

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Marina JEREMIĆ

**ANTIOKSIDATIVNI UČINEK ZUNAJCELIČNIH
IZLOČKOV KULTURE STREPTOMICET
(*Streptomyces cinnamonensis* IN
Streptomyces tsukubaensis)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Marina JEREMIĆ

**ANTIOKSIDATIVNI UČINEK ZUNAJCELIČNIH
IZLOČKOV KULTURE STREPTOMICET
(*Streptomyces cinnamonensis* IN *Streptomyces tsukubaensis*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACELLULAR SECRETIONS
STREPTOMYCETES CULTURE
(*Streptomyces cinnamonensis* AND *Streptomyces tsukubaensis*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana doc.dr. Helena Abramovič, za somentorja doc.dr. Hrvoje Petković in za recenzentko doc.dr. Nataša Šegatin.

Mentorica: doc.dr. Helena Abramovič

Somentor: doc.dr. Hrvoje Petković

Recenzentka: doc.dr. Nataša Šegatin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marina Jeremić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 547.56:577.1:604.4:579.873.7(043)=163.6
 KG fenolne spojine/flaviolin/antioksidativna aktivnost/sekundarni metaboliti/
 protimikrobne snovi/streptomicete/*Streptomyces cinnamomensis*/*Streptomyces tsukubaensis*/ekstrakcija na trdni fazi/SPE/HPLC/
 AV JEREMIĆ, Marina
 SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/ PETKOVIĆ, Hrvoje (somentor)/ŠEGATIN, Nataša (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
 LI 2012
 IN ANTIOKSIDATIVNI UČINEK ZUNAJCELIČNIH IZLOČKOV KULTURE STREPTOMICET (*Streptomyces cinnamomensis* IN *Streptomyces tsukubaensis*)
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP IX, 50 str., 7 pregl., 19 sl., 59 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI V okviru diplomske naloge smo raziskovali vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost v zunajceličnih izločkih rekombinantnih sevov *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamomensis*, v katere smo vnesli gen za biosintezo kalkon sintaze *rppA* iz *Saccharopolyspora erythraea*. Gen *rppA* kodira encim kalkon sintazo, zato oba transformirana seva proizvajata rdeče-rjavo obarvane flavioline s potencialno antioksidativno aktivnostjo. Oba seva sta bila transformirana z integrativnim plazmidom, ki je vseboval *rppA* pod kontrolo promotorjev ErmE in močnega promotorja ErmE*. Kot kontrolo pa smo uporabili ekstrakte obeh sevov, ki niso vsebovali *rppA* gena. Po inokulaciji vseh šestih sevov v ustrezna gojišča in inkubaciji smo dobljene kulture obdelali s centrifugiranjem in supernatante uporabili za nadaljnje analize. Za določanje flaviolina v supernatantu obeh kultur streptomicet s HPLC metodo, smo izvedli čiščenje z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE). HPLC analiza je pokazala na prisotnost flaviolinov pri sevu *Streptomyces tsukubaensis* s transformiranim genom *rppA* pod močnim promotorjem ErmE*. Količino celokupnih fenolnih spojin smo določili s Folin-Ciocalteu metodo in ugotovili, da neprečiščeni vzorci vsebujejo znatno več fenolnih spojin od prečiščenih. Z DPPH• metodo smo ugotovili, da imajo vzorci *Streptomyces cinnamomensis* slabšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala od vzorcev *Streptomyces tsukubaensis*. Pri ugotavljanju sposobnosti redukcije in vezave kovinskih ionov se je izkazalo, da je prečiščen vzorec *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* reduciral več Fe³⁺ ionov od neprečiščenega vzorca in je imel boljšo sposobnost vezave kovinskih ionov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 547.56:577.1:604.4:579.873.7(043)=163.6
 CX phenolics/flaviolin/antioxidant activity/secondary metabolites/antimicrobials//*Streptomyces*/*Streptomyces cinnamonensis*/*Streptomyces tsukubaensis* /solid phase extraction/SPE/HPLC/
 AU JEREMIĆ, Marina
 AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/ PETKOVIĆ, Hrvoje (co-advisor)/ ŠEGATIN, Nataša (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2012
 TI ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACELLULAR SECRETIONS STREPTOMYCETES CULTURE (*Streptomyces cinnamonensis* AND *Streptomyces tsukubaensis*)
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO IX, 50 p., 7 tab., 19 fig., 59 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The content of total phenolic compounds and antioxidant efficiency of extracellular secretions of two *Streptomyces* species were determined in this graduation work. We worked with two recombinant strains: *Streptomyces tsukubaensis* and *Streptomyces cinnamonensis*, which contained gene *rppA* for biosynthesis of chalcone synthase from *Saccharopolyspora erythraea*. Gene *rppA* codes enzyme chalcone synthase, so both transformed strains produce red-brown colored flaviolin with potential antioxidant activity. Both strains were transformed with integrative plasmid, which contained *rppA* under control of promoter ErmE and stronger promoter ErmE*. As control were used extracts of both strains without *rppA* gene. After inoculation on appropriated medium and incubation the samples were centrifuged. Supernatants were used for analysis. Supernatants were purified by solid phase extraction (SPE), before determination of flaviolin by use of HPLC. The results of HPLC analysis showed that flaviolin is present in the strain of *Streptomyces tsukubaensis* with stronger promoter ErmE*. The content of total phenolic compounds was determined according to Folin-Ciocalteu method. Higher level of phenolic compounds was determined in unpurified samples than in purified of both bacteria. We found out in the DPPH• scavenging activity that the samples of *Streptomyces tsukubaensis* are better scavengers of DPPH• radical than *Streptomyces cinnamonensis*. We checked reducing power and chelating activity in unpurified and purified sample of *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* and found out that purified sample reduced more Fe³⁺ than unpurified sample and had better capability of chelating metal ions.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX

1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANTIOKSIDANTI	3
2.1.3 Prosti radikali.....	3
2.1.2 Delitev antioksidantov	4
2.2 FENOLNE SPOJINE	6
2.2.1 Splošno o fenolnih spojinah	6
2.2.2 Flavonoidi.....	6
2.3 METODE DETEKCIJE IN DOLOČITVE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI FENOLNIH SPOJIN	8
2.4 AKTINOMICETE	10
2.4.1 Splošno o aktinomicetah	10
2.4.1.1 Pomen aktinomicet	10
2.4.3 Streptomicete	10
2.5 SEKUNDARNI METABOLITI	11
2.5.1 Poliketidi.....	12
2.5.2 Antibiotiki, ki jih proizvajajo bakterije <i>Streptomyces spp.</i>	12
2.5.3 Produkcija flaviolina	13
2.5.3.1 Kalkon- sintaze.....	13
2.5.3.2 Promotor	14
2.5.3.3 Gen <i>rppA</i>	14

3	MATERIALI IN METODE	15
3.1	MATERIALI	15
3.1.1	Mikroorganizem	15
3.1.2	Reagenti in topila	16
3.1.3	Aparature	17
3.1.4	Pribor	17
3.2	METODE DELA	19
3.2.1	Ekstrakcije na trdni fazi	19
3.2.2	HPLC analiza	19
3.2.3	Določitev skupnih fenolnih spojin	20
3.2.3.1	Priprava umeritvene krivulje	20
3.2.4	Ugotavljanje antioksidativnega delovanja supernatanta	23
3.2.4.1	Določitev sposobnosti lovljenja radikala DPPH•	23
3.2.4.2	Določitev sposobnosti redukcije	24
3.2.4.3	Določitev sposobnosti vezave kovinskih ionov	25
3.2.5	Statistična obdelava	25
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	27
4.1	HPLC ANALIZA	27
4.2	VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	28
4.3	SPOSOBNOST LOVLJENJA RADIKALA DPPH•	32
4.4	SPOSOBNOST REDUKCIJE	36
4.5	SPOSOBNOST VEZAVE KOVINSKIH IONOV	39
5	SKLEPI	43
6	POVZETEK	44
7	VIRI	46

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Opis delovnih mikroorganizmov	15
Preglednica 2: Volumen (V) galne kisline, vrednosti masne koncentracije galne kisline ($\gamma_{g.k.}$) in povprečne vrednosti absorbanc (A_{765})	21
Preglednica 3: Vrednosti absorbanc (A_{765}) in masnih koncentracij FS (γ) neprečiščenih vzorcev <i>Streptomyces tsukubaensis</i> in <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	28
Preglednica 4: Vrednosti absorbanc (A_{765}) in masnih koncentracij FS (γ) prečiščenih vzorcev <i>Streptomyces tsukubaensis</i> in <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	30
Preglednica 5: Vrednosti volumnov (V), absorbanc (A_{517}), masnih koncentracij FS (γ), deležev preostalega DPPH• po 30 min inkubacije, vrednosti k in masnih koncentracij FS, ki so potrebne za znižanje DPPH• za 50 % ($ED_{50\%}$)	33
Preglednica 6: Vrednosti volumnov (V), absorbanc (A_{740}), masnih koncentracij FS (γ) in redukcijske moči (C_R) v neprečiščenem in prečiščenem vzorcu <i>Streptomyces tsukubaensis</i> ErmE*	36
Preglednica 7: Vrednosti volumnov (V), absorbanc (A_{562}), masnih koncentracij FS (γ) in koeficientov sposobnosti tvorbe kompleksov (C_{CA}) neprečiščenega in prečiščenega vzorca <i>Streptomyces tsukubaensis</i> ErmE*	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram in Simčič, 1997)	7
Slika 2: Visokoločljivostni tekočinski kromatograf (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007)	8
Slika 3: Dvožarkovni UV in VIS spektrofotometer (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).....	9
Slika 4: Barvna kolonija modelne streptomicete <i>S. coelicolor</i> (Marinelli, 2009).....	11
Slika 5: Strukturna formula antibiotika monenzin (Glazer in Nikaido, 2007)	13
Slika 6: Potek sinteze flaviolina iz malonil-CoA (Magdevska in sod., 2010).....	14
Slika 7: Umeritvena krivulja z galno kislino	21
Slika 8: Strukturna formula DPPH• (Prior in sod., 2005).....	23
Slika 9: Kromatogram prečiščenega vzorca <i>Streptomyces tsukubaensis</i> ErmE*	27
Slika 10: Koncentracije fenolnih spojin v neprečiščenih vzorcih <i>S. tsukubaensis</i> in <i>S. cinnamonensis</i>	29
Slika 11: Koncentracije fenolnih spojin v prečiščenih vzorcih <i>S. tsukubaensis</i> in <i>S. cinnamonensis</i>	31
Slika 12: Delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin (γ) neprečiščenega supernatanta bakterije <i>Streptomyces cinnamonensis</i> ErmE*	34
Slika 13: Koncentracije fenolnih spojin neprečiščenih vzorcev kultur <i>S. tsukubaensis</i> in <i>S. cinnamonensis</i> ter prečiščenega vzorca <i>S. tsukubaensis</i> ErmE*, ki so potrebne za razgradnjo 50% DPPH• radikala ($ED_{50\%}$).....	35
Slika 14: Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin neprečiščenega supernatanta <i>S. tsukubaensis</i> ErmE*	37
Slika 15: Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin prečiščenega supernatanta <i>S. tsukubaensis</i> ErmE*	37
Slika 16: Sposobnost redukcije neprečiščenega in prečiščenega supernatanta <i>S. tsukubaensis</i> ErmE*	38
Slika 17: Odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti (C_{CA}) od masne koncentracije fenolnih spojin (γ) neprečiščenega supernatanta <i>S. tsukubaensis</i> ErmE*	41
Slika 18: Odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti (C_{CA}) od masne koncentracije fenolnih spojin (γ) prečiščenega supernatanta <i>S. tsukubaensis</i> ErmE*	41
Slika 19: Koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov (C_{CA}) za neprečiščen in prečiščen vzorec <i>S. tsukubaensis</i> ErmE* pri masni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski mešanici 7 μ g/mL.....	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AH– antioksidant

C_{CA} – koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov (chelating activity)

C_{OA} – koencim A

C_R – redukcijska moč

DPPH• – 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil radikal

$ED_{50\%}$ – koncentracija fenolnih spojin, ki je odgovorna za 50 % zmanjšanje začetne količine DPPH•

FC – Folin-Ciocalteu reagent

FS – fenolne spojine

GC – gvanin-citozin

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High-performance liquid chromatography)

ISP 4 – kompleksno čvrsto gojišče, ki se uporablja za namnoževanje in sporulacijo bakterije *Streptomyces tsukubaensis*

MetOH – metanol

PEG – polietilenglikol

PROD-MON – kompleksno tekoče gojišče, ki se uporablja za produkcijsko fazo kultivacije bakterije *Streptomyces cinnamonensis*

PSTS – kompleksno tekoče gojišče, ki se uporablja za produkcijsko fazo kultivacije bakterije *Streptomyces tsukubaensis*

$R\bullet$ – prosti radikal

$ROO\bullet$ – peroksilni radikal

ROOH – peroksid

SAM – kompleksno čvrsto gojišče, ki se uporablja za namnoževanje in sporulacijo bakterije *Streptomyces cinnamonensis*

SPE – ekstrakcija na trdni fazi

S. cinnamonensis – *Streptomyces cinnamonensis*

S. tsukubaensis – *Streptomyces tsukubaensis*

VEG-MON – kompleksno tekoče gojišče, ki se uporablja za vegetativno fazo kultivacije bakterije *Streptomyces cinnamonensis*

VSTS – kompleksno tekoče gojišče, ki se uporablja za vegetativno fazo kultivacije bakterije *Streptomyces tsukubaensis*

γ – masna koncentracija

1 UVOD

Fenolne spojine iz različnih naravnih virov so že leta predmet raziskav. Poleg zaviranja oksidacije lipidov in mikrobne rasti v živilih izkazujejo tudi biološko aktivnost *in vivo*, saj delujejo protivnetno, antialergijsko, antimutageno in antikancerogeno, torej ščitijo pred številnimi boleznimi. Rastlinske fenolne spojine so naravni antioksidanti. Antioksidant je molekula, ki zavira oz. preprečuje proces oksidacije drugih molekul (Boyer, 2005).

