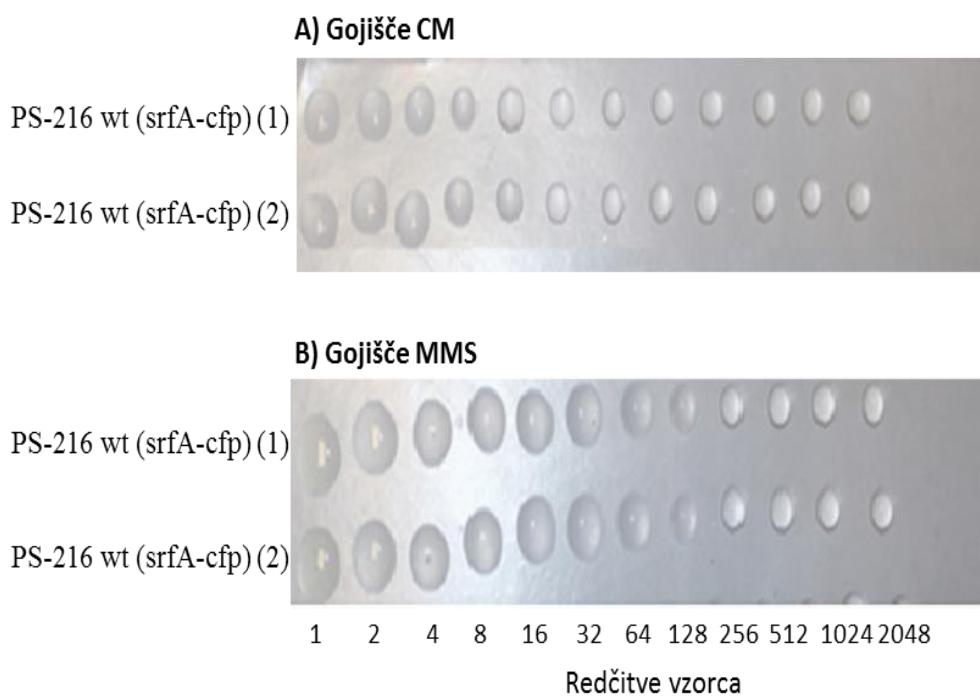
Izolirani frakciji (1 mL) smo dodali 50 µl HN₄OH in mikrocentrifugirko prenesli v eksikator, da je izhlapel acetonitril (ostane naj približno 600 µL vzorca). S tem smo vzorec koncentrirali. Na koncu smo imeli vzorec ComX s koncentracijo 1,5 µM, ki pa smo ga glede na zasnovno poskusa po potrebi tudi dvakrat redčili (koncentracija ComX 0,75 µM). Za redčitve smo uporabili gojišče MMS ali pa samo raztopino soli, katera je glavni sestavni del gojišča MMS. Pripravljen vzorec smo ustreznno porazdelili v erlenmajerice, ki so vsebovale kulture *B. subtilis* v gojišču MMS.

4 REZULTATI

V tej točki so prikazani rezultati magistrskega dela v okviru katerega smo primerjali izločanje surfaktina pri sevih *B. subtilis* v gojišču CM (opisano v Albano in sod., 1987) in gojišču MMS. Sestavo slednjega smo ga povzeli iz članka (Wei in sod., 2007). Rast bakterijskih kultur smo spremljali preko merjenja absorbance, za vrednotenje količine surfaktina v gojišču smo uporabili kapljični test in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

4.1 PRIMERJAVA METOD ZA DETEKCIJO IN DOLOČANJE KONCENTRACIJE SURFAKTINA

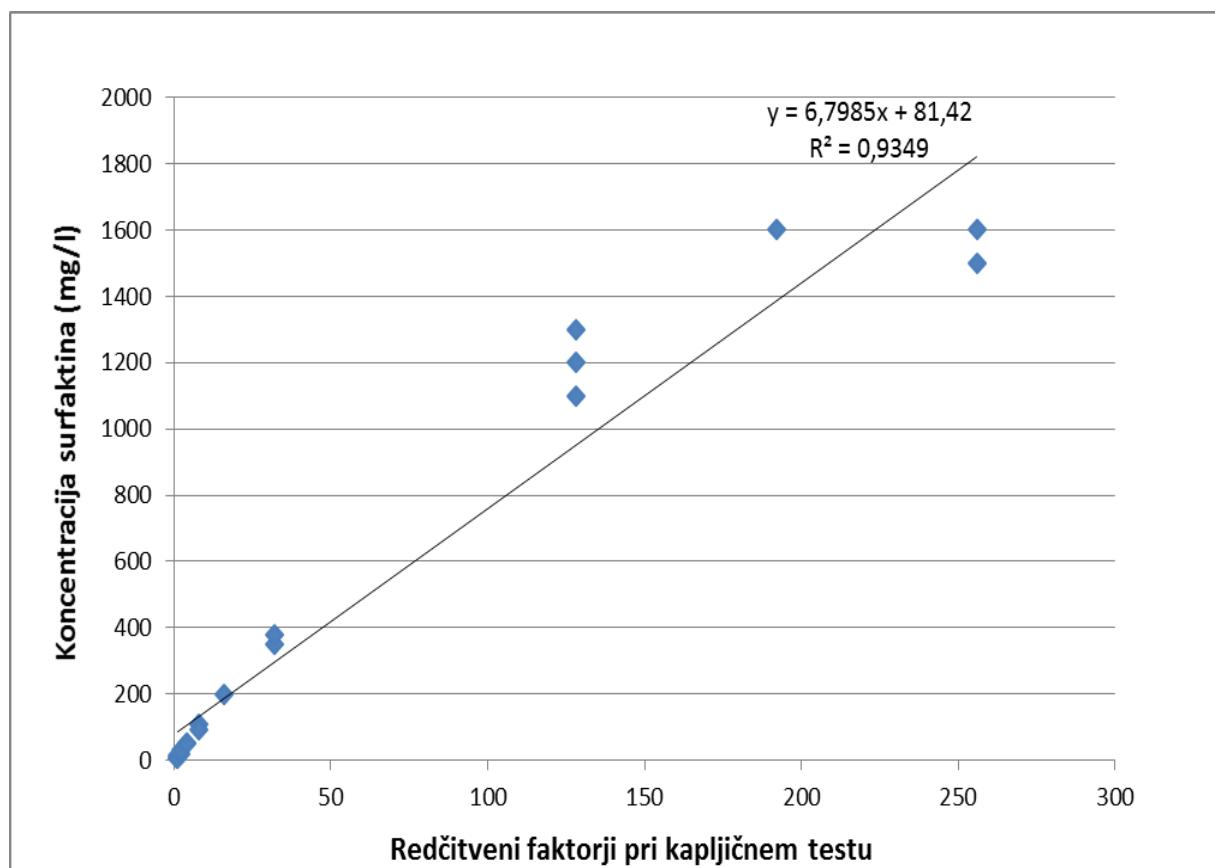
Na sliki 8 so prikazani rezultati vrednotenja surfaktina s kapljičnim testom.



Slika 8: Rezultati kapljičnega testa vzorcev izrabljenega gojišča seva *B. subtilis* PS-216 wt (*srfA-cfp*), ki smo ga gojili v gojišču CM in MMS. Vzorce smo odvzeli po 48 h, jih filtrirali in nato redčili. Prva kaplja predstavlja neredčen vzorec, nato sledijo redčitve vzorcev za faktor 2. Na parafilm smo nanesli kapljice (30 µL) posameznih redčitev vzorcev. Prikazani so rezltati dveh bioloških ponovitev.

Uporabili smo vzorce surfaktina iz izrabljenih gojišč CM in MMS. Z redčenjem vzorca se koncentracija surfaktina postopno niža, kar opazimo kot bolj dvignejeno in zato manjšo kapljico. Koncentracijo surfaktina smo nato v vzorcih kvantitativno določili z metodo HPLC. S primerjavo kromatogramov standarda za surfaktin (slika 13) in vzorcev (primer kromatogramov vidimo na slikah 14-16) smo lahko izračunali približno koncentracijo

surfaktina v posameznem vzorcu. Korelacija med rezultati pridobljenimi s kapljičnim testom in s HPLC je prikazana na sliki 9.

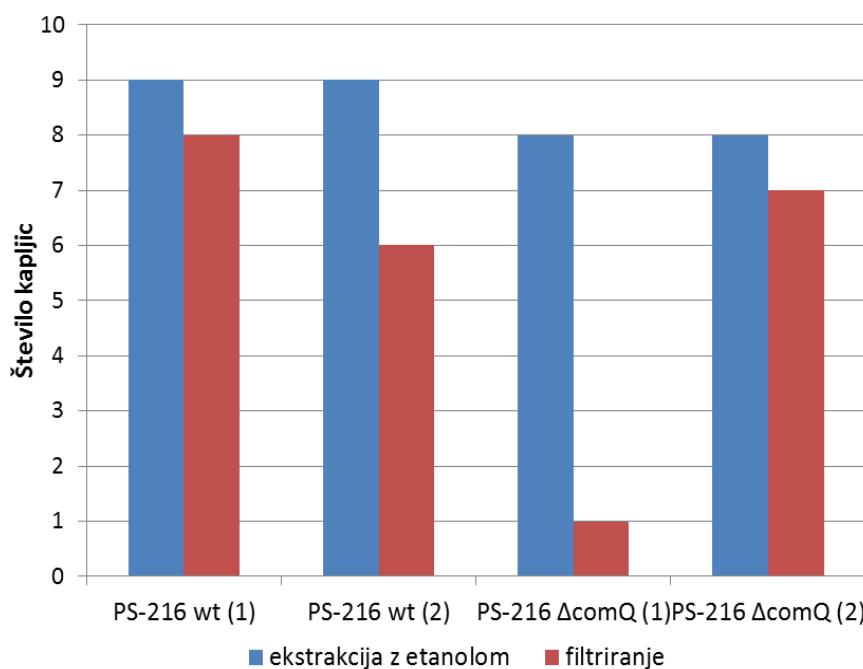


Slika 9: Prikaz korelacije med oceno oziroma meritvami količine surfaktina pridobljenimi s kapljičnim testom oziroma s HPLC. Graf smo pridobili z analizo podatkov količine surfaktina pridobljenih iz vzorcev naslednjih sevov *B. subtilis*: PS-216 wt, PS-216 ΔcomQ in PS-216 ΔcomQXP. Vse seve smo gojili v gojišču MMS v dveh bioloških ponovitvah. Vzorce izrabljenih gojišč smo jemali v času 4h, 6h, 8h, 10h, 12h in 13h. Vzorce pridobljene ob navedenih časovnih točkah smo analizirali s kapljičnim testom in HPLC. Rezultate smo uporabili za analizo in so prikazani na grafu. Na x-osi so prikazane vrednosti redčitev pri izvedbi kapljičnega testa. Uporabili smo naslednje redčitve vzorcev: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 192, 256, 512, 1024 in 2048. Če je bil vzorec bolj redčen, pomeni, da je vseboval večjo koncentracijo surfaktina. Y-os prikazuje vrednosti koncentracij surfaktina (mg/l) izmerjenih s HPLC. Izbrali smo vse rezultate koncentracij surfaktina (mg/l) pri določeni redčitvi in izračunali povprečje vseh teh koncentracij surfaktina. Npr. pri vzorcu redčenem 256-krat (pri tej redčitvi je bila zadnja »razlezena« kapljica) smo primerjali vse vrednosti koncentracij surfaktina pridobljenih s HPLC in izračunali njihovo povprečje. Koeficient korelacijske med obema spremenljivkama je $R^2=0,9349$ kar nakazuje na močno povezanost med rezultati pridobljenimi s kapljičnim testom in z metodo HPLC.

4.2 OPTIMIZACIJA METODE ZA PRIDOBITEV DELNO OČIŠČENEGA SURFAKTINA

V osnovi smo si zastavili, da bomo izrabljeno gojišče *B. subtilis* najprej centrifugirali in nato filtrirali (točka 3.2.5.1). Pri tem smo naleteli na težave, saj je bilo gojišče že ob pipetiranju zelo viskozno in je bila verjetno zato filtracija skozi filtre 0,45 µm in 0,22 µm težavna. Ta težava ni bila prisotna v zgodnjih fazah rasti, pojavila se je po 24 urah rasti. Enak problem se je pojavil pri vzorcih odvzetih po 48 urah. Pri mutanti *B. subtilis* PS-216 ΔcomQ (sev BM1400) je bilo gojišče bolj viskozno šele po 2-3 dneh gojenja bakterije. Ta lastnost je bila izrazito opazna pri gojenju bakterij v gojišču MMS in ne v CM.

Zaradi povečane visokoznosti smo zaznali izgube vzorca po filtraciji (slika 10 – rdeči stolpci). Te izgube smo obšli, če smo izpustili stopnjo filtracije in surfaktin ekstrahirali s hladnim etanolom (slika 10 - modri stolpci). Pri tem postopku se je povečala tudi ponovljivost meritve.

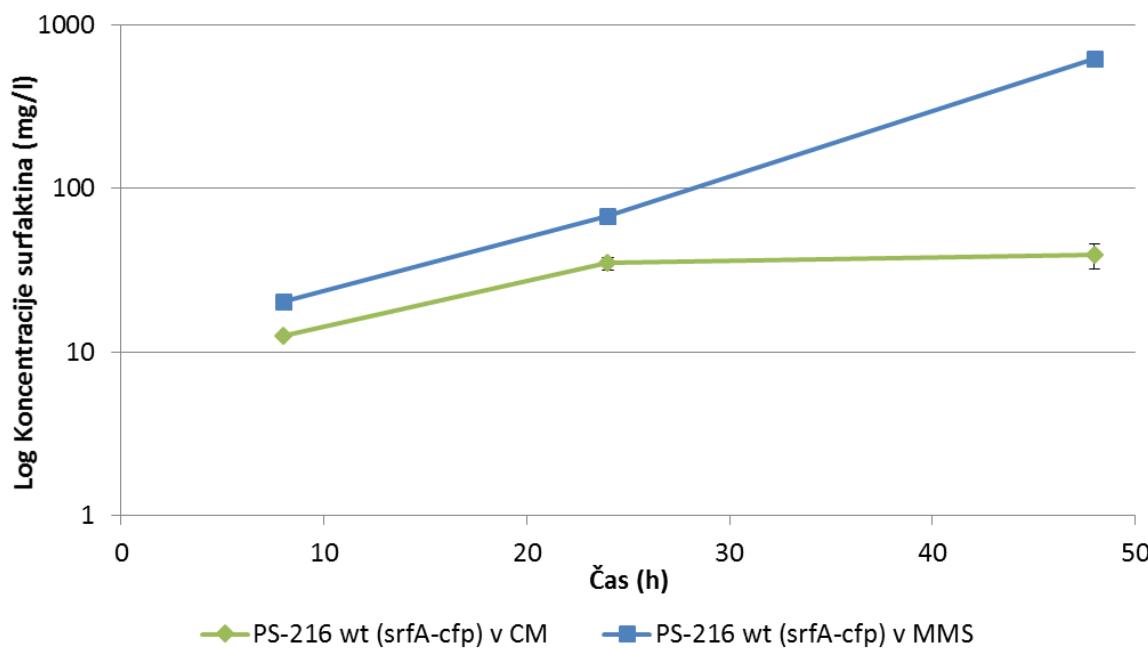


Slika 10: Primerjava koncentracije surfaktina v vzorcih gojišča MMS ekstrahiranih z etanolom (modri stolpci) ali filtriranih (rdeči stolpci). Količino surfaktina smo ovrednotili s kapljičnim testom. Primerjali smo kulturi *B. subtilis* PS216 wt in PS216 ΔcomQ po 24 ur gojenja. Obe kultri smo gojili v dveh bioloških ponovitvah. Iz grafa lahko razberemo, da so rezultati med ponovitvama istih sevov zelo variabilni, če smo vzorce filtrirali. Variabilnost smo zmanjšali z ekstrakcijo z etanolom. Na y-osi so podani rezultati kapljičnega testa; število kapljic se nanaša na to v koliko zaporednih redčitvah vzorcev (redčimo za faktor 2), ki jih nanašamo kot kapljice na parafilm, je bil še prisoten surfaktin. Prisotnost surfaktina se opazi po tem, da se kapljice »razlezejo« po površini parafilma.

4.3 PRIMERJAVA DVEH GOJIŠČ ZA PRODUKCIJO SURFAKTINA

Koncentracijo surfaktina smo izmerili v gojišču CM in MMS seva *B. subtilis* PS-216 wt (*srfA-cfp*) (BM1353) v treh različnih točkah rasti (8 h, 24 h in 48 h) in dveh biološko neodvisnih ponovitvah. Vzorce smo pred analizo s HPLC filtrirali. Ugotovili smo, da v gojišču MMS po 24 urah nastane več surfaktina kot v gojišču CM, kjer se po 48 urah koncentracija ni več bistveno spremenila (slika 11).

V prvi meritveni točki (8h) ni večjih razlik med obema gojiščema, ko smo v gojišču CM izmerili 13 mg/L surfaktina, v gojišču MMS pa 21 mg/mL. S časom (24 h) se je razlika povišala: v gojišču MMS (68 mg/L), v gojišče CM (32 mg/L). Po 48 h gojenja je bila razlika v koncentraciji surfaktina največja: v gojišču MMS 622 mg/L surfaktina, v gojišču CM pa le 33 mg/L. Razlike v koncentraciji surfaktina med obema gojiščema so vidne tudi s kapljični testom (slika 8) v časovni točki 48h.

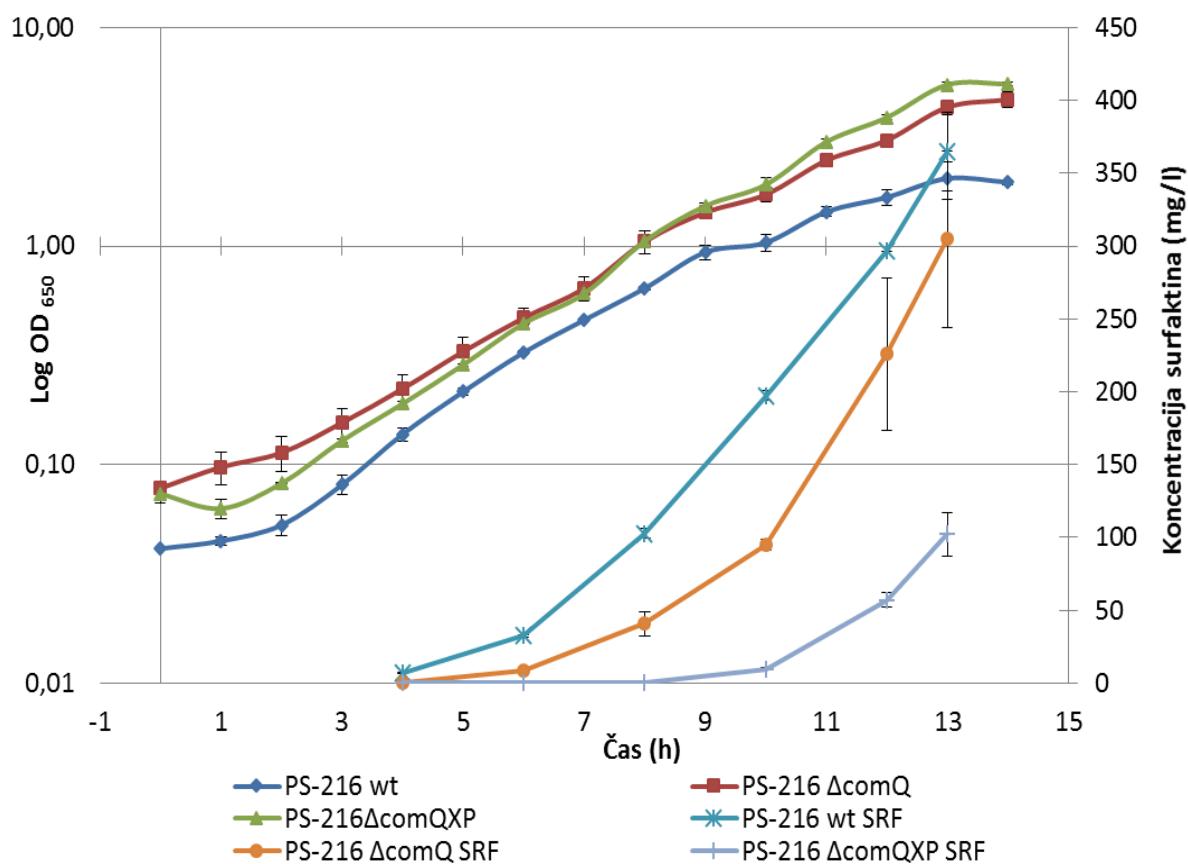


Slika 11: Primerjava koncentracij surfaktina (mg/l), ki jih je sintetiziral sev *B. subtilis* PS-216 wt (*srfA-cfp*) v gojišču CM in MMS. Seve smo gojili v dveh ponovitvah. Vzoreci so bili odvzeti po 8 h, 24 h in 48 h gojenja bakterijske kulture. Vzorce gojišča s surfaktinom smo pridobili s filtriranjem. Prisotnost surfaktina smo preverili z kapljičnim testom in izmerili njegovo koncentracijo z metodo HPLC.

4.4 PRODUKCIJA SURFAKTINA IN RAST SEVOV *B. subtilis* V GOJIŠČU MMS

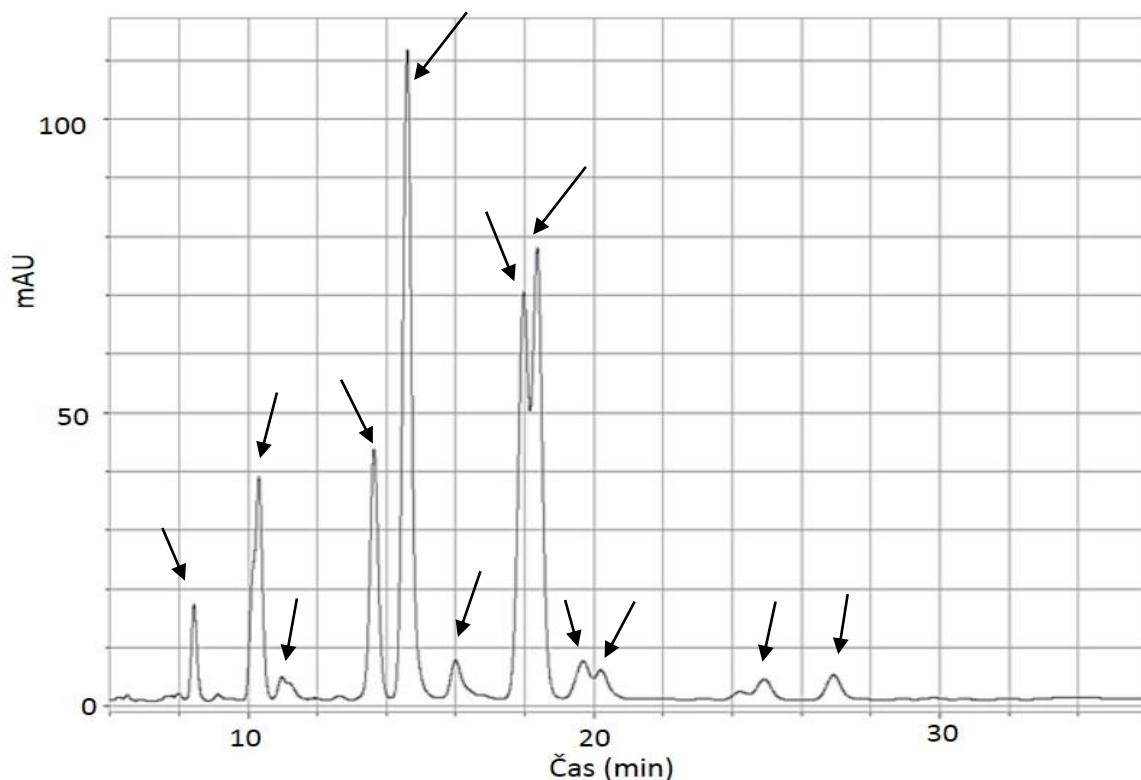
Znano je, da sistem za zaznavanje kvorum ComQXPA pozitivno uravnava operon srfA (Nakano in sod., 1992) in zato smo pročakovali nižjo produkcijo surfaktina v sevih, ki imajo okvarjen *comQ* ozziroma *comQXP*. Tri seve PS-216 wt, PS-216 Δ*comQ* (BM1400) in PS-216 Δ*comQXP* (BM1418) smo gojili v gojišču MMS in ob različnih časih (4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h in 13 h) izmerili količino surfaktina s HPLC v z etanolom ekstrahiranih vzorcih gojišča.