Spojine v živih organizmih lahko razdelimo na dve glavni skupini: primarne in sekundarne metabolite. Primarni metaboliti so tisti, ki nastanejo in so vključeni v primarne metabolne procese, tako kot npr. glikoliza, celično dihanje in fotosinteza. Sekundarni metaboliti nastajajo iz primarnih metabolitov. Najbolj pomembni so: poliketidi, fenolne spojine, terpenoidi, cianogeni glikozidi in alkaloidi. Flavonoidi so med fenolnimi spojinami največja skupina (Bravo, 1998).

V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lupin in korenin. Akumulirajo se predvsem v epidermalnem tkivu rastline in sodelujejo v zaščiti pred zunanjimi stresji (UV, mikrobi, insekti), učinkujejo kot vizualni markerji (cvetovi, sadeži) ter vplivajo na senzorične lastnosti (barva, okus, aroma) živilskih izdelkov. V celici so v vakuoli ali so vezani na elemente celične stene (Abramovič in sod., 2008). V naravi so flavonoidi običajno glikozirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide, npr. glukoza, galaktoza, ipd (Caballero, 2003).

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni, ki vsebujejo enega ali več neveznih valenčnih elektronov. So visoko reaktivne zvrsti, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni (Halliwell, 1996). Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin je posledica njihove sposobnosti lovljenja radikalov, vezave kovinskih kationov ali sposobnosti inhibicije encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek radikalov (Gorinstein in sod., 2003). Uporaba fenolnih spojin v vsakdanji prehrani se je v zadnjih letih povečala, saj naj bi pomembno prispevali k zmanjševanju zdravstvenih težav oz. k preprečevanju nekaterih degenerativnih bolezni prav zaradi svoje sposobnosti lovljenja prostih radikalov v celicah.

Streptomicete so grampozitivne aerobne bakterije iz družine *Streptomycetaceae* in spadajo v rod aktinomicet (Likar, 1987). Streptomicete večino časa obstajajo v obliki metabolno neaktivnih spor, ki so zelo odporne, v zemlji se nahajajo kot saprofiti in tvorijo značilen vonj po zemlji, kar je posledica njihove tvorbe metabolitov, ki jim pravimo geozmini (Swanson, 2003). Poleg tega proizvajajo še terapevtske spojine kot so antimikrobiološki agensi, farmakološko aktivne spojine, herbicidi in vrsto ekstracelularnih encimov.

Zaradi sposobnosti sinteze antibiotikov se streptomicete v farmacevtski industriji uporabljajo že od zgodnjih 50 let prejšnjega stoletja. Dva industrijska seva, ki se zelo uporabljata za proizvodnjo sekundarnih metabolitov, sta *Streptomyces cinnamomensis*, ki je proizvajalec polieterskega kokcidiostatika monenzin in *Streptomyces tsukubaensis*, ki je proizvajalec medicinsko pomembnega imunosupresorja FK506 (Pühler, 1993). Dodatek ustreznega promotorja pred vnešenim genom *rppA*, ki izvira iz aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea* in kodira sintezo flaviolinov v obeh streptomicetah zveča produkcijo flaviolinov med njuno kultivacijo.

1.1 NAMEN NALOGE

Cilj diplomskega dela je bil:

- ugotoviti razlike v produkciji fenolnih spojin med dvema vrstama bakterij (*Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamomensis*), v katere smo predhodno vnesli gen kalkon sintazo iz *Saccharopolyspora erythraea*, ki kodira biosintezo flaviolinov,
- pokazati, da na produkcijo fenolnih spojin vpliva vnešeni gen *rppA*,
- optimizacija metode predpriprave sistema (ekstrakcija na trdni fazi) za določitev flaviolinov s HPLC v supernatantu kulture streptomicet,
- preveriti, ali metoda ekstrakcije na trdni fazi vpliva na vsebnost fenolnih spojin in njihovo antioksidativno učinkovitost,
- določiti, ali ima supernatant kulture streptomicet antioksidativni učinek,
- določiti, ali je antioksidativni učinek supernatanta odvisen od seva streptomicet,
- določiti, ali na antioksidativni učinek supernatanta vpliva izbira promotorja,
- preveriti, ali je vsebnost flaviolinov v supernatantu kulture streptomicet povezana z antioksidativnim učinkom omenjenega supernatanta.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Tekom raziskave pričakujemo:

- bakteriji *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamomensis*, v katere smo predhodno vnesli gen kalkon sintazo iz *Saccharopolyspora erythraea*, ki kodira biosintezo flaviolinov, izločata fenolne spojine, produkte gena *rppA* iz *S. erythraea*
- med preiskovanima vrstama bakterij obstajajo razlike v produkciji fenolnih spojin,
- izbira promotorja vpliva na produkcijo fenolnih spojin,
- postopek ekstrakcije na trdni fazi vpliva na vsebnost fenolnih spojin v supernatantih in njihovo antioksidativno učinkovitost,
- supernatant obeh sevov streptomicet ima antioksidativni učinek,
- antioksidativni učinek supernatanta je odvisen od seva streptomicet,
- na antioksidativni učinek supernatanta vpliva izbira promotorja,
- prisotnost flaviolinov v supernatantu kulture streptomicet je povezana z antioksidativnim učinkom omenjenega supernatanta.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANTIOKSIDANTI

2.1.1 Prosti radikali

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim neparnim elektronom. So reaktivne spojine, ker hitro reagirajo z drugimi snovmi na način, da jim poskušajo odvzeti elektron. Kadar določena spojina izgubi elektron, postane sama prosti radikal, kar privede do verižne reakcije, katere posledica je nastanek različnih radikalskih zvrsti (Halliwell, 1996). Najpomembnejši kisikovi radikali so superoksidni anion ($\bullet\text{O}_2^-$), hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$), radikal dušikovega oksida ($\text{NO}\bullet$) in peroksilni radikal ($\text{ROO}\bullet$). Med reaktivne kisikove zvrsti sodita tudi singletni kisik ($^1\text{O}_2$) in vodikov peroksid (H_2O_2). Porušeno ravnotežje med radikali in antioksidanti imenujemo oksidativni stres (Huang in sod., 2005).

Avtooksidacija maščob je verižna radikalska reakcija, kar pomeni, da poteka kot serija ponavljajočih se reakcij, v katerih nastajajo radikali. Avtooksidacija maščob vsebuje tri osnovne faze:

- iniciacija-začetek
- propagacija-širjenje
- terminacija-zaključek

Antioksidanti preprečijo verižne reakcije oksidacije s tem, da se vključijo v fazo iniciacije ali propagacije, kar privede do prekinitve verižne reakcije in odložitve degradacijskih reakcij.

Antioksidanti so spojine, za katere velja, da preprečujejo oksidacijo snovi s tem, ko reagirajo s prostimi radikali, odstranjujejo oksidativno poškodovane molekule ali vežejo kovinske ione (Boyer, 2005). Antioksidante delimo v tri velike skupine. V prvi so pravi antioksidanti, ki reagirajo s prostimi radikali, v drugi so reducenti in v tretji so spojine, ki povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine (Kač, 2000).

2.1.2 Delitev antioksidantov

Primarni antioksidanti nastajajo v organizmu ali jih tvorijo mikroorganizmi, to so predvsem encimi, npr. superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, ceruloplazmin. Njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov. Med primarne antioksidante prištevamo tudi snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinajo verižno reakcijo avtooksidacije. Najpogostejše antioksidant poseže v reakcijo avtooksidacije s tem, da hitro odda vodikov atom lipidnemu radikalu ($R\bullet$, $ROO\bullet$), ki bi sicer omogočil tvorbo novih radikalov. Nastali radikal antioksidanta ($A\bullet$) mora biti bolj stabilen, kot sam lipidni radikal (Madhavi in sod., 1996):



V to skupino uvrščamo naslednje spojine:

- Fenoli: galati, hidrokinoni.
- Derivati fenolov: guajak gume, butiliran hidroksianisol, butiliran hidroksitoluen, tokoferoli, *t*-butilhidrokinon.
- Različni primarni antioksidanti: Etoksikvin, Anoxomer, Trolox-C.

Sekundarni antioksidanti so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo. Njihova značilnost je, da reagirajo s kovinskimi ioni, ki so katalizatorji oksidacije, odvzemajo kisik iz medija, razgrajujejo hidroperokside do komponent, ki niso radikali in absorbirajo UV svetlobo. Sekundarne antioksidante uvrščamo v naslednje skupine:

- Odjemalci O_2
- Sinergisti

Odjemalci kisika delujejo na principu, da z reakcijo odvzemanja kisika, preprečijo neželeno oksidacijo živila. Te spojine reagirajo s prostim kisikom in ga kot takšnega odstranijo iz sistema. Prosti kisik reagira z odjemalci kisika, ki jih tudi oksidira. Med najpomembnejšimi odjemalci kisika so: askorbinska kislina, askorbil palmitat, encimi (katalaza, ksantin oksidaza), flavonoidi, karotenoidi, polifenoli in sulfiti (Madhavi in sod., 1996).

Sinergisti so snovi, za katere velja, da niso čisto pravi antioksidanti, so pa zelo učinkoviti v reakcijah, ki preprečujejo oksidacijo. Tako je na primer citronska kislina aktivna s primarnimi antioksidanti in odjemalci kisika. Glavni princip reakcije je v tem, da vežejo kovinske ione, kot sta železo in baker in tvorijo stabilne komplekse.

Med najpogostejšimi tvorci kelatov so: etilen diaminotetraocetna kislina (EDTA), fitinska kislina, polifosfati, vinska kislina, citronska kislina, lecitin, aminokisline, peptidi in fosfolipidi.

Terciarni antioksidanti so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice (encimi, ki »popravljajo« poškodbe DNA, npr. metionin sulfoksid reduktaza) (Madhavi in sod., 1996).

Naravni antioksidanti imajo nekaj prednosti, vendar tudi slabih strani v primerjavi s sintetičnimi (Abram in Simčič, 1997).

Prednosti naravnih antioksidantov:

- so bolj sprejemljivi za potrošnike
- porabniki jih imajo za bolj varne
- posebnih testov o njihovi škodljivosti ni potrebno opravljati, ker veljajo za splošno priznane in varne (GRAS) sestavine živil

Slabosti naravnih antioksidantov:

- dražji, ker jih je treba očistiti
- če niso očiščeni, so manj učinkoviti
- lastnosti lahko zaradi tega variirajo med različnimi pripravki
- poleg tega lahko dajo še dodatno barvo, priokus in slabši vonj izdelku

2.2 FENOLNE SPOJINE

2.2.1 Splošno o fenolnih spojinah

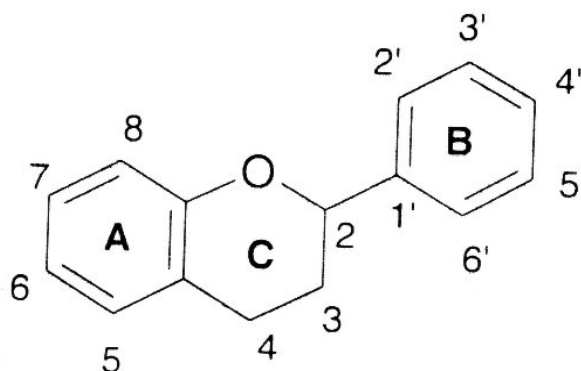
V naravi najdemo veliko število strukturno raznolikih spojin, ki jim s skupnim imenom pravimo polifenoli ali fenolne spojine. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo v rastlinski celici (Balasundram in sod., 2006). Običajno je fenolnih spojin v rastlinah približno 1 - 2% (w/w). Za rastlino so posebnega pomena, tako s fiziološkega kot z morfološkega stališča. Fenolne spojine dajejo karakterističen vonj in okus ter farmakološke učinke rastlinam. Opravljajo funkcijo barvil, koencimov, protimikrobnih agensov in fitoaleksinov. Fenolne spojine so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani in se nahajajo samo v živilih rastlinskega izvora (Vrhovšek, 2001). Največ raziskav na področju polifenolov je bilo narejenih na področju njihove antioksidativnosti, s katero naj bi pozitivno prispevali k zmanjšanju kroničnih degenerativnih bolezni, kardiovaskularnih bolezni ter raka. Protimikrobno aktivne snovi v živilih so lahko endogenega izvora, torej izhajajo iz surovine, bodisi rastlinskega, živalskega ali mikrobnega izvora. Primer so številne organske kisline in fenolne spojine v sadju in zelenjavi.

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več hidroksilnih ($-OH$) skupin, neposredno vezanih na aromatski obroč (Gordon, 2003).

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi so spojine zgrajene iz 15 C-atomov. Te spojine so sestavljene iz aromatskih obročev A in B, ki ju povezuje heterociklični obroč C. Med flavonoide spadajo različne spojine, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega C obroča, kot tudi po različnih substituentah na obročih A, B, in C (Javornik, 2008). Na flavonoidnem skeletu so $-OH$ skupine na mestih C_3 , C_5 in v *o*-položaju na B obroču. Slika 1 prikazuje osnovno strukturno formulo flavonoidov. Tako so flavonoidi razdeljeni na 12 skupin: dihidroflavonole, flavone, flavonole, katehine, flavanone, antocianidine, kalkone, avrone, flavan-3,4-diole, neoflavone, dihidrokalkone in izoflavone (Caballero in sod., 2003).

Flavonoidi so v rastlinah večinoma prisotni kot glikozidi. To pomeni, da imajo na eno ali več hidroksilnih skupin aglikona (nesladkorni del molekule) vezano sladkorno komponento. Sladkorna komponenta je vezana s hemiacetal-hidroksilno vezjo (Rice-Evans in sod., 1996).



Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006)

Flavonoidi so antioksidanti, ki lahko preprečijo oksidacijo lipidov na več načinov:

- Z lovljenjem radikalov
- Vezavo kovinskih ionov
- Z inhibicijo encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek prostih radikalov

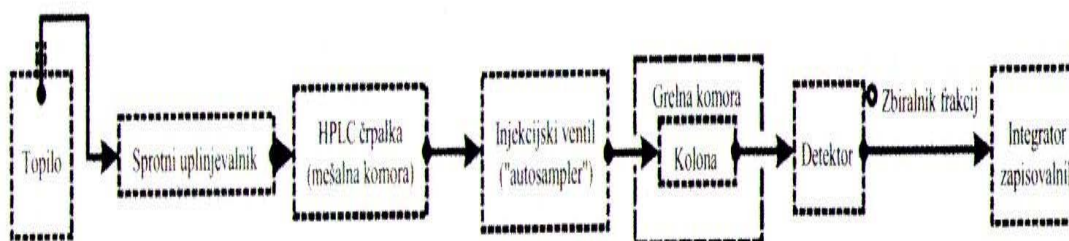
Flavonoidom kot antioksidantom prepisujejo predvsem zmožnost lovljenja radikalov, za kar je pomembna stabilnost radikala antioksidanta. Reaktivnost mnogih radikalov s flavonoidi je zelo odvisna od pH. Pomembna lastnost flavonoidov, posebno tistih, ki imajo na obroču B dve –OH skupini v orto položaju, je sposobnost vezave kovinskih ionov v kelatne spojine (Cushnie in Lamb, 2005).

Antioksidativno učinkovitost flavonoidov zviša večje število hidroksilnih skupin na B-obroču v molekuli, dvojna vez med drugim in tretjim ogljikovim atomom, konjugirana s 4-okso skupino v C-obroču in prisotnost hidroksilne skupine na tretjem ogljikovem atomu v C-obroču ter stopnja polimerizacije (Abram, 2000). Flaviolin sodi med naftokinone, ki jih Goodwin in Mecer uvrščata med fenolne spojine z osnovnim skeletom C_6C_4 in ima podobno kot druge rastlinske fenolne spojine antioksidativni učinek (posredni citat Goodwin in Mecer, 1983 v Abram, 2000).

2.3 METODE DETEKCIJE IN DOLOČITVE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI FENOLNIH SPOJIN

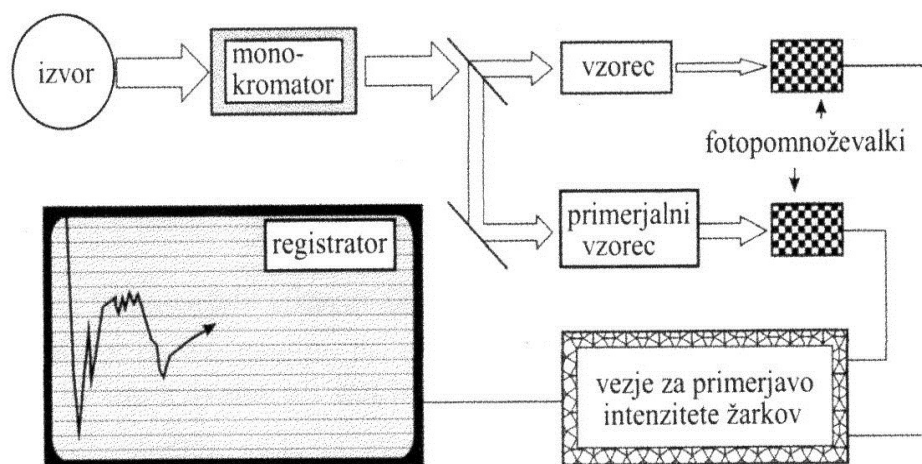
Med metodami, ki se uporabljajo v analitiki fenolnih spojin, sta spektrofotometrija in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) najbolj razširjeni. HPLC je vrsta kromatografske metode, ki se uporablja za določanje različnih spojin v živilih. Je zelo uporabna, hitra, zanesljiva in učinkovita metoda za določanje velikega števila snovi. Osnova kromatografskih metod je v razliki hitrosti migracije posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (tekočina) zaradi selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina) (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007). Fenolne spojine so polarne snovi in so topne v polarnih topilih. Za ločbo fenolnih snovi uporabljamo tekočo polarno mobilno fazo in nepolarno trdno stacionarno fazo (reverznofazna kromatografija). Za izpiranje se lahko uporablja metanol, acetonitril in raztopine očetne kisline, fosforne kisline ali mravljične kisline (Caballero, 2003).

Detektorji zaznajo in merijo količine snovi, ki se eluirajo iz kolone. Sama meritev poteka kontinuirano, saj je čas zadrževanja na koloni karakterističen za posamezno snov. Sama izbira detektorja je odvisna od komponent, ki jih želimo določati. Za analizo posameznih spojin flavonoidov se HPLC uporablja v kombinaciji z različnimi detektorji: dioda array, masnim, fluorescenčnim in elektrokemijskim detektorjem. V zadnjih letih narašča uporaba kombinacije tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo za detekcijo polifenolov. Rezultat kromatografske meritve je kromatogram, ki podaja podatke o kvalitativni sestavi vzorca (položaj vrhov), kvantitativni sestavi vzorca in kompleksnosti vzorca (število vrhov) (Skoog in sod., 2006). Shema visokoločljivostnega tekočinskega kromatografa je predstavljena na sliki 2.



Slika 2: Visokoločljivostni tekočinski kromatograf (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007)

Za detekcijo in kvantitativno določanje vsebnosti fenolnih spojin se lahko uporabljajo spektrofotometrične metode v območju ultravijolične ali vidne svetlobe. Za flavonoide sta značilna dva absorpcijska pasova: prvi v razponu 240-285 nm, za katerega se verjame da nastane iz A obroča in drugi z maksimalnim razponom 300-550 nm, ki nastane iz B obroča (Murkovic, 2003). Sam absorpcijski spekter je odvisen strukture spojin, števila in vrste substituent ter velikosti konjugiranega sistema. S spektrofotometričnimi metodami je mogoče določevati skupne antociane, nizkomolekularne flavonoide in flavonoide višjih molekulskih mas. Sestava spektrofotometra je predstavljena na sliki 3.



Slika 3: Dvožarkovni UV in VIS spektrofotometer (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007)

Najbolj razširjeni testi, ki se uporabljajo za določitev antioksidativne učinkovitosti flavonoidov, temeljijo na merjenju sposobnosti lovljenja prostih radikalov, vezave kovinskih ionov, inhibicije inducirane lipidne avtooksidacije in moči redukcije. Pri *in vitro* metodah se uporabljajo različni radikali, kot so 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kislina) radikal (ABTS•), N,N-dimetil-p-fenilendiamin radikal (DMPD•⁺) in 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH•) (Locatelli in sod., 2009). Obstaja veliko metod za določanje antioksidativne učinkovitosti in vsaka ima svoje omejitve. Dokazano je bilo, da različne metode dajo različne rezultate o antioksidativni učinkovitosti (Gorinstein in sod., 2003).

2.4 AKTINOMICETE

2.4.1 Splošno o aktinomicetah

Aktinomicete so po Gramu pozitivne bakterije in so umeščene v red *Actinomycetales*, kamor sodijo družine *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Propionibacter*, *Streptomyces*, *Micromonospora* in *Frankia*. Večina aktinomicet naseljuje prst in humus ter daje tem substratom zaradi svoje proizvodnje substanc, ki jim pravimo geozmini, značilen vonj po prsti (Madigan in sod., 2004). Aktinomicete se razmnožujejo s pomočjo spor, ki se tvorijo iz verig celic, ki rastejo iz podlage v zrak in dajejo kolonijam značilen žametni videz. Mnoge aktinomicete rastejo na navadnih mikrobioloških gojiščih, kot so krvni, sojin ali hranilni agar (Holt in sod., 1994). Aktinomicete imajo zelo debelo celično steno (več kot 40 plasti peptidoglikana). Peptidoglikan je pomembna strukturna sestavina bakterijskih celičnih sten, saj daje celicam trdnost in jih ščiti pred osmotskim pritiskom v citoplazmi (Raspor, 1996).

2.4.1.1 Pomen aktinomicet

Aktinomicete so pomembne, ker tvorijo številne sekundarne metabolite, od katerih so najbolj pomembni antibiotiki. V znanosti so aktinomicete postale zanimive od leta 1940, ko so odkrili, da proizvajajo antibiotik aktinomicin in čez tri leta streptomycin, ki velja za prvi učinkovit antibiotik v zdravljenju tuberkuloze (Madigan in sod., 2004). Sekundarni metaboliti aktinomicet imajo protibakterijske, protiglivne in protirakave lastnosti. Antibiotiki jim pomagajo zadrževati konkurenčne mikroorganizme čim dlje od njihove hrane in življenjskega prostora. Mikroorganizmi, ki proizvajajo antibiotike so odporni proti lastnim antibiotikom, kar pa jih ne ščiti pred antibiotiki drugih mikroorganizmov, če ne gre za enak tip antibiotika oz. enak princip odpornosti proti antibiotiku (Watve in sod., 2001).

2.4.3 Streptomicete

Streptomicete so grampozitivne nitaste bakterije iz reda *Actinomyces* (Raspor, 1996). Streptomicete so striktni aerobi. Optimalna T za njihovo rast je 25-35 °C, optimalni pH pa 6,5-8,0. V njihovem genomu je molski delež parov gvanin-citozin (GC) od 63 do 78 % (Holt in sod., 1994). Streptomicetni sevi rastejo v obliki filamentov, ki jim pravimo hife in se povezujejo v obliki mreže, ki ji pravimo micelij (Likar, 1987). Mnogi sevi proizvajajo enega ali več antibiotikov. Od vseh vrst aktinomicet, kar 80 % antibiotikov proizvajajo bakterije rodu *Streptomyces* (Kieser in sod., 2000). Poleg antibiotikov streptomicete proizvajajo še druge pomembne biološko aktivne snovi, kot so: inhibitorji encimov, ekstracelularni encimi in imunoaktivne spojine (imunosupresorji) (Madigan in sod., 2004). Na sliki 4 je prikazana streptomiceta *S. coelicolor*.



Slika 4: Barvna kolonija modelne streptomicete *S. coelicolor* (Marinelli, 2009)

Vse vrste streptomicet so sposobne celične diferenciacije. Diferenciacija in antibiotična produkcija sta bili raziskani predvsem na organizmu *Streptomyces coelicolor*, ki proizvaja vsaj štiri različne antibiotike in prvi celostni pregled kloniranja streptomicet je bil prvič objavljen deset let nazaj. V teoriji so lahko konjugacija, transformacija in transdukcija kot metode uporabljene za prenos DNA v streptomicete. Standardna tehnika je PEG (polietilenglikol) za transformacijo protoplastov. Elektroporacija se uporablja pri številnih aktinomicetah pa tudi pri streptomicetah, ampak rezultati transformacije niso tako uspešni kot z PEG-om (Pühler, 1993).