Rezultati so pokazali (Slika 12), da sevi, ki vsebujejo mutacije v genih za zaznavanje kvorum začnejo proizvajati surfaktin kasneje kot divji tip. Razlike so bile vidne že ob prvi meritvi, pri čemer je trojna mutanta PS-216 Δ*comQXP* producirala surfaktin v merljivih količinah šele po 10 h gojenja (približno 10 mg/L). Pri vseh treh sevih je koncentracija surfaktina skozi celoten proces gojenja naraščala. Največ surfaktina je bilo vedno prisotnega v gojišču divjega tipa (350 – 400 mg/L), ki smo ga izmerili v vzorcu odvzetem po 13 urah rasti. Vendar so se v zadnjih točkah po 12 – 13 h rasti vrednosti koncentracij surfaktina pri mutanti PS-216 Δ*comQ* zelo približale vrednostim divjega tipa. V mutanti PS-216 Δ*comQXP* je bila koncentracija surfaktina tudi po 13 h znatno nižja kot pri ostalih dveh sevih (približno 100 mg/L) (Slika 12).

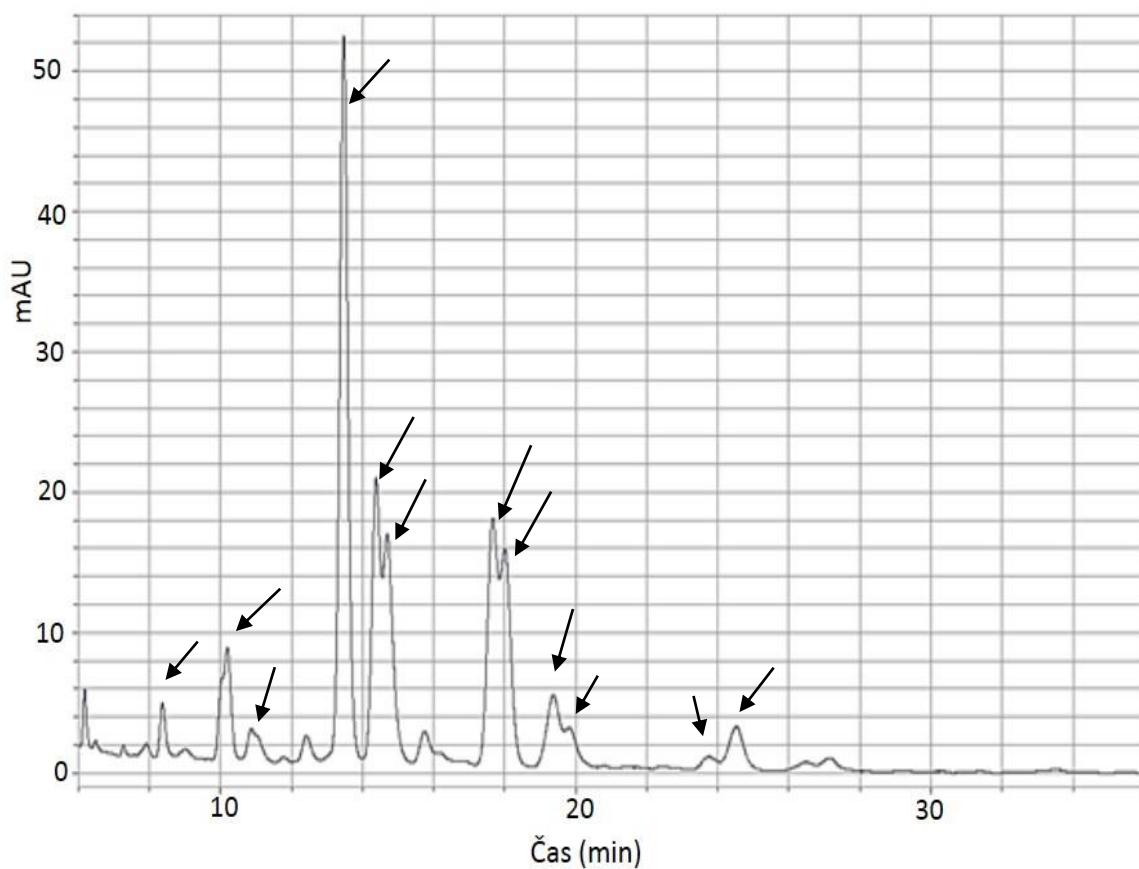


Slika 12: Prikaz rastnih krivulj in spremenjanja koncentracije proizvedenega surfaktina treh različnih sevov *B. subtilis* (PS-216 wt, PS-216 ΔcomQ in PS-216 ΔcomQXP) v gojišču MMS. Izmerjene vrednosti OD₆₅₀ so prikazane v logaritemski skali. Na sekundarni y-osi so prikazane koncentracije surfaktina (mg/l). V legendi na grafu so koncentracije surfaktina (mg/l) označene kot PS-216 wt SRF, PS-216 ΔcomQ SRF in PS-216 ΔcomQXP SRF. Vzorce smo pripravili z obarjanjem z etanolom in določili njihovo koncentracijo (mg/l) z metodo HPLC. Prikazano je povprečje (vrednosti OD₆₅₀ in koncentracija surfaktina) dveh rezultatov, ki smo jih pridobili z analizo posameznih sevov, ki smo jih gojili v paralelkah.

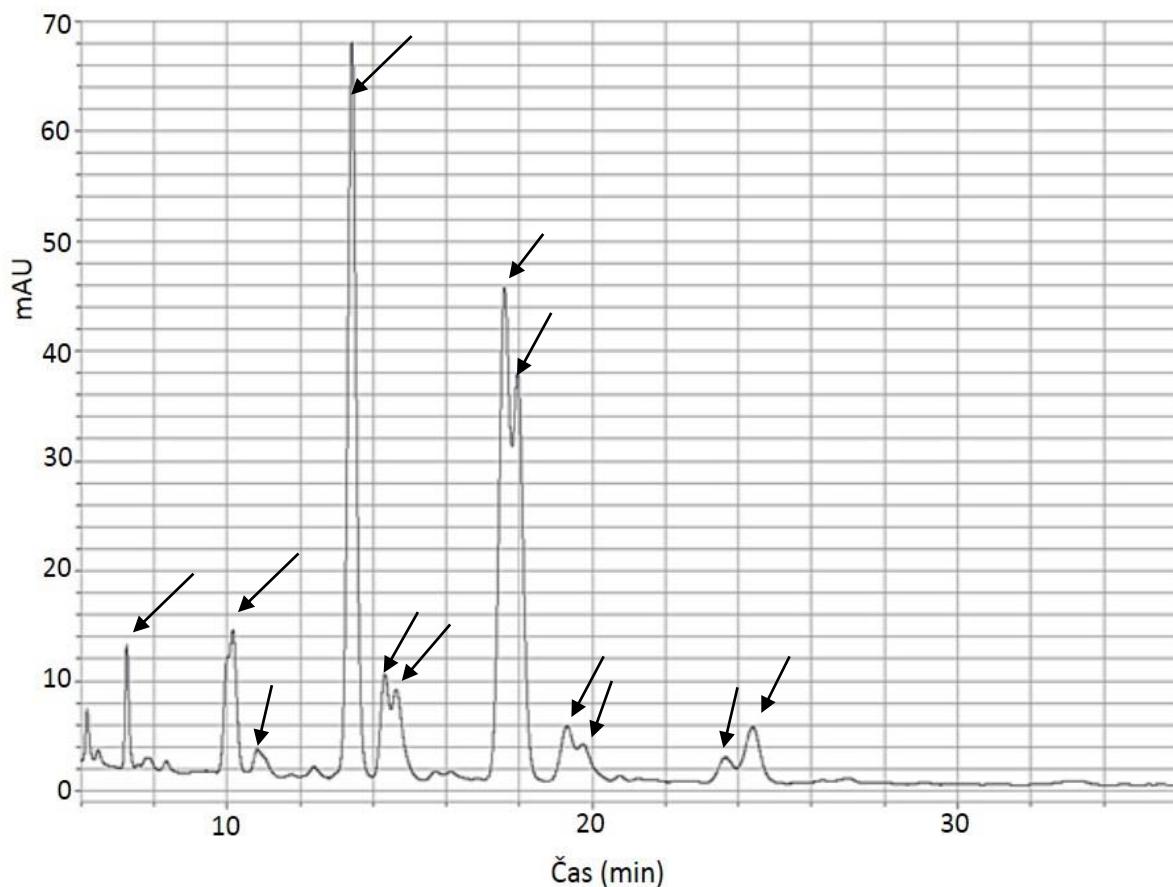
V nadaljevanju so prikazane slike kromatogramov standarda surfaktina (slika 13) in surfaktina, ki smo ga sami pridobili z gojenjem sevov *B. subtilis* v gojišču MMS. Vzorce smo odvzeli po 24 urah, oborili z etanolom in analizirali s HPLC (slike 14-16). Iz kromatogramov je razvidno, da vzorci vsebujejo več različnih izoform surfaktina, ki jih kot vrhove zaznamo v največji meri nekje med 10 in 20 minuto spiranja kolone. Vrhovi standarda in vzorcev imajo podobne retencijske čase.



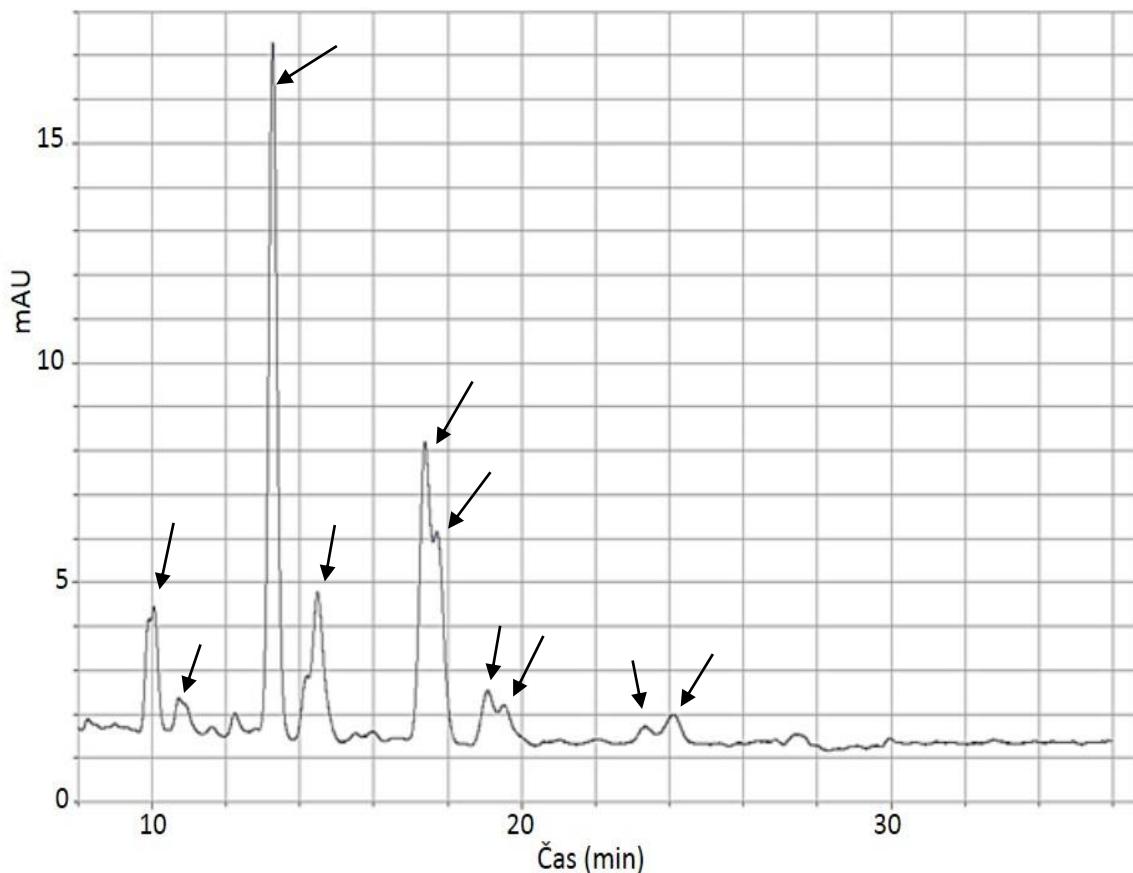
Slika 13: Kromatogram standarda surfaktina (Sigma Aldrich) s koncentracijo 0,5 mM (standard s tako koncentracijo smo pripravili sami, glej točko 3.2.7.), $\geq 98\%$ čistost. X-os prikazuje čas potovanja vzorca skozi kolono, y-os pa prikazuje absorbančne enote (mAU). Kromatogram vzorca surfaktina smo spremljali pri valovni dolžini 205 nm. Vidimo, da se večino surfaktina eluira skozi kolono med 10 in 20 minutu, kjer opazimo največje število vrhov. S puščicami so označeni relevantni vrhovi, kjer se naj bi nahajal surfaktin.