2.5 SEKUNDARNI METABOLITI

Sekundarni metaboliti so produkti celičnega metabolizma, ki niso nujno potrebni za rast organizma. Pri sintezi sekundarnega metabolita običajno sodeluje veriga encimov, ki enega ali več produktov primarnega metabolizma preoblikujejo v novo obliko, t.j. sekundarni metabolit. Njihova sinteza se zmeraj začne ob stresni situaciji. Po navadi gre za pomanjkanje hranil (Merillon in Ramawat, 2007). Sekundarni metaboliti imajo različne funkcije, in sicer lahko so antibakteriološki in antiglivni agensi, protirakava zdravila, imunosupresorji, herbicidi ali orodja za genski inženiring (Bibb, 2005). K sekundarnim metabolitom prištevamo tudi spojine, ki se pojavijo v rastlinah kot odgovor na infekcije, npr. fitoaleksini, izoprenoidi, flavonoidi (Bravo, 1998). Antibiotiki so sekundarni metaboliti, ki jih mikroorganizmi običajno proizvajajo pri nizkih stopnjah rasti ali ko je rast praktično že končana in za samo rast mikroorganizma niso esencialni (Gasparič, 2009). Antibiotiki v celici delujejo na pet tarčnih mest: celična stena, membrana, geni, proteini in metabolne poti (Chess in Cowan, 2009).

2.5.1 Poliketidi

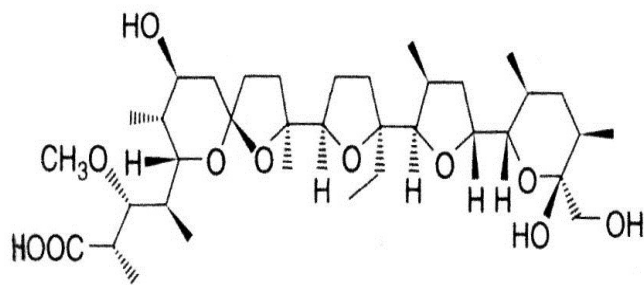
Poliketidi so spojine naravnega izvora, ki jih najpogosteje proizvajajo plesni in filamentozne bakterije (Petković in sod., 1998). Mednje spadajo številne medicinsko pomembne spojine, kot so antibiotiki eritromicin in tetraciklin, imunosupresanti FK506 in rapamicin, zdravila proti raku daunorubicin in epotilon ter številne druge tržno pomembne spojine (Blažič in sod., 2009). Spojine poliketidnega izvora obsegajo širok spekter biološko aktivnih učinkovin, kot so protibakterijske, protiglivne, protirakaste in imunosupresivne aktivnosti (Petković in sod., 2006). Številne raziskave na področju poliketidov in poliketidnih sintaz (multiencimski kompleksi, ki katalizirajo biosintezo poliketidov) v zadnjih desetih letih so v veliki meri posledica praktično neizčrpne palete bioloških aktivnosti in komercialne vrednosti teh naravnih spojin, ki trenutno predstavljajo ene izmed bolj obetavnih kandidatov za nova zdravila (Kuščer in sod., 2009).

2.5.2. Antibiotiki, ki jih proizvajajo bakterije *Streptomyces* spp.

Streptomicin je aminoglikozid, odkrit leta 1943 v laboratorijih Selmana Waksmana. Proizvaja ga bakterija *Streptomyces griseus*. Je prvi antibiotik, s katerim so zdravili tuberkulozo. Waksman je odkril tudi druge antibiotike, vključno z aktinomicinom in neomicinom (Hopwood, 1997).

Monenzin je pomembna vrsta poliketida, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces cinnamomensis* in je tudi toksična za nekatere vrste bakterij, glive in višje organizme. Za sintezo monenzina so najpomembnejši trije prekursorji, in sicer malonil-CoA, metilmalonil-CoA in etilmalonil-CoA (Li in sod., 2009). Monenzin je najbolj široko uporabna snov, ki se dodaja h krmi za goveda. Ugotovljeno je bilo, da dodatek monenzina prispeva k povečanju teže samih goved. Odmerek 350 mg/dan naj bi povečal samo težo goveda za 6 %. Monenzin deluje tako, da spremeni bakterijsko populacijo v govejem vampu, s čimer vpliva na ravnotežje končnega metabolizma vampa (Glazer in Nikaido, 2007). Struktura formula antibiotika monenzin je predstavljena na sliki 5.

Imunosupresor FK506 ali tacrolimus je 23-členski makrociklični poliketid, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces tsukubaensis*. Velja za pomembni antibiotik, ki ima visoko imunosupresivno aktivnost. Leta 1984 so ga prvi izolirali japonski znanstveniki iz mikroorganizma *Streptomyces tsukubaensis*, ki so ga našli v tleh japonske zemlje. Po dolgih letih raziskovanj, je FK506 postal komercialno dostopen šele leta 1994, najprej na Japonskem, istega leta pa še v Evropi. Danes se tacrolimus uporablja predvsem kot imunosupresor po transplantaciji organov (Kim in Park, 2008).

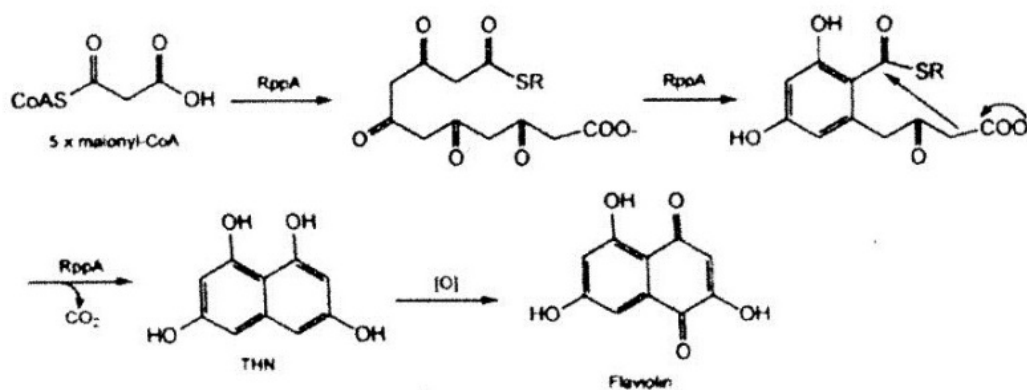


Monensin A

Slika 5: Strukturna formula antibiotika monenzin (Glazer in Nikaido, 2007)

2.5.3 Produkcija flaviolina

Flaviolin je temno rdeče-rjavo topen pigment, ki ga sintetizira encim kalkon-sintaza. Molekulo flaviolina so prvič izolirali leta 1953 iz organizma, ki so ga preučevali zaradi njegove zmožnosti produkcije citronske kisline iz glukoze in pri tem naleteli na neznano spojino, ki so jo poimenovali flaviolin (McGovern in Bentley, 1975). Osnovni gradnik iz katerega se sintetizira poliketid flaviolin je malonil-CoA. To je metabolit primarnega metabolizma. Posamezni deli malonil Co-A se pogosto povežejo v linearen pentaketid, ki se po končani sintezi sprosti iz encima in v celici dalje ciklizira v 1,3,6,8-tetrahidroksinaftalen (THN), ki je zelo nestabilna molekula, ki se dalje oksidira v 2,5,7-trihidroksi-1,4-naftokinon, t.j. flaviolin (Funa in sod., 1999). Molekule flaviolina pogosto dimerizirajo, nastali dimeri pa se združijo v večje polimerne strukture. Tako dobimo mešanico heterogenih pigmentnih molekul flaviolina in njemu podobnih spojin - flaviolinov (Cortes in sod., 2002). Shema nastajanja flaviolina je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Potek sinteze flaviolina iz malonil Co-A (Magdevska in sod., 2010)

2.5.3.1 Kalkon- sintaze

Kalkon sintaze so poliketidne sintaze tipa III, ki sintentizirajo kalkone. Poliketidne sintaze (PKS) so multi-encimski kompleksi, na katerih se sintentizira poliketidna veriga. Kalkon je kemijsko 1,3-difenil-2-propenon ($C_{15}H_{12}O$). Za kalkone velja, da so osnovni gradniki flavonoidov in drugih rastlinskih snovi, ki vplivajo na obarvanost cvetov, sodelujejo pri obrambi rastlin pred patogenimi organizmi in omogočajo komunikacijo med mikroorganizmi. Prva kalkon sintaza, ki so jo odkrili je bila iz vrste *Streptomyces griseus* (Funa in sod., 1999).

2.5.3.2 Promotor

Promotor je nukleotidno zaporedje, ki se nahaja na 5' koncu gena in regulira njegovo izražanje. Promotorji so specifične DNA sekvence, kjer se RNA polimerazni encimi prepisujejo. Promotor ErmE* je močan konstitutiven promotor, izoliran iz bakterije *Streptomyces erythraea* (Bibb in sod., 1985). Promotor ErmE* se uporablja za močno ekspresijo heterolognih proteinov v streptomicetah, saj se je v številnih raziskavah pokazal kot zelo močan promotor (Binnie in sod., 1997).

2.5.3.3 Gen *rppA*

Gen *rppA*, izoliran iz aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea* je robusten in večnamenski reporterski sistem, ki nam omogoča enostavno kvalitativno in kvantitativno merjenje, kjer lahko uporabimo laboratorijska ali kompleksna industrijska gojišča. Gen *rppA* ima zaradi svoje majhnosti, robustnosti in vsestranske uporabnosti velik potencial za uporabo v različnih aktinomicetnih gostiteljih tako v tekočem kot tudi v trdnem mediju. Tako je lahko uporabno orodje za študije biosinteze sekundarnih metabolitov, kjer moramo za doseganje izkoristkov tarčnega produkta in industrijske relevantnosti že v eksperimentalnih fazah uporabljati skrbno načrtovana kompleksna industrijska gojišča (Magdevska in sod., 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Mikroorganizem

Delali smo z dvema rekombinantnima sevoma *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamonensis*, v katere smo vnesli gen *rppA*, izoliran iz aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea*. Oba seva sta bila transformirana z integrativnim plazmidom, ki je vseboval gen *rppA* pod kontrolo promotorja ErmE in močnega promotorja ErmE*. Kot kontrolo smo uporabili ekstrakte obeh sevov, ki niso vsebovali *rppA* gena. Po inokulaciji vseh šestih sevov v ustrezna gojišča in inkubaciji, smo dobljene kulture obdelali s centrifugiranjem in supernatante uporabili za nadaljnje analize. Podrobnejši opis postopka je opisan v članku (Magdevska in sod., 2010). Tako pridobljene supernatante smo uporabili za naše analize. Uporabili smo naslednja gojišča: sporulacijski gojišči ISP4 in SAM, vegetativni gojišči VSTS in VEG-MON ter produkcijski gojišči PSTS in PROD-MON. Oba mikroorganizma smo dobili na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti, kjer je bil opravljen tudi zgoraj navedeni postopek, ki je vodil v pridobitev supernatantov. V preglednici 1 je podan opis vseh delovnih mikroorganizmov, ki smo jih uporabili tekom raziskave.

Preglednica 1: Opis delovnih mikroorganizmov

Oznaka	Opis
<i>S.tsukubaensis</i> k	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> kontrola (nima promotorja za sintezo flaviolina)
<i>S.tsukubaensis</i> ErmE	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> , ki ima promotor za šibkejšo sintezo flaviolina
<i>S.tsukubaensis</i> ErmE*	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> , ki ima promotor za močnejšo sintezo flaviolina
<i>S.cinnamonensis</i> k	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> kontrola (nima promotorja za sintezo flaviolina)
<i>S.cinnamonensis</i> ErmE	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> , ki ima promotor za šibkejšo sintezo flaviolina
<i>S. cinnamonensis</i> ErmE*	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> , ki ima promotor za močnejšo sintezo flaviolina

3.1.2 Reagenti in topila

- etanol (96%, Merck, Nemčija)
- natrijev karbonat (Alkaloid, Makedonija)
- galna kislina (Sigma, Nemčija)
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)
- kalijev heksacianoferat (III) (Kemika, Hrvaška)
- trikloroocetna kislina (Merck, Nemčija)
- železov (III) klorid (Carlo Erba Reagenti, Italija)
- železov (II) klorid (Kemika, Hrvaška)
- ferozin (Sigma, Nemčija)
- DPPH reagent (Sigma, Nemčija)
- fosfatni pufer (Sigma, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Švica)
- acetonitril (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)
- škrob (Merck, Nemčija)
- dikalijev hidrogenfosfat (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid (Merck, Nemčija)
- kalcijev karbonat (Kalcit, Slovenija)
- amonijev sulfat (Kemika, Hrvaška)
- železov sulfat (Kemika, Hrvaška)
- manganov (II) klorid (Sigma, Nemčija)
- cinkov sulfat (Kemika, Hrvaška)
- sojina moka (Cargill Foods, ZDA)
- glukoza (Merck, Nemčija)
- škrob (Cerestar, ZDA)
- kvasni ekstrakt (Sigma, Nemčija)

Za pripravo raztopin smo uporabljali bidestilirano vodo.

3.1.3 Aparature

- HPLC instrument Agilent 1100 in sestavni deli: binarna gradientna črpalka (Agilent 1100, G1312A), avtomatski podajalnik (Agilent 1100, G1130B) in termostat za kolono (Agilent 1100, G1316A)
- analitska tehtnica AT201 (Mettler Toledo, Švica)
- analitska tehtnica (Sartorius analytic)
- ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52, Nemčija)
- vrtinčnik Vibromax (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- hladilnik z zmrzovalnikom (Gorenje HZS 2926, Slovenija)
- štoparica
- UV-VIS spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, Združene države Amerike)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415C, Nemčija)
- centrifuga (Centric 322 B)
- vodna kopel (Büchi B-480, Švica)
- pH meter (Mettler Toledo, Švica)
- laminarij (PIO SMBC 122)
- avtoklav (Sutjeska)
- stresalnik (HT Infors)
- kolona Strata X (500 mL, Phenomenex)

3.1.4 Pribor

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- ladjice za tehtanje
- parafilm
- plastične epruvete
- steklene epruvete
- žlička za tehtanje
- gorilnik
- čaše
- Erlenmajerjeve steklenice (50 mL, 100 mL, 250 mL)
- 1 mL plastične centrifugirke (Eppendorf, Nemčija)

- 2 mL plastične centrifugirke (Eppendorf, nemčija)
- Falcon centrifugirke (50 mL)
- merilni valji (100 mL, 250 mL)
- nastavki za pipete (10 µl, 200 µL, 1000 µL)
- kivete (1,5 mL; 2,5 mL)
- sterilni zobotrebeci
- petrijeve plošče
- membranski filtri (0,45 µm)
- rokavice
- aluminijeva folija

3.2 METODE DELA

3.2.1 Ekstrakcije na trdni fazi

Supernatante smo dodatno čistili z metodo ekstrakcije na trdni fazi (SPE). Najprej smo odpipetirali v stekleno epruveto 3 mL supernatanta posameznega vzorca in dodali isto količino (3mL) acetonitrila (CH_3CN). Mešanico smo 1 min ročno mešali, nato je sledilo centrifugiranje 10 min pri 3000 obr/min oz. 1700 G. Dobljeni supernatant smo prelili v epruveto in dodali destilirano vodo, tako da je bil končni volumen 50 mL. Nato je sledila ekstrakcija na trdni fazi z uporabo kolone Strata-X. Kolono smo najprej aktivirali z 4 mL 80 % metanola ($\text{MetOH:H}_2\text{O}$, 80:20, w/w). Zatem smo skozi kolono spustili 4 mL destilirane vode. Po tem koraku je sledil nanos vzorca. Za spiranje vzorca s kolone smo uporabili po 4 mL metanola različnih koncentracij (15, 30, 40, 50, 60, 80, 100 %, v/v). Pri spiranju z metanolom določene koncentracije smo dobili različno obarvane frakcije, od brezbarvne (pri spiranju s 15 % metanolom) do rdeče barve (pri spiranju s 80 % metanolom). Frakcija, najbolj podobna barvi flaviolina se je pri vseh šestih vzorcih pojavila pri uporabi 80 % metanola, zato smo to frakcijo uporabili za HPLC analizo in ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti.

3.2.2 HPLC analiza

Analizo smo izvedli na HPLC sistemu Agilent 1100, ki ga sestavljajo:

- binarna gradientna črpalka (Agilent 1100, G1312A)
- avtomatski podajalnik (Agilent 1100, G1130B)
- termostat za kolono (Agilent 1100, G1316A)
- predkolona: Gemini C18 (Phenomenex, ZDA), 4,0 mm × 2,0 mm
- kolona: Gemini C18 (Phenomenex, ZDA), 3 μm , 150 mm × 2,0 mm
- mobilna faza: mobilna faza A: 1 % HCOOH v H_2O
mobilna faza B: acetonitril

Pogoji analize:

- volumen injiciranja: 10 μL
- pretok: 0,250 mL/min
- temperatura kolone: 25 °C
- temperatura vzorca: 8 °C
- detektor: DAD-Diode Array
- masni detektor: Micromass, Quatro Micro APC
- čas trajanja analize: 30 minut

3.2.3 Določitev skupnih fenolnih spojin

Metoda s Folin-Ciocalteu reagentom spada med starejše metode, ki se uporablja za določitev skupnih fenolnih spojin. Metoda je preprosta, občutljiva in natančna, zato se zelo pogosto uporablja (Prior in sod., 2005). Sama metoda temelji na redukciji Folin-Ciocalteu reagenta (Huang in sod., 2005). Reagent med drugim vsebuje natrijev fosfomolibdat ter natrijev volframat, katerega reducirana oblika se obarva modro, ki maksimalno absorbira pri valovni dolžini 765 nm. Izmerjena absorbanca je premo sorazmerna koncentraciji fenolnih spojin (Botić in sod., 2009). Postopek določitve vsebnosti skupnih fenolnih spojin je potekal po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). Najprej smo k 0,2 mL supernatanta (razredčen z bidestilirano vodo v razmerju 1:40, v/v) dodali 0,125 mL Folin-Ciocalteu reagenta in premešali. Potem smo dodali 0,125 mL 20% raztopine natrijevega karbonata (Na_2CO_3). Po dodatku 20% raztopine Na_2CO_3 smo reakcijsko zmes dopolnili z bidestilirano vodo do končnega volumna 1 mL. Sledi filtracija skozi filtrni papir z velikostjo por 0,45 μm in centrifugiranje. Mešanico smo centrifugirali v Eppendorfovi centrifugi 10 minut pri 14 000 obr/min. Po 40 minutah smo supernatantu s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm (A_{765}) proti slepemu vzorcu, ki smo ga predhodno pripravili na isti način, le da smo namesto ekstrakta dodajali bidestilirano vodo. Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo izračunali iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili na osnovi galne kisline. Vsako meritev smo opravili v dveh oz. treh paralelkah.

Priprava reagentov

Priprava Folin-Ciocalteu reagenta: 1 mL Folin-Ciocalteu reagenta smo razredčili z 2 mL bidestilirane vode.

Priprava 20 % raztopine Na_2CO_3 : odtehtali smo 20 g Na_2CO_3 in prenesli v 100 mL bučko ter dopolnili z bidestilirano vodo do oznake.

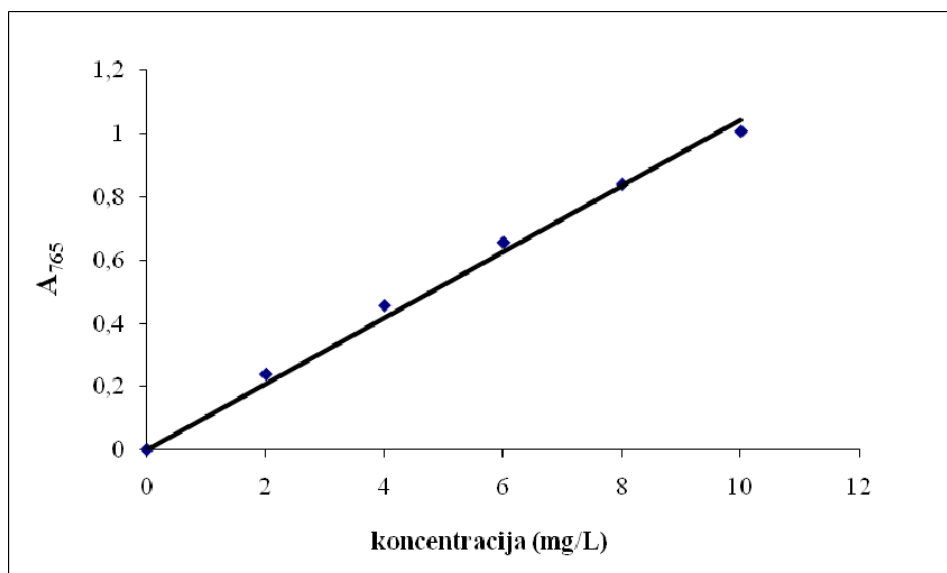
3.2.3.1 Priprava umeritvene krivulje

Za umeritveno krivuljo smo uporabili galno kislino. Najprej smo pripravili standardno raztopino galne kisline. Zatehtali smo 10 mg galne kisline v 100 mL bučko in jo raztopili v bidestilirani vodi. Masna koncentracija galne kisline v tako pripravljeni raztopini je bila 0,1 mg/mL. Nato smo ustrezne volumne te raztopine prenesli v epice, dodali 125 μL reagenta Folin-Ciocalteu, 125 μL 20 % raztopine Na_2CO_3 , dopolnili z bidestilirano vodo do 1 mL in po 40 minutah izmerili absorbanco pri 765 nm proti slepemu vzorcu. V preglednici 2 so predstavljeni vsi volumni (V) izhodne raztopine galne kisline, ki smo jih odpipetirali v reakcijsko zmes, vrednosti masne koncentracije galne kisline ($\gamma_{\text{g.k.}}$) v reakcijski zmesi in povprečne vrednosti izmerjene absorbance (A_{765}).

Preglednica 2: Volumen (V) galne kisline, vrednosti masne koncentracije galne kisline ($\gamma_{g,k}$) in povprečne vrednosti absorbanc (A_{765})

V(μ l)	$\gamma_{g,k}$ (μ g/mL)	A_{765} (1.par)	A_{765} (2.par)	$\bar{A}_{765} \pm \text{SD}$
20	2	0,2377	0,2379	$0,2378 \pm 0,0002$
40	4	0,4550	0,4552	$0,4551 \pm 0,0001$
60	6	0,6542	0,6545	$0,6543 \pm 0,0002$
80	8	0,8390	0,8382	$0,8386 \pm 0,0006$
100	10	1,0054	1,0059	$1,0057 \pm 0,0003$

Iz izmerjene absorbance in masne koncentracije galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo ter z linearno regresijo določili naklon premice, ki je prikazana na sliki 7. Vrednost koeficienta k je $(0,1045 \pm 0,00211) (\mu\text{g/mL})^{-1}$.



Slika 7: Umeritvena krivulja z galno kislino

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v reakcijski mešanici smo izračunali tako:

$$\gamma = \frac{A_{765}}{k} \quad \dots (3)$$

γ – masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici ($\mu\text{g/mL}$)

A_{765} – absorbanca pri valovni dolžini 765 nm

k – naklon premice

Maso fenolnih spojin v reakcijski mešanici smo izračunali:

$$m = \gamma \cdot V \quad \dots (4)$$

m – masa fenolnih spojin v reakcijski mešanici (μg)

V – volumen reakcijske mešanice (ml)

Določili smo še masno koncentracijo fenolnih spojin v supernatantu:

$$\gamma_{\text{FS}} = \frac{m}{V_{\text{pip}}} \cdot R \quad \dots (5)$$

V_{pip} – volumen pipetiranja supernatanta v reakcijsko mešanico (mL)

R – razredčitveni faktor (pri neprečiščenih vzorcih je 40 in pri prečiščenih 1)

Masno koncentracijo fenolnih spojin za vse analize antioksidativne učinkovitosti smo izračunali iz rezultatov Folin-Ciocalteu jeve analize z ustrezno razredčitvijo supernatanta.

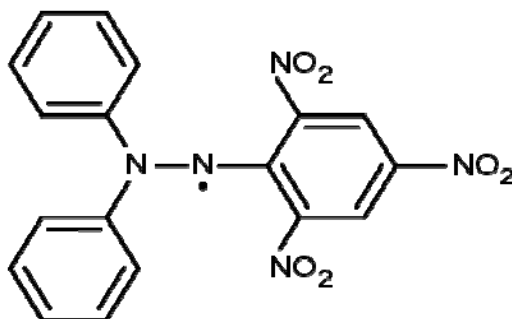
3.2.4 Ugotavljanje antioksidativnega delovanja supernatanta

3.2.4.1 Določitev sposobnosti lovljenja radikala DPPH•

Pri ugotavljanju sposobnosti antioksidantov za lovljenje radikalov se pogosto uporablja 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH•) radikal, ki je eden redkih stabilnih in komercialno dostopnih organskih dušikovih radikalov (Georgiev in sod., 2010). Strukturna formula DPPH• je prikazana na sliki 8. Metoda DPPH• je enostavna in hitra metoda, za njeno izvedbo potrebujemo le UV-VIS spektrofotometer, kar je očitno tudi poglavitni razlog, da se ta metoda pogosto uporablja pri določanju antioksidativne učinkovitosti (Prior in sod., 2005). Metoda temelji na reakciji prenosa vodikovega atoma z antioksidanta na DPPH• radikal. Radikal DPPH• v reakciji z antioksidantom preide v neobarvano spojino, kar opazimo kot spremembo barve iz vijolične v blede rumeno ter znižanje absorbance pri 517 nm, kjer je absorpcijski maksimum radikala. Boljša kot je antioksidativna učinkovitost, manjši delež radikala preostane v reakcijski zmesi in nižja je absorbanca. Svetloba, kisik in pH vrednost reakcijske mešanice močno vplivajo na absorpcijsko moč DPPH• radikala (Sharma in Bhat, 2009).