Slika 14: Kromatogram surfaktina proizvedenega z sevom *B. subtilis* PS-216 (wt) v gojišču MMS. Vzorec je bil odvzet po 24 h gojenja. X-os prikazuje čas potovanja vzorca skozi kolono, y-os pa prikazuje absorbančne enote (mAU). Kromatogram vzorca surfaktina smo spremljali pri valovni dolžini 205 nm. Za določitev vrhov kjer se nahaja surfaktin, smo dobljene kromatograme primerjali s kromatogramom standarda. S puščicami so označeni relevantni vrhovi, kjer se naj bi nahajal surfaktin.



Slika 15: Kromatogram surfaktina proizvedenega z sevom *B. subtilis* PS-216 ΔcomQ v gojišču MMS. Vzorec je bil odvzet po 24 h gojenja. X-os prikazuje čas potovanja vzorca skozi kolono, y-os pa prikazuje absorbančne enote (mAU). Kromatogram vzorca surfaktina smo spremeljali pri valovni dolžini 205 nm. Za določitev vrhov kjer se nahaja surfaktin, smo dobljene kromatograme primerjali s kromatogramom standarda. S puščicami so označeni relevantni vrhovi, kjer se naj bi nahajal surfaktin.



Slika 16: Kromatogram surfaktina proizvedenega z sevom *B. subtilis* PS-216 ΔcomQXP v gojišču MMS. Vzorec je bil odvzet po 24 h gojenja. X-os prikazuje čas potovanja vzorca skozi kolono, y-os pa prikazuje absorbančne enote (mAU). Kromatogram vzorca surfaktina smo spremajali pri valovni dolžini 205 nm. Za določitev vrhov kjer se nahaja surfaktin, smo dobljene kromatograme primerjali s kromatogramom standarda. S puščicami so označeni relevantni vrhovi, kjer se naj bi nahajal surfaktin.

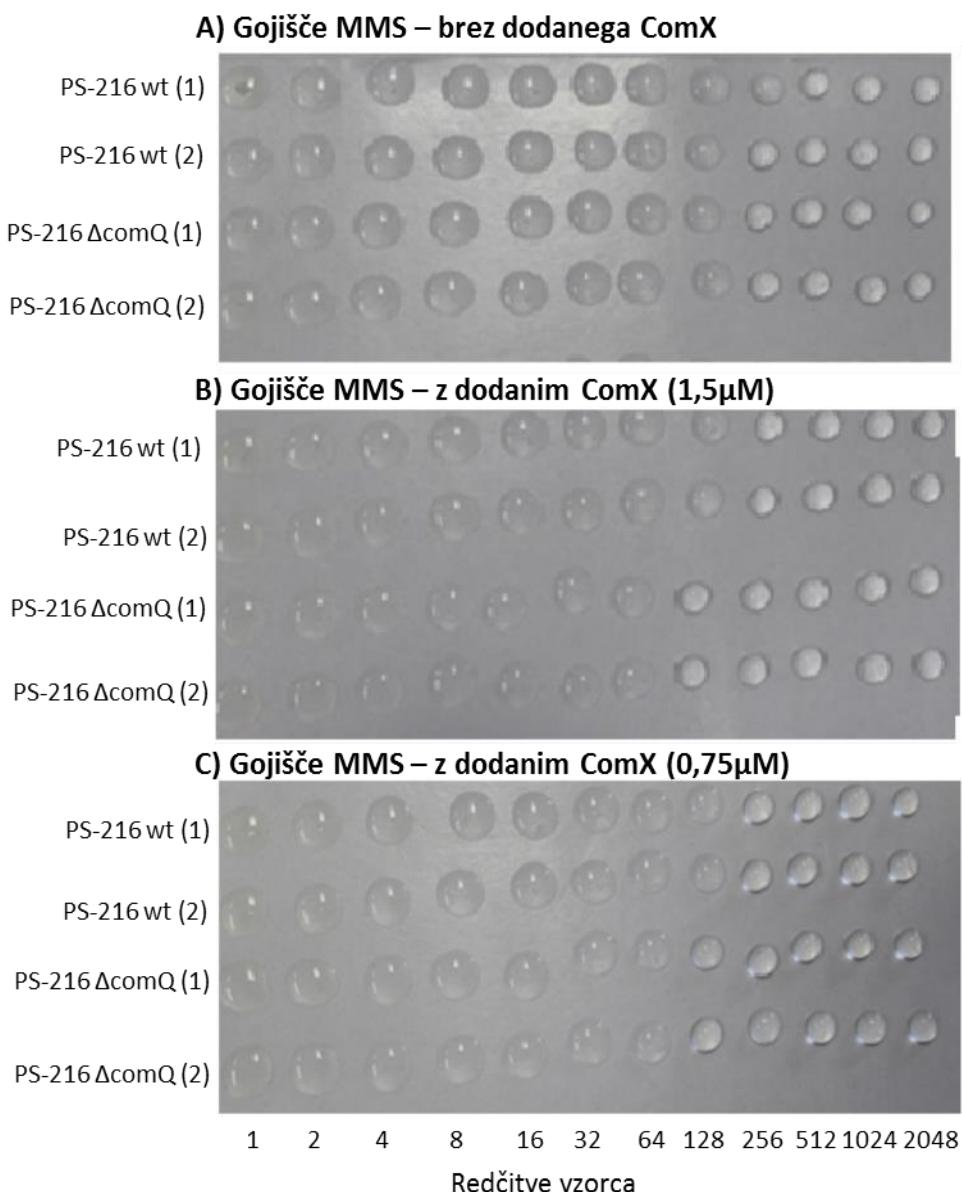
4.5 VPLIV DODANEGA ZUNAJCELIČNEGA ComX NA PROIZVODNJO SURFAKTINA V GOJIŠČU MMS

Oslizlo in sod. (2014) so objavili, da signalna mutanta PS-216 Δ comQ (BM1400) v prisotnosti dodanega signalnega peptida ComX izloči v gojišče CM več surfaktina kot divji tip. Zanimalo nas je ali lahko izmerimo podoben odziv tudi v gojišču MMS. Primerjali smo izločanje surfaktina v gojišču MMS v treh eksperimentalnih variantah: brez dodatka zunanjega signala ComX, z dodatkom zunanjega signala ComX (koncentracija 1,5 μ M) in dodatkom zunanjega signala ComX, ki smo ga 1x razredčili (koncentracija 0,75 μ M) preden smo ga dodali v gojišče. Gojišča smo vzorčili v treh časovnih točkah: 4 h, 24 h in 48 h in surfaktin merili s kapljičnim testom (slika 17) in HPLC (slika 18).

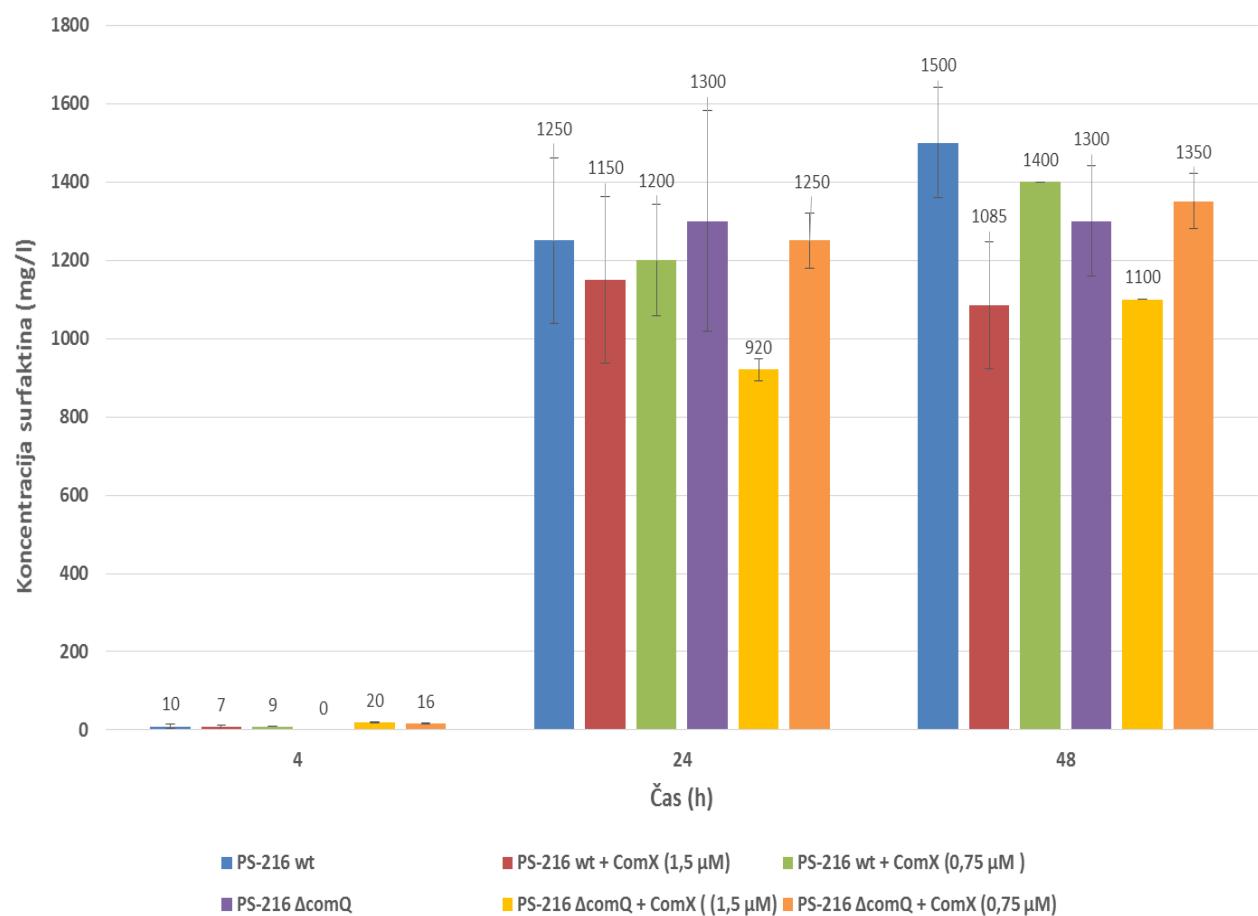
Po 4 urah gojenja smo pri divjem tipu *B. subtilis* že zaznali surfaktin (povprečno 9,5 mg/L), medtem kot ga pri sevu PS-216 Δ comQ ni bilo zaznati. Po 24 h in 48 h gojenja divji tip in mutanta izločata podobne koncentracije surfaktina v območju 1100 mg/L (divji tip) in 1600 mg/L (mutanta).

V prisotnosti ComX (1,5 μ M), ki smo ga dodali na začetku gojenja, je prišlo do komplementacije. Sev PS-216 Δ comQ je v prisotnosti ComX že v prvih urah proizvedel povprečno 20 mg/L surfaktina, kar je približno dvakrat več kot divji tip, medtem ko pri mutanti v gojišču brez dodanega ComX nismo zaznali surfaktina. Po enem in dveh dnevih gojenja vpliva mutante PS-216 Δ comQ nismo več zaznali (stopnja izražanja od 900 do 1300 mg/L) in zato ni presenetljivo, da v kasnejši fazah rasti bakterij dodatek feromona ComX na produkcijo surfaktina pri mutanti PS-216 Δ comQ več ne vpliva.

Podobne rezultate smo dobili, če smo ComX redčili (koncentracija 0,75 μ M) in sicer je bila koncentracija surfaktina po 4 h gojenja pri sevu PS-216 Δ comQ z dodanim ComX višja (16,5 mg/L) kot pri divjem tipu (9 mg/L). V kasnejših fazah rasti (24 h in 48 h) pa so bile koncentracije surfaktina pri obeh sevih podobne in so dosegle vrednost od 1300 – 1400 mg/L.



Slika 17: Prikaz rezultatov kapljičnega testa. Za testiranje so bili uporabljeni vzorci seva *B. subtilis* PS-216 wt in PS-216 Δ comQ odvzeti po 24 h gojenja v gojišču MMS in pripravljeni z metodo obarjanja z etanolom. Poiskus smo delali v dveh neodvisnih ponovitvah. Na parafilm so nanešene 30 μL kapljice posameznih redčitev vzorcev pripravljenih v mikrotitrski plošči. Prva kaplja predstavlja neredčen vzorec, vsaka naslednja kapljica predstavlja vzorec redčen za faktor 2 glede na predhodnjo kapljico. Redčitve vzorcev so bile naslednje: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 in 2048. Slika A prikazuje vzorce sevov *B. subtilis* PS-216 wt in PS-216 Δ comQ brez dodenega ComX. Rezultati vzorcev *B. subtilis* PS-216 wt in PS-216 Δ comQ z dodanim ComX s koncentracijo $1,5 \mu\text{M}$ so prikazani na sliki B. Slika C prikazuje vzorce z dodanim ComX, ki smo ga redčili z gojiščem MMS preden smo ga dodali v gojišče v koncentraciji $0,75 \mu\text{M}$.



Slika 18: Prikaz koncentracij surfaktina (mg/l), ki smo jih določili z metodo HPLC. Prikazani so podatki za: a) sev PS216 wt (modri stolpci) in PS216 ΔcomQ (vijolični stolpci), kjer v gojišče nismo dodali ComX; b) sev PS216 wt (rdeči stolpci) in PS216 ΔcomQ (rumeni stolpci), kjer smo v gojišče dodali ComX (1,5 μ M) ter c) sev PS216 wt (zeleni stolpci) in PS216 ΔcomQ (oranžni stolpci), kjer smo v gojišče dodali redčen ComX (0,75 μ M). Vsa testiranja smo delali v dveh ponovitvah, tako da so na grafu podatki povprečja dveh meritev s HPLC. Vzorce teh gojišč smo pripravili z ekstrakcijo z etanolom. Na X-osi pri 4 urah ni viden stolpec za koncentracijo surfaktina PS216 ΔcomQ, brez dodanega ComX, saj v tej točki pri tem sevu nismo zaznali surfaktina. V prilogah D-F so v preglednicah zbrani podatki koncentracij surfaktina izmerjenega z metodo HPLC, ki smo jih uporabili za prikaz grafa. Prikazani so tudi podatki, ki smo jih pridobili z izvedbo kapljičnega testa.

5 RAZPRAVA

S strani industrije je surfaktin kot molekula komercialno zelo zanimiv, saj sodi zaradi svojih lastnosti med najbolj učinkovite biosurfaktante. Mnogi se ukvarjajo z iskanjem rešitev, kako proizvesti čim več surfaktina s čim manj stroški, zato je optimizacija produkcije surfaktina biotehnološko zelo zanimiva. Zato smo se tudi mi odločili, da bomo v sklopu magistrskega dela posegli v to področje.

Z gojenjem različnih sevov *B. subtilis* v gojiščih CM in MMS smo pridobili izrabljena gojišča in izmerili koncentracije surfaktina ob različnih časih s kapljičnim testom in HPLC. Namen naloge je bil a) primerjati vpliv dveh gojišč, CM in MMS, na produkcijo surfaktina pri bakteriji *B. subtilis* PS-216, b) optimizirati in primerjati metodi izolacije in merjenja surfaktina, in c) ovrednotiti vpliv sistema za zaznavanje kvoruma ComQXPA na izražanje surfaktina v gojišču MMS.

Potrdili smo, da je produkcija surfaktina v gojišču MMS višja kot v gojišču CM, nakar smo tudi preverili ali bo signalna mutanta seva *B. subtilis* v prisotnosti ComX proizvedla več surfaktina v gojišču MMS kot pa divji tip *B. subtilis*.

5.1 PRIMERJAVA METOD ZA DETEKCIJO IN DOLOČANJE KONCENTRACIJE SURFAKTINA

Vzorce, v katerih smo preverjali prisotnost surfaktina, smo analizirali s kapljičnim testom in s HPLC in metodi primerjali.

Na kromatogramu surfaktina sicer lahko opazimo več različnih nižjih in višjih vrhov, saj ima surfaktin več izomer kar tudi oteži samo kvantifikacijo surfaktina. Nekateri avtorji trdijo, da ima surfaktin 6 izomer (Wei in sod., 1998) in različni sevi *B. subtilis* imajo dejansko vedno več različnih izomer surfaktina (Nakayama in sod., 1997; Abdel-Mawgoud in sod., 2008). Izomere surfaktina se izločajo iz analitske kolone glede na njihovo hidrofobnost, ki je povezana z dolžino verige maščobne kisline. To pomeni, da se molekula surfaktina, ki vsebuje 12 ogljikovih atomov izloči iz kolone pred tisto, ki vsebuje 14 ogljikovih atomov. Če pa imajo molekule surfaktina enako dolžino maščobnih kislin, je izločanje odvisno od aminokislinske sestave molekule (Kowall in sod., 1998).

S primerjavo rezultatov pridobljenih z obema metodama (slika 9) smo ugotovili, da obstaja močna povezava med obema metodama, na kar nakazuje vrednost $R^2=0,9349$. Torej nam kapljični test omogoča učinkovito in hitro oceno prisotnosti surfaktina v izrabljenem gojišču. Vendar pa ne smemo pričakovati, da imajo vzorci, pri katerih dobimo enako število kapljic tudi natanko enako količino surfaktina. Zaradi redčitvenega faktorja 2, ki ga najpogosteje uporabljamo v kapljičnemu testu, lahko pričakujemo, da bo natačnost metode $\pm 50\%$.

5.2 OPTIMIZACIJA METOD ZA IZOLACIJO SURFAKTINA

Pri zastavljenem eksperimentu smo morali odvzete vzorce ustrezno pripraviti, da smo jih lahko uporabili za določanje koncentracije surfaktina s HPLC. Odstraniti je bilo potrebno vse večje delce iz gojišča (npr. bakterijske celice in eksopolisaharide), ki bi motili analizo na HPLC.

Leta 1981 so Cooper in sod. predstavili metodo za izolacijo surfaktina iz gojišča, ki pa je sestavljena iz več korakov. Sama metoda zahteva veliko materiala in časa, je zahtevna in precej dolgotrajna, saj je prehodna obdelava vzorcev zamudna (vključuje uporabo kislin, baz ter topil, sušenje vzorca preko noči). Zato sem pri svojem delu uporabila drugačno, novejšo metodo, povzeto po Wei in sod., 2007. Pri tem smo vzorce gojišč centrifugirali in nato dodatno še filtrirali. S tem je bilo omogočeno lažje delo, saj je bilo bolj enostavno delati z veliko količino vzorcev.

Najprej smo sterilno ob različnih časih vzorčenja odvzeli vzorce iz erlenmajeric in centrifugirali pri čemer so se večji delci (bakterijske celice in njihovi ostanki) usedli na dno centrifugirke. Supernatant pa smo prefiltrirali skozi filtre velikosti 0,45 µm in 0,20 µm ter s tem dosegli, da snovi, ki so večje od 0,20 µm niso prešle skozi filter in smo dobili bolj čist vzorec v primerjavi z prvotno odvzetim. Ta metoda je sicer hitrejša in bolj enostavna od tiste, ki so jo uporabili Cooper in sod. (1981), vendar smo pri filtriranju naleteli na težave zaradi nepričakovane povišane viskoznosti gojišča MMS po 24 urah gojenja, kar je omejilo ponovljivost rezultatov med ponovitvama. Verjetno je, da pride do takšnih razlik, ker ostane surfaktin ujet skupaj z zunajceličnimi polimeri na gornji strani filtra in ne pride skozi filter.

V izogib temu problemu smo metodo modificirali. Surfaktin je topen v organskih topilih in odločili smo za uporabo hladnega 96 % etanola, ki deluje kot topilo. Pred dodatkom etanola je bilo potrebno celice odstraniti iz gojišča s centrifugiranjem, saj se oborijo z etanolom. Prav tako se oborijo zunajcelični polimeri in ne predstavljajo težav pri filtriranju. Ta obdelava vzorcev je zelo povečala ponovljivost rezultatov (slika 10).

V okviru te magistrske naloge smo pokazali, da je obarjanje z etanolom primernejša metoda za meritve surfaktina kot filtriranje.

5.3 GOJENJE SEVOV *B. subtilis* V GOJIŠČIH CM IN MMS

Bakterijske seve *B. subtilis* PS-216 wt (*srfA-cfp*) smo gojili v gojiščih CM in MMS. Gojišče CM je bilo že prej uporabljeno za gojenje sevov *B. subtilis* in sintezo surfaktina (Oslizlo in sod., 2014). Gojišče MMS (Wei in sod., 2007) pa smo izbrali iz literature, ker je bilo v njem pridobljena najvišja koncentracija surfaktina. Procesne parametre gojenja (hitrost mešanja 200 rpm) in sestavo optimiziranega gojišča MMS smo povzeli po Wei in sod. (2007). Proces gojenja bakterij smo izvajali pri 28 °C, medtem ko so Wei in sod. (2007) proces izvajali pri 30 °C.

S primerjavo dveh gojišč, CM in MMS, smo preverili hipotezo, da sestava gojišča vpliva na količino proizvedenega surfaktina. Ugotovili smo, da je gojišče MMS res bolj ugodno za produkcijo surfaktina, saj je po 24 urah sev *B. subtilis* PS-216 wt (*srfA-cfp*) proizvedel približno dvakrat več surfaktina v gojišču MMS (68 mg/L) kot v gojišču CM (32 mg/L). Rezultati v naslednji točki merjenja surfaktina (48h) kažejo, da se koncentracija surfaktina (33 mg/L) v gojišču ni več bistveno spremenila, medtem ko smo v gojišču MMS izmerili mnogo višjo koncentracijo (622 mg/L) glede na prejšnjo točko pri 24 urah. To je v skladu s pričakovanji, saj so že Wei in sod. (2007) izpostavili gojišče MMS kot ugodno za produkcijo surfaktina. Pri preizkušanju optimiziranega gojišča MMS (določili so optimalno razmerje koncentracij elementov v gojišču in ga kot takega preizkusili), so namreč dosegli skoraj dvakrat več surfaktina (3,34 g/L) v primerjavi s kontrolnim gojiščem (osnovno gojišče MMS v katerem niso spremenjali koncentracij elementov).

Wei in sod., (2007) so ugotovili, da so za produkcijo surfaktina ključni železovi (Fe^{2+}), manganovi (Mn^{2+}), magnezijevi (Mg^{2+}) in kalijevi (K^+) ioni (Wei in sod., 1998, 2002, 2007). Znano je, da so Mg^{2+} ioni pomembni za aktivnost proteina Sfp *B. subtilis*. Namreč protein Sfp aktivira domeno peptidil prenašalnega proteina surfaktinske sintetaze (Reuter in sod., 1999). K^+ ioni stimulirajo izločanje surfaktina iz celice v gojišče in verjetno zato povečajo donos surfaktina (Kinsinger in sod., 2003, 2005). Gojišče MMS, ki vsebuje vse zgoraj navedene kovinske ione (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} in K^+) v določenem medsebojnem optimalnem razmerju, pa še bolj pozitivno vpliva na višjo proizvodnjo surfaktina.