Postopek analize je potekal tako, da smo najprej odmerili 1,45 mL raztopine DPPH• in dodali 0,05 mL 96 % etanola. Nastalo raztopino smo premešali in jo uporabili za t.i. kontrolni vzorec. Izmerili smo ji absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. To je absorbanca kontrole. Odpipetirali smo 1,45 mL osnovne raztopine DPPH• ter ustrezen volumen supernatanta (od 0 ml do 0,05 mL) ter do končnega volumna (1,50 mL) dopolnili s 96 % etanolom. Mešanico smo premešali in centrifugirali v Eppendorfovi centrifugi 10 minut pri 14 000 obr/min. Po 30 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm proti slepemu vzorcu, ki je bil v tem primeru 96 % raztopina etanola.

Priprava reagenta DPPH•: 3,94 mg DPPH• smo raztopili v 100 mL 96 % etanola.



Slika 8: Strukturna formula DPPH• (Prior in sod., 2005)

3.2.4.2 Določitev sposobnosti redukcije

Redukcijska sposobnost določene spojine lahko deluje kot pomemben indikator njene potencialne antioksidativne učinkovitosti. Med analizo sposobnosti redukcije prisotnost reducentov (antioksidantov) v preiskovanih vzorcih vodi v redukcijo železovih(III) ionov (Fe^{3+}) do železovih(II) ionov (Fe^{2+}), kar zasledujemo spektrofotometrično (Juntachote in sod., 2006).

Postopek analize smo izvedli tako, da smo najprej odpipetirali 50 μL supernatanta v plastično epruveto in dodali 450 μL bidestilirane vode (volumen raztopine 0,5 mL). K tej raztopini smo dodali 2,5 mL fosfatnega pufra, (pH=6,8), 2,5 mL kalijevega heksacianoferata(III) in 2,5 mL 20% raztopine trikloroocetne kisline. Mešanico smo premešali in prenesli 2 mL v plastično epico ter centrifugirali 15 minut pri 13 000 obr/min. Po centrifugiranju smo odpipetirali 2,5 mL supernatanta, dodali 2,5 mL bidestilirane vode in 1 mL raztopine železovega(III) klorida ($c=0,002 \text{ mol/L}$). Vse skupaj smo premešali in po 25 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 740 nm proti slepemu vzorcu, ki smo ga pripravili po istem postopku, le da smo namesto supernatanta uporabili bidestilirano vodo.

Priprava reagentov

Priprava fosfatnega pufra: odtehtali smo 3,38 g kalijevega kalijevdihidrogenfosfata (V) (KH_2PO_4), 3,53 g dinatrijevega hidrogenfosfata (V) (Na_2HPO_4) in raztopili v 1 L bidestilirane vode.

Priprava raztopine kalijevega heksacianoferata(III) $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$: 1 g $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ smo zatehtali v 100 mL bučko in z bidestilirano vodo napolnili do oznake.

Priprava raztopine trikloroocetne kisline ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$): odtehtali smo 20 g $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$ v 100 mL bučko in dopolnili z bidestilirano vodo do oznake.

Priprava raztopine železovega(III) klorida (FeCl_3): 0,5 g FeCl_3 smo prenesli v 50 mL bučko in z bidestilirano vodo dopolnili do oznake.

3.2.4.3 Določitev sposobnosti vezave kovinskih ionov

Določitev sposobnosti tvorbe kompleksov fenolnih spojin s kovinskimi ioni temelji na dejstvu, da se v prisotnosti teh spojin poruši struktura kompleksa, ki ga tvori izbrani komercialni kelator (ferozin) in kovinski ion (Fe^{2+}) zaradi vezave ionov Fe^{2+} na fenolne spojine. Posledično se zmanjša intenziteta rdeče barve. Nižja absorbanca pomeni večjo sposobnost ekstraktov za tvorbo kompleksov s kovinskimi ioni (Decker in Welch, 1990). Sam postopek metode je potekal tako, da smo v plastično epruveto odpipetirali 1 mL ekstrakta, h kateremu smo dodali 3,7 mL vode, 0,1 mL raztopine železovega(II) klorida ($c=0,002 \text{ mol/L}$) in 0,2 mL raztopine ferozina ($c=0,005 \text{ mol/L}$). Reakcijsko mešanico ($V=5 \text{ mL}$) smo premešali in pustili 10 minut na sobni temperaturi ter nato merili absorbanco pri valovni dolžini 562 nm proti slepemu vzorcu, ki je vseboval 1 mL ekstrakta in 4 mL bidestilirane vode. Pri tej metodi je potrebno predhodno pripraviti tudi kontrolni vzorec, ki namesto ekstrakta vsebuje enako količino bidestilirane vode.

Priprava reagentov:

Priprava raztopine železovega(II) klorida (FeCl_2): odtehtali smo 19,88 mg FeCl_2 in prenesli v 50 mL bučko ter napolnili z bidestilirano vodo do oznake.

Priprava raztopine ferozina: 61,79 mg ferozina smo raztopili v 25 mL bidestilirane vode.

3.2.5 Statistična obdelava

Povprečna vrednost

Rezultate analiz smo podali kot povprečne vrednosti ($\bar{x}$) vseh meritev znotraj določene metode, v skladu z enačbo (6) (Košmelj, 2001).

$$\bar{x} = \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right) \quad \dots (6)$$

n – število vzorcev,

x_i – vrednosti i -te meritve.

Standardni odklon

Za oceno variabilnosti rezultatov smo uporabili standardni odklon (SD), ki smo ga izračunali po enačbi (7) (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \dots (7)$$

x_i – vrednosti i-te meritve,

n – število vzorcev,

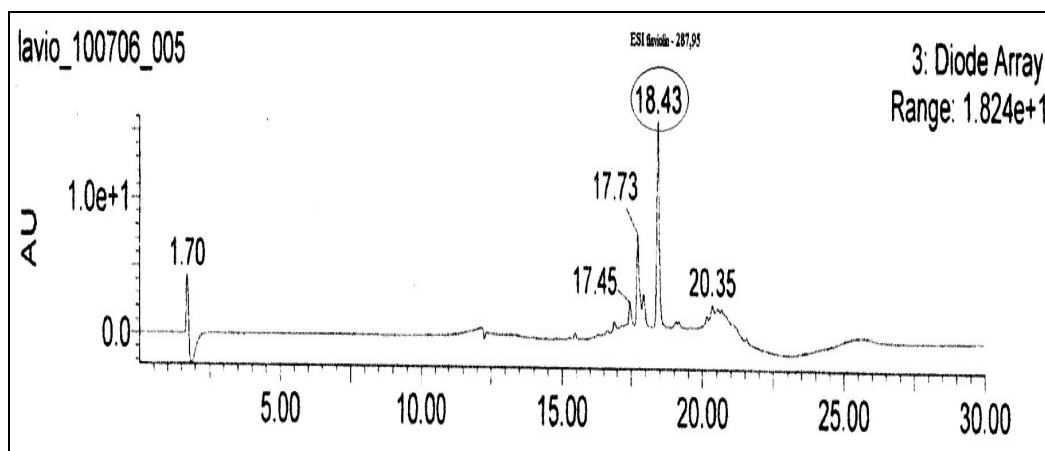
$\bar{x}$ – povprečna vrednost.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 HPLC ANALIZA

V celoti smo postopali tako, da smo najprej nacepili kulturo obeh streptomicet, in sicer v vseh treh oblikah (kontrola, ErmE in ErmE*) na ustrezna gojišča ter jih primerno dolgo kultivirali. Tako pripravljene brozge vseh šestih vzorcev smo centrifugirali in dobljene supernatante uporabili za nadaljnjo analizo. Supernatante smo še dodatno prečistili s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi (SPE). SPE je tehnika, pri kateri preiskovani vzorec filtriramo skozi trdno fazo, ki zadržuje raztopljene snovi. Te snovi nato eluiramo z ustreznim topilom. Pridobljene eluate smo uporabili za nadaljnje analize. Omenjeno tehniko izvajamo predvsem z namenom pridobivanja dovolj čistih vzorcev, ki jih v nadaljevanju analiziramo z ustreznimi kromatografskimi metodami.

Iz primerjave kromatogramov za supernatant kulture streptomicet, kjer ni bilo dodanega gena *rppA* za sintezo flaviolina (kontrola) in supernatant kulture, ki je vseboval gen *rppA* pod kontrolo dveh različnih promotorjev (ErmE in ErmE*) za sintezo flaviolina, se pokaže naslednje: pri mikroorganizmu *Streptomyces tsukubaensis* se v primeru dodanega močnega promotorja ErmE* glede na kontrolo, kjer pika ni, pokaže dodatni pik, ki naj bi ustrežal molski masi flaviolina (287,95 g/mol). V primeru dodanega promotorja ErmE ustreznega pika ne zaznamo. Pri mikroorganizmu *Streptomyces cinnamonensis* se dodatni pik, ki naj bi potrdil prisotnost flaviolina, ne pokaže v primeru nobenega dodanega promotorja. Na sliki 9 je prikazan kromatogram pridobljen z uporabo DAD. Na kromatogramu je signal za flaviolin posebej označen.



Slika 9: Kromatogram prečiščenega vzorca *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*

4.2 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

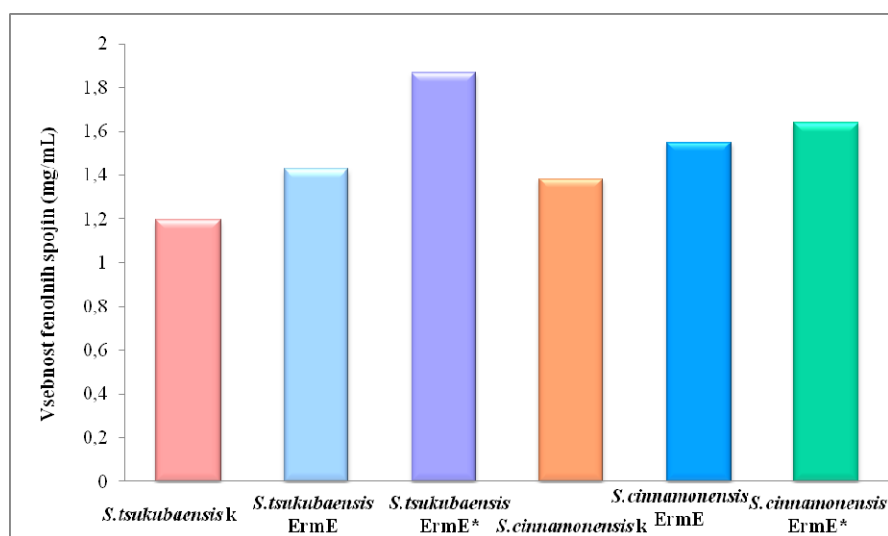
Skupne fenolne spojine smo določili spektrofotometrično z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta. Metoda temelji na prenosu elektronov iz fenolnih spojin na molibden v reagentu Folin-Ciocalteu, kar posledično povzroči nastanek modrega kompleksa, kateremu nato izmerimo absorbanco pri 765 nm (A_{765}). Sama metoda velja za preprosto in natančno. Absorbanca, ki jo izmerimo, je premo sorazmerna s koncentracijo fenolnih snovi v reakcijski mešanici (Botic, 2009; Medina, 2011). Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, za njeno pripravo pa smo uporabili raztopino galne kisline. Vsebnost fenolnih spojin smo izrazili kot ekvivalent galne kisline, to je v mg galne kisline na mL supernatanta.

Skupne fenolne spojine smo določili v supernatantih pred in po tem, ko smo jih izpostavili ekstrakciji na trdnem nosilcu, to je v neprečiščenih in prečiščenih vzorcih. V preglednici 3 so podane vrednosti A_{765} in vrednosti masnih koncentracij fenolnih spojin neprečiščenih supernatantov bakterij *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamomensis*.

Preglednica 3: Vrednosti absorbanc (A_{765}) in masnih koncentracij FS (γ) neprečiščenih vzorcev *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamomensis*

Vzorec	A_{765} (par.1)	A_{765} (par.2)	A_{765} (par.3)	$\bar{A}_{765} \pm SD$	$\gamma_{FS}(\text{mg/mL})$
<i>S.tsukubaensis</i> k	0,605	0,627	0,639	$0,62 \pm 0,01$	$1,19 \pm 0,02$
<i>S.tsukubaensis</i> ErmE	0,735	0,742	0,761	$0,75 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,02$
<i>S.tsukubaensis</i> ErmE*	0,966	0,969	0,994	$0,98 \pm 0,01$	$1,87 \pm 0,02$
<i>S.cinnamomensis</i> k	0,784	0,764	0,769	$0,77 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,02$
<i>S.cinnamomensis</i> ErmE	0,816	0,816	0,797	$0,81 \pm 0,01$	$1,55 \pm 0,02$
<i>S.cinnamomensis</i> ErmE*	0,849	0,852	0,874	$0,86 \pm 0,01$	$1,64 \pm 0,02$

Iz dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da pri obeh mikroorganizmih neprečiščeni supernatanti vsebujejo spojine, ki jih določimo s Folin-Ciocalteu metodo. Poleg tega ugotovimo, da smo tudi supernatantu kontrole določili spojine, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom. Pri bakteriji *Streptomyces tsukubaensis* je teh spojin v kontroli 1,19 mg/mL, medtem ko jih je v supernatantu ob dodatku promotorja ErmE* 1,87 mg/mL. Pri vrsti *cinnamonensis* ima kontrola 1,38 mg/mL omenjenih spojin, medtem ko jih oblika ErmE* vsebuje 1,64 mg/mL. Za boljšo predstavljenost smo dobljene rezultate prikazali na sliki 10. Dejstvo je, da pri obeh bakterijah kontrola vsebuje manj omenjenih spojin kot ErmE. Največ teh spojin vsebujeta supernatanta streptomicet ob dodatku močnejšega promotorja (ErmE*). Največ spojin vsebuje supernatant vrste *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*. Supernatant vrste *tsukubaensis* jih vsebuje za 0,23 mg/mL več kot supernatant vrste *cinnamonensis*.