5.4 RAST IN SINTEZA SURFAKTINA SEVOV *B. subtilis* V GOJIŠČU MMS

5.4.1 Spremljanje rasti in sinteze surfaktina

V okviru naloge smo spremljali rast in produkcijo surfaktina pri sevih *B. subtilis* PS-216 (wt, Δ comQ in Δ comQXP) v gojišču MMS. Rast treh sevov je bila primerljiva (slika 12) kar je razvidno iz generacijskih časov, ki so bili pri PS-216 wt (105 ± 18 min), pri sevu Δ comQ (116 ± 21 min) in sevu Δ comQXP (104 ± 19 min). V začetku eksperimenta je bila OD₆₅₀ obeh mutant *B. subtilis* PS216 Δ comQ in PS216 Δ comQXP nekoliko višja kot pri *B. subtilis* wt PS-216 vendar se je ta razlika zelo kmalu izgubila. Pričakovali smo, da bo rast seva divjega tipa *B. subtilis* PS-216 upočasnjena v primerjavi z mutantami, saj te porabijo manj energije za proizvodnjo surfaktina, vendar tega učinka v gojišču MMS nismo zaznali.

Mutanta *B. subtilis* PS-216 Δ comQXP v gojišču MMS nikoli ne doseže koncentracij surfaktina divjega tipa, saj je bila pri tem sevu najvišja izmerjena koncentracija surfaktina približno 100 mg/L, medtem ko se je koncentracija surfaktina v gojišču *B. subtilis* PS-216 Δ comQ (okrog 300 mg/L) po 13h tudi brez dodanega ComX že zelo približala koncentracijam surfaktina divjega tipa (okrog 360 mg/l). Kot je razvidno iz grafa (slika 12) se je sinteza surfaktina začela v logaritemski fazni in dosegla maksimum v drugi polovici logaritemske faze rasti oz. na koncu te faze, ko so bakterije počasi že prehajale v stacionarno fazo rasti. Rast vseh treh sevov je bila približno enaka, ne glede na to ali producirajo surfaktin, kar pomeni da sama sinteza surfaktina ni vplivala na rast.

Izražanje surfaktina je uravnavano s sistemom za zaznavanje gostote ComQXPA (Weinrauch in sod., 1990; Solomon in sod., 1995) zato ne preseneča, da smo tudi v MMS gojišču pokazali vpliv ComQXPA na sintezo tega surfaktanta. Zanimivo je, da je bil učinek inaktivacije treh genov (*comQXP*) večji kot učinek inaktivacije enega gena (*comQ*). ComQ, ki je izopreniltransferaza, reže prepeptid ComX in doda izoprenoid na triptofanski ostanek ComX (Schneider in sod., 2002, Magnuson in sod., 1994, Ansaldi in sod., 2002). Znano pa je, da ComQ ni potreben za sintezo ComP in ComA. Poleg tega je dejstvo, da se surfaktin izraža v mutanti brez ComQ v skladu z opažanjem, da pri regulaciji sodelujejo še dodatni faktorji, ki delujejo le preko ComP in ComA, kot je na primer CSF (Solomon in sod., 1995), kar je tudi v skladu z nižjo sintezo surfaktina v trojni mutantih.

5.4.2 Producija surfaktina v gojišču z dodanim zunanjim signalom ComX

Daljnosežen pomen te magistrske naloge je bil tudi povečati produkcijo surfaktina. Zato smo že v osnovi izbrali gojišče, ki omogoča bakteriji *B. subtilis* čim večje izražanje surfaktinskega operona. Na podlagi nedavno objavljenih rezultatov Oslizlo in sod. (2014) smo predpostavili, da bo tudi v MMS gojišču mutanta z okvarjenim *comQ* v prisotnosti dodanega ComX proizvedla več surfaktina kot divji tip. ComX smo dodali v gojišče MMS v dveh različnih koncentracijah ($1,5 \mu\text{M}$ in $0,75 \mu\text{M}$), ki sta zadostovali za indukcijo operona *srfA*. V nasprotju s pričakovanim je bila količina surfaktina v mutanti *comQ* s dodanim ComX še vedno podobna tisti pri divjem tipu, kjer smo v obeh primerih izmerili približno 1200 mg/L surfaktina po 24 in 48 urah (slika 18).

Mutante v genu *comQ* ne morejo proizvajati feromona ComX (Magnuson in sod., 1994), to okvaro pa lahko obidemo z dodajanjem ComX v rastno gojišče (Tortosa in sod., 2001; Ansaldi in sod., 2002; Štefanič in sod., 2009), kar smo opazili tudi v naših eksperimentih. Bakterije zaznajo dodan zunajni signal ComX preko receptorja ComP (Piazza in sod., 1999).

Da je sev *B. subtilis* PS-216 Δ comQ bolj občutljiv na zunanje dejavnike, navajajo Oslizlo in sod. (2014), ki so preučevali signaliziranje in primerjali odzive na signal ComX v kokulturi dveh sevov: *B. subtilis* PS-216 Δ comQ in PS-216 wt. Pokazili so, da imajo bakterije, ki imajo gen *comQ* neaktivен v prisotnosti ComX prekomerno odziven QS sistem in s tem porušeno ravnotesje med primarnim in sekundarnim metabolizmom, ki vodi v prekomerno sintezo surfaktina. Takega prekomernega odziva v MMS gojišču nismo opazili, kjer je regulacija operona *srfA* verjetno nekoliko drugačna kot v gojišču CM.

5.4.3. Vpliv raznih dejavnikov na koncentracijo surfaktina

Gojenje sevov *B. subtilis* v gojišču MMS smo izvajali pri 28°C in hitrosti mešanja 200 rpm, ki je tudi priporočena (Wei in sod., 2007). Naraščanje koncentracije surfaktina smo zaznali vse do časovne točke 24 h pri sevu PS-216 wt in PS-216 Δ comQ, ko smo pri obeh izmerili približno 1200 mg/L , nato pa znatnega prirasta koncentracije surfaktina po 48 urah pri obeh sevih ni bilo več. Postavlja se torej vprašanje kateri faktorji poleg QS sistema še vplivajo na sintezo surfaktina. Surfaktin kot sekundarni metabolit namreč v največji meri nastaja v pozni eksponentni fazì rasti bakterijskih celic oziroma v stacionarni fazì, kjer bakterijske celice upočasnijo metabolizem in izločajo surfaktin, da lažje preživijo v okolju (Marahiel in sod., 1993). V našem primeru se je začel producirati surfaktin v začetku logaritemsko fazì rasti in koncentracije surfaktina so naraščale skozi celotno eksponentno fazò, največ na sredini in proti koncu te faze (slika 12). Naslednja točka merjenja koncentracije surfaktina je bila v stacionarni fazì, kjer pa se koncentracije niso več spremenjale. Ta rezultat nekoliko odstopa od sprejete dogme sinteze sekundarnih

metabolitov. Predvidevamo lahko, da se je surfaktin nehal producirati v stacionarni fazи, ker so celice začele odmirati ozrioma so vstopale v dormantno fazу, vendar tega direktno nismo preučevali.

Pri svojem delu smo si za cilj zadali doseči čim višji donos surfaktina. V primerjavi naših rezultatov s tistimi, ki so jih dobili Wei in sod. (2007) tega nismo dosegli. Oni namreč v svojem delu poročajo, da so izmerili najvišjo koncentracijo surfaktina 3.34 g/L v optimalnem gojišču MMS, kar naj bi bilo približno dvakrat več kot so izmerili pri sevu gojenem v kontrolnem gojišču MMS. Mi smo izmerili najvišjo koncentracijo surfaktina 1500 mg/L v gojišču MMS pridobljenim s sevom PS-216 wt (slika 18). Do razlike je lahko prišlo že pri tem, da smo v poiskusih uporabili različne seve *B. subtilis*. Wei in sod., 2007 so uporabili *B. subtilis* ATCC 21332 medtem, ko smo mi uporabili sev *B. subtilis* PS-216 in njegove mutante. Prav tako se je razlikoval način gojenja bakterije, saj so gojenje bakterijske kulture v tekočem gojišču izvedli v treh stopnjah, medtem ko smo mi uporabili za analizo gojišče, katerega smo inokulirali s prekonočno kulturo.

Možen razlog, da nismo dobili višjega donosa surfaktina je tudi, da nismo optimizirali tudi drugih fizikalno kemičnih parametrov kot sta na primer pH in kisik. Pri svojem delu so Wei in sod., 2007 ravno ta parameter redno spremljali in regulirali nekje v območju pH 7.0. Ostali trdijo, da naj bi bila optimalna vrednost pH za proizvodnjo surfaktina nekje med 6.3 - 6.7 (Yeh, 2005). Če vrednost pH pade pod 5.0 pa pride do zakisanja brozge in precipitacije surfaktina (Wei in Chu, 1998 in 2002). Torej je mogoče, da se gojišče zakisa po daljšem času gojenju in to negativno vpliva na produkcijsko surfaktina. Morda je razlog temu padec pH. Yeh in sod. (2005, 2006) so tudi ugotovili, da je potrebo povečati tudi stopnjo prezračevanja v gojišču pri hitrostih mešanja 200-300 rpm, da ne zmanjšamo vnosa kisika v gojišče. Čeprav smo z mešanjem kulture zagotavliali vnos in porazdelitev kisika v gojišču, nismo teh parametrov kontinuirno spremljali. Da bi lahko kontinuirno spremljali parametrov kisika in pH-ja bi morali izvesti poizkuse v bioreaktorju in bi z regulacijo obeh parametrov omogočali bolj optimalne pogoje gojenja.

6 SKLEPI

- V gojišču MMS celice *B. subtilis* proizvedejo večjo količino surfaktina kot v gojišču CM, vendar se sinteza povečuje le do vstopa v stacionarno fazo, nato pa se koncentracija surfaktina več ne povečuje.
- Zunanjcelični signal ComX ima izrazit vpliv na količino proizvedenega surfaktina med rastno fazo, po vstopu v stacionarno fazo rasti pa se ta vpliv izgubi.
- Dinamika izražanja surfaktina v mutanti *B. subtilis* PS-216 Δ comQ in PS-216 Δ comQXP se razlikuje in sicer je produkcija v gojišču MMS pri sevu PS-216 Δ comQXP izrazito nižja.
- Dodajanje ComX mutanti PS-216 Δ comQ ne sproži prekomernega izražanja surfaktina v gojišču MMS, kar je drugače kot so izmerili Oslizlo in sod. (2014) v gojišču CM.

7 POVZETEK

Biosurfaktanti so površinsko aktivne molekule, ki jih izločajo bakterije in kvasovke, med njimi tudi *B. subtilis* ter imajo zaradi svojih lastnosti velik pomen za uporabo v industriji (Wei in sod., 2007). Biosurfaktante so sposobni proizvajati številni mikroorganizmi, predvsem bakterije in v manjšem obsegu kvasovke (Schete in sod., 2006). Producentski organizmi izločajo biosurfaktante iz celic v okolico ali pa so vezani na dele celic, predvsem takrat ko bakterije rastejo na substratih, ki se ne mešajo z vodo (Desai in Banat, 1997). Surfaktanti so zaradi svojih specifičnih lastnosti zanimivi za aplikacije v industrijah kot so prehranska, kemična, kozmetična, tekstilna, petrokemična ter v naravovarstvu in kmetijstvu (Shaligram in Singhal, 2010; Shete in sod., 2005; Soberon-Chavez, 2011; Nitschke in Costa, 2007).

Surfaktin je poznan kot eden najbolj učinkovitih biosurfaktantov. Sestavljen je iz β -hidroksi maščobne kislina, ki je preko laktonske vezi povezana s petidom, ki je sestavljen iz sedmih α -amino kislin (Marahiel in sod., 1993). Genetska regulacija surfaktina poteka preko *srfA* operona, saj le ta kodira surfaktinski sintetazni kompleks (NRPS). Poleg *srfA* operona pa imajo pri proizvodnji surfaktina pomembno vlogo še gen *comA* (Nakano in sod., 1991; Sullivan, 1998; Abushady in sod., 2005) ter regulatorja CodY (Serror, 1996) in PerR (Hayasi in sod., 2005). Izražanje surfaktinskega operona je uravnavano s sistemom zaznavanja celične gostote (ang. quorum sensing), ki je zapisan na lokusu *comQXPA* (Nakano in sod., 1991; Ansaldi in sod., 2002).

Kljub velikemu industrijskemu interesu ostaja surfaktin neizkoriščen, saj predstavljajo oviro veliki proizvodni stroški in nizek donos. Zato so potrebne strategije, ki bi odpravile te omejitve. Ena izmed možnih strategij je izboljšanje produkcijskega gojišča ali manipulacija genov, ki vplivajo na izražanje surfaktinskega operona pri bakteriji *B. subtilis* (Wei in sod., 2007).

Cilj našega eksperimenta je bil torej doseči čim večjo produkcijo surfaktina. Uporabili smo seve *B. subtilis* PS-216 (*srfA-cfp*), PS-216 Δ comQ (*srfA-cfp*), PS-216 wt, PS-216 Δ comQ in PS-216 Δ comQXP. Ovrednotili smo sintezo surfaktina v deh gojiščih, CM in MMS in z dvema metodama: kapljičnim testom in HPLC ter preverili tudi vpliv ComX na sintezo surfaktina pri mutantah PS-216 Δ comQ in PS-216 Δ comQXP.

Ugotovili smo, da z izbiro ustreznega gojišča lahko vplivamo na izražanje surfaktinskega operona in da je ta boljša v MMS kot v CM gojišču. MMS vsebuje kovinske ioni (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} in K^+), ki pripomorejo k doseganju višjih koncentracij surfaktina. Ugotovili smo tudi, da metodi kot sta enostaven kapljični test in vrednotenje koncentracije surfaktina s HPLC medsebojno korelirata in da lahko prvega uporabimo za grobo kvantifikacijo surfaktina v gojišču.

Z dodatkom zunanjega signala ComX v gojišče, smo poizkušali dodatno povečati koncentracije surfaktina. Rezultati z in brez dodanega ComX so zelo podobni v vseh analiziranih vzorcih. Nekoliko povišano izražanje surfaktinskega operona mutante Δ comQ, ki smo ji dodali ComX, samo izmerili le v začetnih urah gojenja bakterije, medtem ko je v kasnejši fazи ta učinek izzvenel in razlik med divjim tipom in mutanto Δ comQ brez ali z dodanim feronom ComX nismo več zaznali. Zanimivo je, da *B. subtilis* sintetizira surfaktin v gojišču MMS tudi, če sistem za zaznavanje kvoruma ni operativen, kar je drugače, kot so opazili znastveniki v gojišču CM (Nakano in sod., 1989).

Danes je vse več zanimanja s strani javnosti za biološke produkte med katerimi so tudi biosurfaktanti zato je optimizacija produkcije teh molekul pomembna. V primeru surfaktina največjo težavo proizvodnje biosurfaktantov predstavljajo visoki stroški zaključnih procesov. Da bi lahko biološki surfaktanti prevladali na trgu nad surfaktanti kemičnega izvora, bi morali najprej rešiti ta problem in samo vprašanje časa je kdaj bo prišla rešitev tudi za to in bo omogočena uporaba biosurfaktantov v velikem merilu na tržišču.

8 VIRI

- Abushady H. M., Bashandy A.S., Aziz N. H., Ibrahim H. M. M. 2005. Molecular Characterization of *Bacillus subtilis* Surfactin Producing Strain and the Factors Affecting its Production. International Journal of Agriculture & Biology, 7, 3: 337-344
- Abdel-Mawgoud A. M., Aboulwafa M. M., Hassouna N.A. 2008. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. Applied Biochemistry and Biotechnology, 150: 289-303
- Albano M., Hahn J., Dubnau D. 1987. Expression of Competence Genes in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 169: 3110-3117
- Ansaldi M., Marolt D., Stebe T., Mandić-Mulec I., Dubnau D. 2002. Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants. Molecular Microbiology, 44: 1561–1573
- Arima K., Kakinuma A., Tamura G. 1968. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 31: 488-494
- Baker S. C. and Chen C. Y. 2010. Enrichment and Purification of Lipopeptide Biosurfactants V: Biosurfactants. Sen R. (ed.). New York, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media: 281-286
- Bodour A. A., Guerrero-Barajas C., Jiorle B. V., Malcomson M. E., Paull A. K., Somogyi A., Trinh L. N., Bates R. B., Maier R. M. 2004. Structure and Characterization of Flavolipids, a Novel Class of Biosurfactants Produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN1. Applied and Environmental Microbiology, 70: 114-120
- Bruner S. D., Weber T., Kohli R. M., Schwarzer D., Marahiel M. A., Walsh C. T., Stubbs M. T. 2002. Structural Basis for the Cyclization of the Lipopeptide Antibiotic Surfactin by the Thioesterase Domain SrfTE. Structure, 10: 301–310
- Cameotra S. S., Makkar R. S. 2010. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. Pure and Applied Chemistry, 82: 97–116
- Claverys J. P., Prudhomme M., Martin B. 2006. Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. Annual Review of Microbiology, 60: 451-475
- Cooper D. G., Macdonald C. R., Duff S. J., Kosaric N. 1981. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. Applied Environmental Microbiology, 42: 408-412

- Cooper, D. G., and Paddock D. A. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied Environmental Microbiology*, 47:173–176
- Couette F., Leclere V., Bechet M., Guez J. S., Lecouturier D., Chollet-Imbert M., Dhulster P., Jacques P. 2010. Effect of *pps* disruption and constitutive expression of *srfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 480-491
- Das K., Mukherjee A. K., 2006. Assessment of mosquito larvicidal potency of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains. *Acta Tropica*, 97: 168-173
- Davis D. A., Lynch H. C., Varley J. 1999. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 322–329
- Davis D. A., Lynch H. C., Varley J. 2001. The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 346–354
- Deleu M., Paquot M. 2004. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *Preliminary Communication / Communication*, 7: 641–646
- Desai J. D., Banat I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 47-64
- Dogša I., Oslizlo A., Štefanič P., Mandić-Mulec I. 2014. Social interactions and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Food technology and Biotechnology*, 52: 149-157
- Magnuson R., Solomon J., Grossman A.D. 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*, 77: 207-216
- Hamoen, L. W., H. Eshuis, J. Jongbloed, G. Venema, and D. van Sinderen. 1995. A small gene, designated *comS*, located within the coding region of the fourth amino acid-activation domain of *srfA*, is required for competence development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 15: 55-63
- Hamoen L. W., Venema G., Kuipers O. P. 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology*, 149: 9–17
- Hayashi K., Ohsawa T., Kobayashi K., Ogasawara N., Ogura M. 2005. The H₂O₂ Stress-Responsive Regulator PerR Positively Regulates *srfA* Expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187: 6659–6667

- Jacques P. 2011. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. V: Biosurfactants: from genes to applications. Soberon-Chavez G. (ed.). Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 57- 91
- Jung J., Yu O. K., Ramzi A. B., Choe S.H., Kim S.W., Han S.O. 2012. Improvement of Surfactin Production in *Bacillus subtilis* Using Synthetic Wastewater by Overexpression of Specific Extracellular Signaling Peptides, comX and phrC. *Biotechnology and Bioengineering*, 109: 2349–2356
- Kanlayavattanakul M., Lourith N. 2010. Lipopeptides in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 32: 1–8
- Khire J. M. 2010. Bacterial Biosurfactants, and Their Role in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) V: Biosurfactants. Ramkrishna S. (ed.). New York, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media: 146-157
- Kim K., Jung S. Y., Lee D. K., Jung J. K., Park J. K., Kim D. K., Lee C. H. 1998. Suppression of inflammatoryresponses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. *Biochemical Pharmacology*, 55: 975–85
- Kinsinger, R. F., Kearns D. B., Hale M., Fall R. 2003. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology*, 185: 5627-5631
- Kinsinger R. F., Kearns D. B., Hale M., Fall R. 2005. Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187: 8462-8469
- Kowall M., Vater J., Kluge B., Stein T., Franke P., Ziessow D. 1998. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of Colloid and Interface Science*, 204: 1–8
- Kulkarni M., Chaudhari R., Chaudhari A. 2007. Novel tensio-active microbial compounds for biocontrol applications. V: General concepts in integrated pest and disease management. Ciancio A., Mukerji K.G. (eds.) Netherlands, Springer: 295-304
- Kraas F. I., Helmetag V., Wittmann M., Stricker M., Marahiel M. A. 2010. Functional Dissection of Surfactin Synthetase Initiation Module Reveals Insights into the Mechanism of Lipoinitiation. *Chemistry & Biology*, 17: 872–880
- Lazazzera B. A., Solomon J. M., Grossman A. D. 1997. An Exported Peptide Functions Intracellularly to Contribute to Cell Density Signaling in *B. subtilis*. *Cell*, 89: 917-925

- Li X., Yang H., Zhang D., Li X., Yu H., Shen Z. 2015. Overexpression of specific proton motive force-dependent transporters facilitate the export of surfactin in *Bacillus subtilis*. *Fermentation, Cell, Culture and Bioengineering*, 42: 93–103
- Lopez D., Fischbach M. A., Chu F., Losick R., Kolter R. 2009. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *PNAS*, 106: 280–285
- Magnuson R., Solomon J., and Grossman A.D. 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*, 77: 207-216
- Marahiel M. A., Nakano M. M., Zuber P. 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology*, 7: 631-636
- Mireles J. R., Toguchi A., Harshey R. M. 2001. *Salmonella enterica Serovar Typhimurium* Swarming Mutants with Altered Biofilm-Forming Abilities: Surfactin Inhibits Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 183: 5848–5854
- Morán A. C., Martínez M. A., Siñeriz F. 2002. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity, *Biotechnology Letters*, 24: 177-180
- Mukherjee A. K. 2007. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 330-335
- Mukherjee S., Das P., Sen R. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24: 509-515
- Mulligan C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133: 183-198
- Nakano M. M., Zuber P. 1989. Cloning and characterization of srfB, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 171: 5347-5353
- Nakano M. M., Magnuson R., Myers A., Curry J., Grosmann A. D., Zuber P. 1991. *srfA* Is an Operon Required for Surfactin Production, Competence Development, and Efficient Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 173: 1770-1778
- Nakayana S., Takahashi S., Hirai M. Shoda M. 1997. Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 80-82
- Nitschke M., Pastore G. 2003. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 112:163-172

- Nitschke M., Pastore G. 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97: 336–341
- Nitschke M., Costa S.G.V.A.O. 2007. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 18: 252-259
- Noah K. S., Fox S.L., Bruhn D. F., Thompson D.N., Bala G.A. 2002. Development of Continuous Surfactin Production from Potato Process Effluent by *Bacillus subtilis* in an Airlift Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98–100: 803-813
- Noah K. S., Bruhn D. F., Bala G. A. 2005. Surfactin Production from Potato Process Effluent by *Bacillus subtilis* in a Chemostat. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124: 465-474
- Ohno A., Ano T., Shoda M. 1995. Production of a Lipopeptide Antibiotic, Surfactin, by Recombinant *Bacillus subtilis* in Solid State Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 47: 209-214
- Ongena M., Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16: 115–125
- Ongena M., Jacques P., Touré Y., Destain J., Jabrane A., Thonart P. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 29–38
- Oslizlo A., Štefanic P., Dogša I., Mandić-Mulec I. 2014. Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. *PNAS*, 111: 1586–1591
- Peypoux F., Bonmatin J. M., Wallach J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 553–563
- Piazza F., Tortosa P., Dubnau D. 1999. Analysis and Membrane Topology of ComP, a Quorum-Sensing Histidine Kinase of *Bacillus subtilis* Controlling Competence Development. *Journal of Bacteriology*, 181: 4540-4548
- Quadri L. E., Weinreb P. H., Lei M., Nakano M. M., Zuber P., Walsh C.T. 1998. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* Phosphopantetheinyl Transferase for Peptidyl Carrier Protein Domains in Peptide Synthetases. *Biochemistry*, 37: 1585–1595
- Reuter K., Mofid M. R., Marahiel M. A., Ficner R. 1999. Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *The EMBO Journal*: 18: 6823–6831