Slika 10: Koncentracije fenolnih spojin v neprečiščenih vzorcih *S. tsukubaensis* in *S. cinnamonensis*

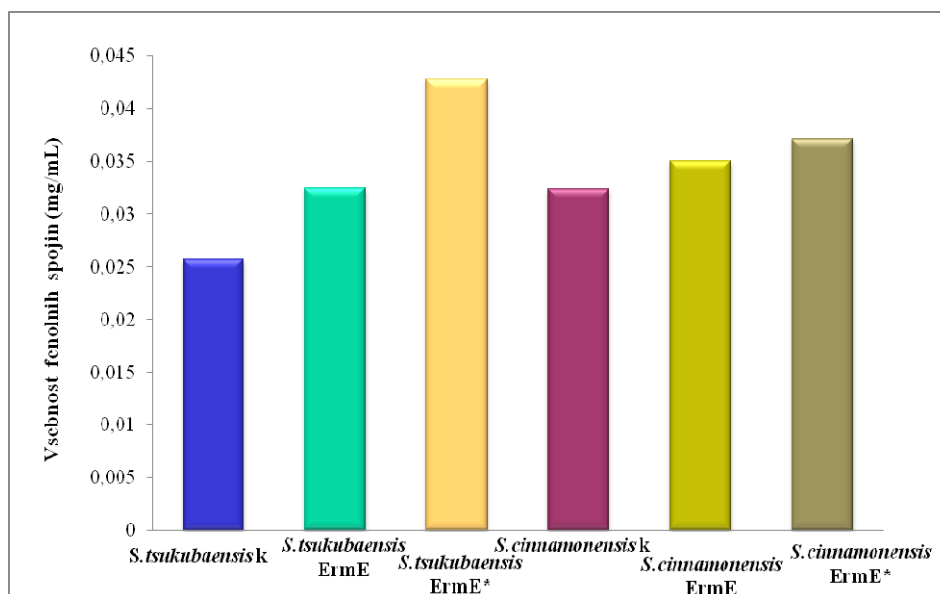
Folin-Ciocalteujeva metoda velja za preprosto, a nespecifično metodo, s katero določamo vsebnost skupnih fenolnih spojin. Pri interpretaciji rezultatov se je potrebno zavedati tega, da so v neprečiščenih vzorcih verjetno prisotne različne snovi, ki vplivajo na analizo in posledično tudi na dobljene rezultate. Vemo, da bakterije proizvajajo v ustreznem okolju številne snovi, kot so sladkorji, vitamini, antibiotiki, aminokisline (Hanson, 2003). Te snovi so verjetno reagirale s Folin-Ciocalteuevim reagentom in posledično vplivale tudi na končne rezultate. Predvidevali smo, da bodo razlike v količini izločenih fenolnih spojin ob dodatku šibkejšega (ErmE) in močnejšega (ErmE*) promotorja. Rezultati so potrdili našo domnevo, saj je oblika ErmE* pri obeh kulturah povzročila večje izločanje spojin, ki jih določimo s Folin-Ciocalteu metodo kot oblika ErmE. Do sedaj narejene raziskave so pokazale, da ErmE* velja za enega močnejših promotorjev, ki se uporablja pri izražanju številnih proteinov in drugih snovi v streptomicetah (Binnie in sod., 1997).

Kot rečeno smo supernatante prečistili s SPE tehniko in nato določili vsebnost skupnih fenolnih spojin. V preglednici 4 so podane vrednosti A_{765} in vrednosti masnih koncentracij fenolnih spojin prečiščenih supernatantov bakterij *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamonensis*.

Preglednica 4: Vrednosti absorbanc (A_{765}) in masnih koncentracij FS (γ) prečiščenih vzorcev *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamonensis*

Vzorec	A_{765} (par.1)	A_{765} (par.2)	A_{765} (par.3)	$\bar{A}_{765} \pm SD$	γ_{FS} (mg/mL)
<i>S.tsukubaensis</i> k	0,502	0,538	0,569	$0,54 \pm 0,02$	$0,0257 \pm 0,0009$
<i>S.tsukubaensis</i> ErmE	0,658	0,691	0,684	$0,68 \pm 0,02$	$0,0324 \pm 0,0009$
<i>S.tsukubaensis</i> ErmE*	0,888	0,888	0,887	$0,89 \pm 0,01$	$0,0427 \pm 0,0004$
<i>S.cinnamonensis</i> k	0,686	0,675	0,667	$0,68 \pm 0,01$	$0,0323 \pm 0,0004$
<i>S.cinnamonensis</i> ErmE	0,720	0,746	0,734	$0,73 \pm 0,01$	$0,0350 \pm 0,0004$
<i>S.cinnamonensis</i> ErmE*	0,778	0,784	0,768	$0,78 \pm 0,01$	$0,0371 \pm 0,0004$

Iz preglednice 4 lahko ugotovimo, da prečiščeni vzorci obeh streptomicet vsebujejo spojine, ki jih določimo s Folin-Ciocalteu metodo. Primerjava vseh šest vzorcev kaže, da je koncentracija spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, najmanjša v kontroli bakterije *Streptomyces tsukubaensis*, kjer znaša 0,0257 mg/mL, medtem ko jih je pri vrsti *cinnamonensis* več, in sicer 0,0323 mg/mL. Pri obeh mikroorganizmih je teh spojin več v ErmE kot v kontroli, a manj kot v ErmE* (0,0371 mg/mL pri *S. cinnamonensis* ErmE* in 0,0427 mg/mL pri *S. tsukubaensis* ErmE*). Slika 11 nam nazorno prikazuje, da so razlike v količini fenolnih spojin med kontrolo, ErmE in ErmE* znatno večje pri bakteriji *Streptomyces tsukubaensis*, kot so razlike v primeru bakterije *Streptomyces cinnamonensis*.



Slika 11: Koncentracije fenolnih spojin v prečiščenih vzorcih *S. tsukubaensis* in *S. cinnamomensis*

Dejstvo je, da oba mikroorganizma izločata spojine, ki jih določimo s Folin-Ciocalteu metodo. Te spojine mikroorganizma izločata v večji meri ob dodatku močnejšega promotorja. Primerjava rezultatov Folin-Ciocalteu metode v preglednicah 3 in 4 je pokazala, da prečiščeni vzorci vsebujejo znatno manj spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, od neprečiščenih vzorcev. Predvidevamo, da se tekom samega postopka čiščenja odstranijo različne snovi (monosaharidi, oligosaharidi, polisaharidi, aminokisline, proteini,...), ki reagirajo (reducirajoči sladkorji, aromatske aminokisline) s Folin-Ciocalteu reagentom. Ob upoštevanju, da smo s postopkom odstranili predvsem nefenolne spojine, med tem, ko fenolnih ne odstranimo, lahko sklepamo, da so v prečiščenih vzorcih prisotne predvsem slednje.

4.3 SPOSOBNOST LOVLJENJA RADIKALA DPPH•

Za ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin smo uporabili metodo z radikalom DPPH•. Metoda temelji na reakciji antioksidantov z radikalom DPPH•, ki je sintetični stabilni radikal. Več kot DPPH• radikala antioksidanti ulovijo, manjši delež ga preostane v reakcijski zmesi. Posledično se zniža tudi absorbanca, ki jo s spektrofotometrom izmerimo pri valovni dolžini 517 nm, kjer je absorpcijski maksimum samega radikala (Matthäus, 2002). Sposobnost spojin za lovljenje radikala DPPH• smo izrazili kot delež preostalega radikala DPPH• (tisti, ki ni reagiral z antioksidantom) v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije.

Delež preostalega radikala DPPH• (%), ki po 30 minutah inkubacije preostane v reakcijski zmesi smo izračunali po enačbi:

$$\% \text{ DPPH}\bullet = (A_{vz517}/A_{k517}) \times 100 \% \quad \dots (8)$$

A_{vz517} – absorbanca vzorca

A_{k517} – absorbanca kontrolnega vzorca (1,45 mL raztopine DPPH• in 0,05 mL 96 % etanola)

Preglednica 5 prikazuje vrednosti masnih koncentracij fenolnih spojin v reakcijski mešanici, vrednosti za absorbanco A_{vz517} , ki smo jo izmerili pri času, $t = 30$ min in deleže preostalega DPPH• po 30 min inkubacije. A_{k517} je pri meritvah za neprečiščene supernatante znašala 1,0906 in A_{k517} je pri meritvah za prečiščen supernatant *S. tsukubaensis* ErmE* znašala 1,0823. V preglednici 5 vidimo, da so pri obeh mikroorganizmih prisotne spojine, ki so lovilci prostega DPPH• radikala. Tudi supernatant vzorcev streptomicet brez dodanega promotorja za sintezo flaviolina vsebuje spojine, ki so sposobni inhibicije DPPH• radikala. Za primerjavo rezultatov smo analizirali še supernatant prečiščenega vzorca *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*, saj smo v njem zaznali prisotnost flaviolina.

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo podali kot koncentracijo fenolnih spojin, ki povzroči zmanjšanje začetne koncentracije DPPH• za 50% ($ED_{50\%}$).

$$ED_{50\%} = \frac{-50 \%}{k} \quad \dots (9)$$

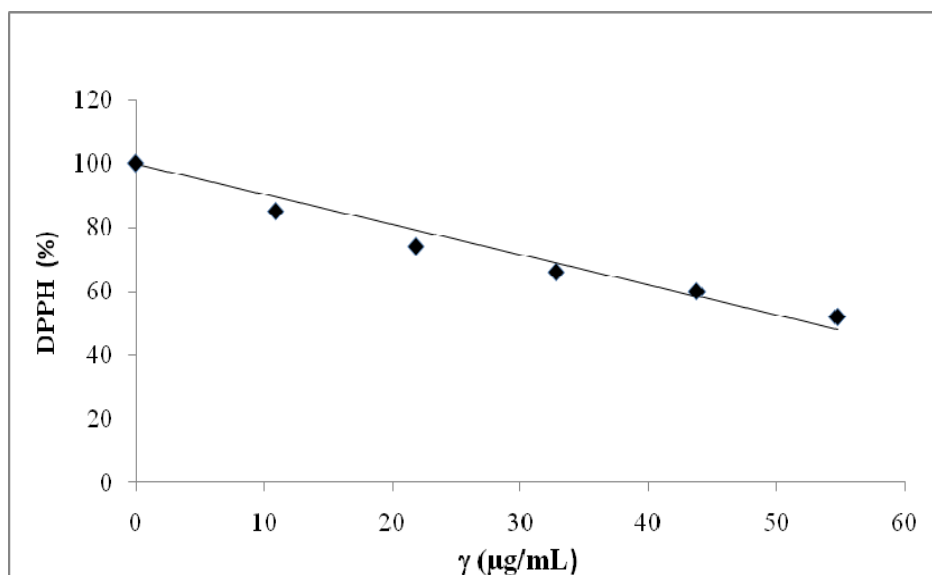
k – smerni koeficient oz. naklon premice

Kot primer je na sliki 12 za neprečiščen supernatant bakterije *Streptomyces cinnamonensis* ErmE* grafično prikazan delež DPPH•, ki je preostal v reakcijski mešanici po 30 minutah inkubacije, v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin. Iz slike lahko ugotovimo, da vrednost za delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije z večanjem koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi linearno pada. Za vse preiskovane vzorce smo s pomočjo metode linearne regresije določili naklone premic in njihove vrednosti podali v preglednici 5.