- Roggiani M., Dubnau D. 1993. ComA, a Phosphorylated Response Regulator Protein of *Bacillus subtilis*, Binds to the Promoter Region of *srfA*. *Journal of Bacteriology*, 175: 3182-3187
- Rosenberg E., Ron E. Z. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 154-162
- Rutherford S. T., Bassler B. L. 2012. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine*, 2: 1-25
- Schneider K. B., Palmer T. M., Grossman A. D. 2002. Characterization of *comQ* and *comX*, Two Genes Required for Production of ComX Pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184: 410-419
- Sen R. 1997. Response Surface Optimization of the Critical Media Components for the Production of Surfactin. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68: 263-270
- Sen R., Swaminathan T. 1997. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47: 358-363
- Sen R., Swaminathan T. 2004. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 21: 141–148
- Sen R., Swaminathan T. 2005. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochemistry*, 40: 2953–2958
- Serror P., Sonenshein A. L. 1996. CodY Is Required for Nutritional Repression of *Bacillus subtilis* Genetic Competence. *Journal of Bacteriology*, 178: 5910–5915
- Shaligram N. S., Singhal R.S. 2010. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48: 119–134
- Shete A. M., Wadhawa G., Banat I. M., Chopade B. A. 2006. Mapping of patents of bioemulsifiers and biosurfactants: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 65: 91-115
- Solomon J. M., Magnuson R., Srivastava A., Grossman A. D. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, 9: 547-558

- Symmank H., Franke P., Saenger W., Bernhard F. 2002. Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein Engineering*, 15: 913–921
- Stricker M., Tanović A., Marahiel M. A. 2010. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 20: 234-240
- Sullivan E. R. 1998. Molecular genetics of biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, 9: 263-269
- Miller M. B., Bassler B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165–199
- Štefanič P., Mandič-Mulec I. 2009. Social Interactions and Distribution of *Bacillus subtilis* Pherotypes at Microscale. *Journal of bacteriology*, 191: 1756-1764
- Thompson D. N., Fox S.L., Bala G. A. 2000. Biosurfactants from Potato Process Effluents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86: 917-930
- Thompson D.N., Fox S.L., Bala G. A. 2001. The Effect of Pretreatments on Surfactin Production from Potato Process Effluent by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93: 487-501
- Tortosa P., Logsdon L., Kraigher B., Itoh Y., Mandič-Mulec I., Dobnau D. 2001. Specificity and Genetic Polymorphism of the *Bacillus* Competence Quorum-Sensing System. *Journal of Bacteriology*, 183: 451-460
- Vollenbroich D., Özal M., Vater J., Kamp R. M., Pauli G. 1997. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25: 289-297
- Vollenbroich D., Pauli G., Özal M., Vater J. 1997. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 44–49
- Wei Y. H., Chu I. M. 1998. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus ubtilis* ATCC 21332. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 724–728
- Wei Y. H., Chu I. M. 2002. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 24: 479–482
- Wei Y. H., Lai C. C., Chang J. S. 2007. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, 42: 40-45

Weinrauch Y., Guillen N., Dubnau D. A., 1998. Sequence and transcription mapping of *Bacillus subtilis* competence genes *comB* and *comA*, one of which is related to a family of bacterial regulatory determinants. *Journal of Bacteriology*, 171: 5362-5375

Weinrauch Y., Penchev R., Dubnau E., Smith I., Dubnau D. 1990. A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *Genes and Development*, 4: 860-872

Yeh M. S., Wei Y. H., Chang J.S. 2005. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. *Biotechnology Progress*, 21: 1329–1334

Yeh M. S., Wei Y. H., Chang J.S. 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, 41: 1799–1805

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem svojemu somentorju, asist. dr. Iztoku Dogša, za vso pomoč in nasvete pri izvedbi laboratorijskega dela, kot tudi pri analizi podatkov in pisanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi mentorici prof. dr. Ines Mandić - Mulec za vse strokovne nasvete in vzpodbudne besede pri izdelavi magistrskega dela.

Hvala recenzentki prof. dr. Kristini Sepčić za hiter in strokoven pregled magistrskega dela.

Hvala tudi vsem preostalim zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo, ki smo mi vedno priskočili na pomoč.

Navsezadnje najlepše hvala vsem domačim, fantu in prijateljem za podporo in vzpodbudo tekom študija.

PRILOGA A

Uporabljeni programi za izvedbo HPLC v aplikaciji Eurochrom

The screenshot shows a software window titled "Time table - srf_novak35min_na". The menu bar includes File, Edit, Options, View, and Help. Below the menu is a toolbar with icons for file operations. A status bar at the bottom shows "WLength 2". The main area displays a table with columns: Time min, Flow ml/min, Pump %A, Pump %B, D.In, and WLength. Two rows are present: Row 1 at 0.00 minutes with values 1.00, 75, 25, -, and 205; and Row 2 at 35.00 minutes with values 1.00, 75, 25, -, and 205.

	Time min	Flow ml/min	Pump %A	Pump %B	D.In	WLength
1	0.00	1.00	75	25	-	205
2	35.00	1.00	75	25	-	205

Priloga A1: Prikaz programa napisanega za identifikacijo in kvantifikacijo surfaktina z metodo HPLC v aplikaciji Eurochrom.

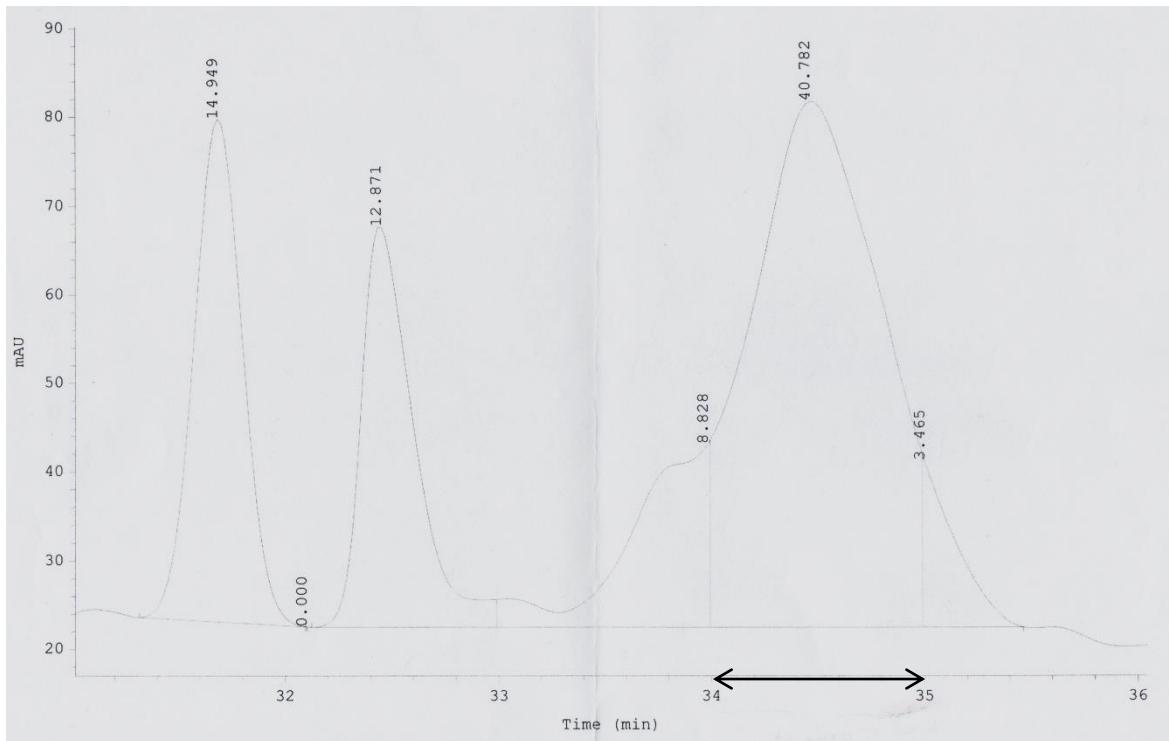
The screenshot shows a software window titled "Time table - optimised gradient ComX 2.4_". The menu bar includes File, Edit, Options, View, and Help. Below the menu is a toolbar with icons for file operations. A status bar at the bottom shows "WLength 2". The main area displays a table with columns: Time min, Flow ml/min, Pump %A, Pump %B, D.In, and WLength. Ten rows are listed, starting from 0.00 minutes up to 65.40 minutes, with flow rates of 1.00 ml/min, pump percentages of 0, 100, 25, 75, and 0, and a constant WLength of 214.

	Time min	Flow ml/min	Pump %A	Pump %B	D.In	WLength
1	0.00	1.00	0	100	-	214
2	5.00	1.00	0	100	-	214
3	5.02	1.00	0	100	-	214
4	10.00	1.00	25	75	-	214
5	10.02	1.00	25	75	-	214
6	54.00	1.00	31	69	-	214
7	54.02	1.00	31	69	-	214
8	57.00	1.00	100	0	-	214
9	62.00	1.00	100	0	-	214
10	65.40	1.00	0	100	-	214

Priloga A2: Prikaz programa napisanega za identifikacijo signala ComX v izrabljenem gojišču *E. coli* z metodo HPLC v aplikaciji Eurochrom.

PRILOGA B

Prikaz dela kromatograma peptida ComX . Prikazan je le del kromatograma kjer se nahaja ComX t.j. od 34 minute do 35 minute. V tem času smo zbirali 1 mL frakcije vzorca in jih nato obdelali za nadaljnjo uporabo.



PRILOGA C

Primerjava rezultatov koncentracij surfaktina v gojišču MMS pridobljenih s kapljičnim testom in HPLC

Priloga C1: Koncentracije surfaktina (mg/l) pridobljene s HPLC in število pozitivnih kapljic (kapljice, ki se pri izvedbi kapljičnega testa »razlezejo« na površini parafilma zaradi prisotnosti surfaktina) v gojišču MMS brez dodanega zunanjega signala ComX

PS216 wt (1)		PS216 wt (2)		PS216 ΔcomQ (1)		PS216 ΔcomQ (2)		
Čas (h)	Koncentracija surfaktina (mg/l)	Število pozitivnih kapljic						
4	14	1	5	1	0	0	0	0
24	1400	8	1100	8	1500	8	1100	8
48	1600	9	1400	9	1400	8	1200	8

Priloga C2: Koncentracije surfaktina (mg/l) pridobljene s HPLC in število pozitivnih kapljic (kapljice, ki se pri izvedbi kapljičnega testa »razlezejo« na površini parafilma zaradi prisotnosti surfaktina) v gojišču MMS z dodanim zunanjim signalom ComX (koncentracija 1,5 µM).

PS216 wt (1)		PS216 wt (2)		PS216 ΔcomQ (1)		PS216 ΔcomQ (2)		
Čas (h)	Koncentracija surfaktina (mg/l)	Število pozitivnih kapljic						
4	11	1	4	1	19	2	21	2
24	1000	8	1300	8	900	8	940	8
48	970	8	1200	8	1100	8	1100	8

Priloga C3: Koncentracije surfaktina (mg/l) pridobljene s HPLC in število pozitivnih kapljic (kapljice, ki se pri izvedbi kapljičnega testa »razlezejo« na površini parafilma zaradi prisotnosti surfaktina) v gojišču MMS z dodanim predhodno dvakrat redčenim zunajim signalom ComX (koncentracija 0,75 µM).

PS216 wt (1)		PS216 wt (2)		PS216 ΔcomQ (1)		PS216 ΔcomQ (2)		
Čas (h)	Koncentracija surfaktina (mg/l)	Število pozitivnih kapljic						
4	9	1	9	1	18	2	15	2
24	1300	8	1100	8	1200	8	1300	8
48	1400	8	1400	8	1300	8	1400	8