Preglednica 5: Vrednosti volumnov (V), absorbanc (A_{vz517}), masnih koncentracij FS (γ), deležev preostalega DPPH• po 30 min inkubacije, vrednosti k in masnih koncentracij FS, ki so potrebne za znižanje DPPH• za 50 % ($ED_{50\%}$)

Vzorec	V (μL)	A_{vz517} ($t=30\text{min}$)	γ ($\mu\text{g/mL}$)	% DPPH	k ($\mu\text{g/mL}$) ⁻¹	$ED_{50\%}$ ($\mu\text{g/mL}$)
<i>S.tsukubaensis</i> k	10	0,9764	7,95	89	$-1,1922 \pm 0,12$	$41,9 \pm 4$
	20	0,7301	23,87	67		
	30	0,7196	31,82	66		
	40	0,5731	39,78	53		
	50					
<i>S.tsukubaensis</i> ErmE	10	0,9402	9,51	86	$-1,1731 \pm 0,11$	$42,6 \pm 4$
	20	0,7516	19,04	69		
	30	0,6790	28,56	62		
	40	0,6411	38,08	58		
	50	0,5368	47,60	49		
<i>S.tsukubaensis</i> ErmE*	10	0,8539	12,45	78	$-1,3022 \pm 0,12$	$38,3 \pm 4$
	20	0,7107	24,90	65		
	30	0,6032	37,35	55		
	40	0,5402	49,81	49		
	50	0,4394	62,26	40		
<i>S.cinnamonensis</i> k	10	0,9505	9,21	87	$-0,9324 \pm 0,081$	$53,6 \pm 4$
	20	0,8548	18,42	78		
	30	0,7899	27,63	72		
	40	0,7419	36,84	68		
	50	0,6584	46,06	60		
<i>S.cinnamonensis</i> ErmE	10	0,9610	10,32	88	$-0,9046 \pm 0,074$	$55,2 \pm 4$
	20	0,8339	20,64	76		
	30	0,7657	30,96	70		
	40	0,7016	41,28	64		
	50	0,6194	51,61	57		
<i>S.cinnamonensis</i> ErmE*	10	0,9328	10,94	85	$-0,9514 \pm 0,072$	$52,5 \pm 4$
	20	0,8168	21,89	74		
	30	0,7226	32,84	66		
	40	0,6591	43,78	60		
	50	0,5706	54,73	52		
Prečiščen vzorec <i>S.tsukubaensis</i> ErmE*	20	1,0044	0,54	92	$-4,4122 \pm 0,71$	$11,3 \pm 2$
	50	0,9345	1,35	86		
	100	0,8857	2,71	81		
	200	0,8534	5,42	78		
	250	0,7998	6,78	74		

Iz preglednice 5 je razvidno, da se za neprečiščene vzorce *Streptomyces tsukubaensis* vrednosti k v okviru eksperimentalne napake med seboj ne razlikujejo. Prav tako se med seboj ne razlikujejo vrednosti k za neprečiščene vzorce *Streptomyces cinnamomensis*. Med neprečiščenimi vzorci ima *S. tsukubaensis* ErmE* sicer najnižji k ($-1,3022 \pm 0,12$) ($\mu\text{g/mL}$)⁻¹. Med vsemi preiskovanimi vzorci pa smo prečiščenemu vzorcu *S. tsukubaensis* ErmE* določili daleč najnižji k ($-4,4122 \pm 0,71$) ($\mu\text{g/mL}$)⁻¹, kar pomeni, da bi mu lahko pripisali tudi najboljšo učinkovitost lovljenja prostega radikala, saj v tem primeru z večanjem koncentracije preiskovanih spojin delež preostalega radikala DPPH• pada v največji meri.

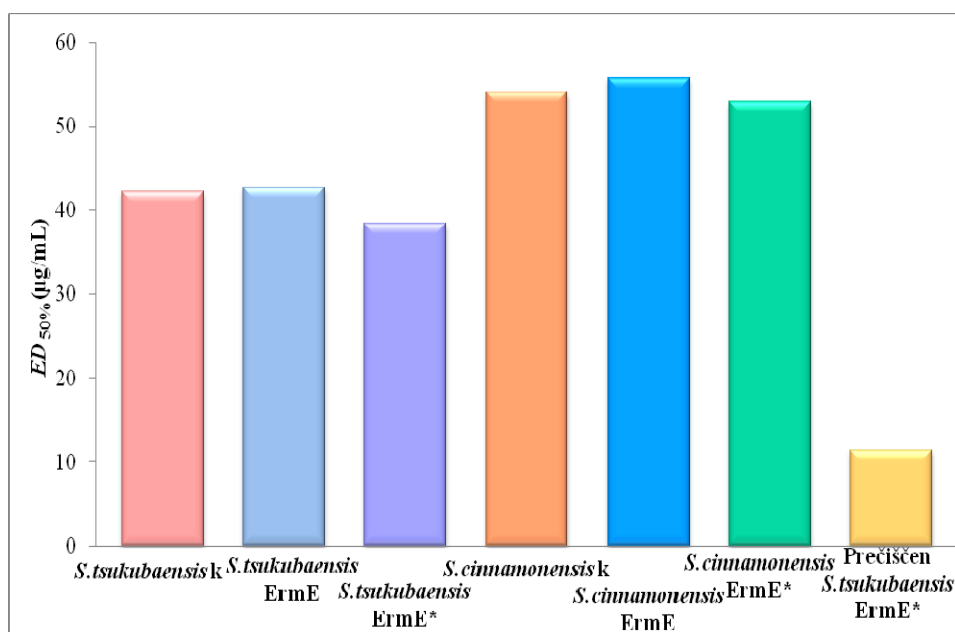


Slika 12: Delež preostalega DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin (γ) neprečiščenega supernatanta bakterije *Streptomyces cinnamomensis* ErmE*

Vrednosti za $ED_{50\%}$ so podane v preglednici 5. Višja vrednost $ED_{50\%}$ pomeni slabšo sposobnost lovljenja radikalov. Zaradi boljše ponazoritve smo na sliki 13 prikazali $ED_{50\%}$ za neprečiščene vzorce obeh streptomicet in prečiščen vzorec *S. tsukubaensis* ErmE*. Iz slike 13 je, ob upoštevanju napake za $ED_{50\%}$ (preglednica 5), razvidno, da se med neprečiščenimi vzorci vrednosti $ED_{50\%}$ med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Vzorec *S. tsukubaensis* ErmE* ima sicer najnižjo $ED_{50\%}$ ($38,3 \mu\text{g/mL}$), kar pomeni, da ima med preiskovanimi neprečiščenimi vzorci tudi najboljšo učinkovitost lovljenja prostega radikala, saj je v tem primeru za inhibicijo 50 % radikala potrebna najnižja koncentracija preiskovanih antioksidantov. Nekoliko slabšo sposobnost inhibicije DPPH• radikala je pokazal *S. tsukubaensis* ErmE, za katerega smo določili vrednost $ED_{50\%}$ ($42,6 \mu\text{g/mL}$). Podobno sposobnost je pokazala tudi kontrola *Streptomyces tsukubaensis*, katere $ED_{50\%}$ je $41,9 \mu\text{g/mL}$.

Na sliki 13 lahko vidimo, da vsebuje kontrola *Streptomyces cinnamonensis* spojine, ki slabše lovijo DPPH• radikal od *Streptomyces cinnamonensis* ErmE*, ki ima nižji $ED_{50\%}$ (52,5 µg/mL) in posledično tudi najboljšo sposobnost lovljenja radikalov od vseh oblik bakterije *Streptomyces cinnamonensis*. Ob primerjavi $ED_{50\%}$ vrednosti obeh mikroorganizmov vidimo, da so spojine pri mikroorganizmu *Streptomyces tsukubaensis* boljši lovilci prostega radikala kot pri *Streptomyces cinnamonensis*.

Primerjava neprečiščenih vzorcev s prečiščenimi je pokazala, da neprečiščeni vzorci obeh streptomicet potrebujejo v povprečju 47 µg/mL fenolnih spojin za zmanjšanje polovice začetne koncentracije DPPH•. Prečiščen vzorec jih potrebuje le 11 µg/mL. Sklepamo lahko, da so spojine v prečiščenem vzorcu boljši lovilci prostega radikala od neprečiščenih vzorcev in imajo torej boljšo antioksidativno učinkovitost.



Slika 13: Koncentracije fenolnih spojin neprečiščenih vzorcev kultur *S. tsukubaensis* in *S. cinnamonensis* ter prečiščenega vzorca *S. tsukubaensis* ErmE*, ki so potrebne za razgradnjo 50 % DPPH• radikala ($ED_{50\%}$)

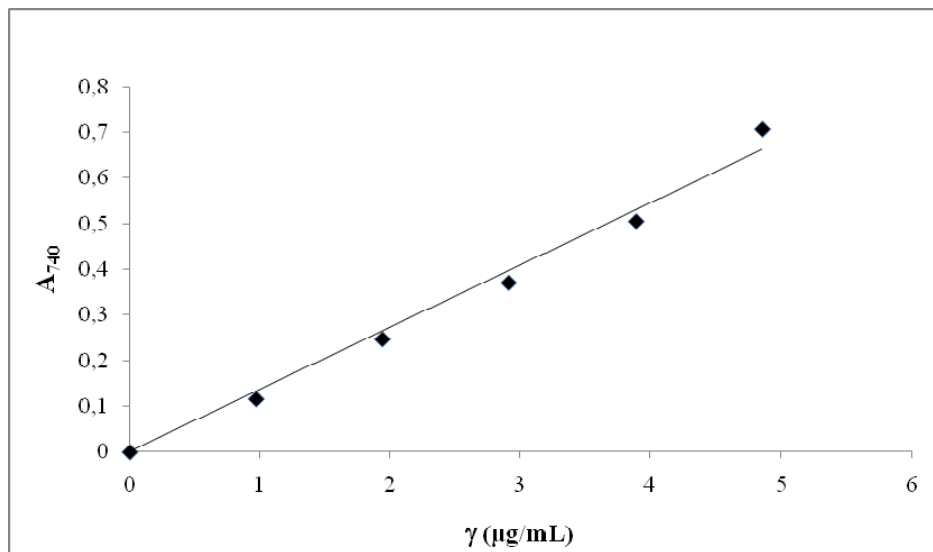
4.4 SPOSOBNOST REDUKCIJE

Redukcijsko sposobnost smo določili v supernatantu prečiščenega in neprečiščenega vzorca *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*. Omenjeni supernatant smo izbrali zato, ker smo v njem zaznali prisotnost flaviolina in se je med vsemi preiskovanimi izkazal za najučinkovitejšega pri lovljenju DPPH• radikala. Poleg tega, pa smo želeli dodatno preveriti, kako čiščenje supernatantov (ekstrakcija na trdni fazi) vpliva na redukcijsko sposobnost. Večja vsebnost reducentov (t.j. snovi z antioksidativnim učinkom) v reakcijski zmesi je razlog za večjo količino nastalih Fe^{2+} ionov v reakciji redukcije iz Fe^{3+} ionov, kar opazimo kot spremembo barve reakcijske mešanice iz rumene v modro-zeleno. Vsebnost nastalega iona Fe^{2+} smo določili spektrofotometrično z meritvijo absorbance pri valovni dolžini 740 nm (A_{740}). Dejstvo je, da večja vsebnost prisotnih reducentov bolj zviša vrednost A_{740} in intenzivnejše je modro-zeleno obarvanje. V preglednici 6 so tako prikazane vrednosti za absorbanco A_{740} v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski mešanici za prečiščene in neprečiščene supernatante kulture *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*.

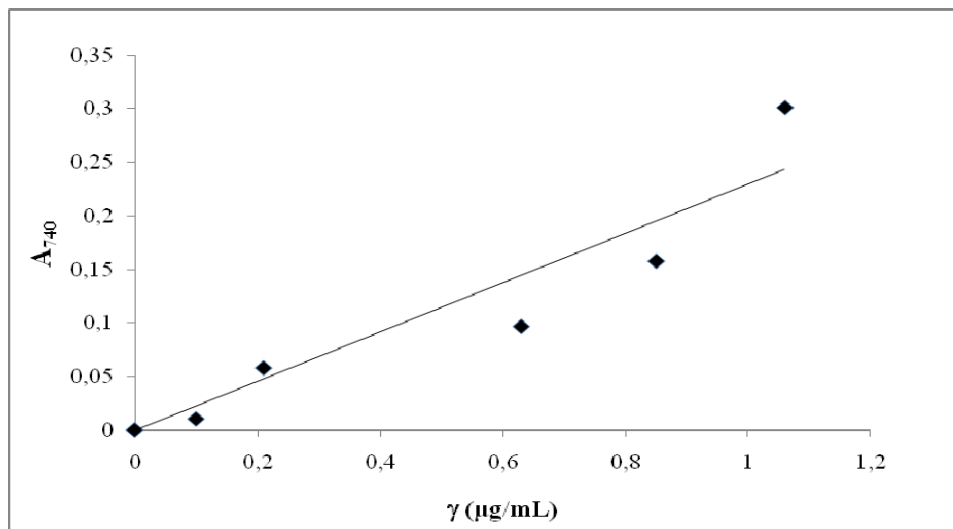
Preglednica 6: Vrednosti volumnov (V), absorbanc (A_{740}), masnih koncentracij FS (γ) in redukcijske moči (C_R) v neprečiščenem in prečiščenem vzorcu *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*

Vzorec	V (μL)	γ ($\mu\text{g/mL}$)	A_{740}			$A_{740} \pm \text{SD}$	$C_R \pm \text{SD}$ ($\mu\text{g/mL}$) ⁻¹
			A_1	A_2	A_3		
<i>S. tsukubaensis</i> ErmE* (neprečiščen)	10	0,97	0,114	0,116	0,118	0,116 $\pm$ 0,001	0,136 $\pm$ 0,004
	20	1,94	0,246	0,247	0,247	0,247 $\pm$ 0,001	
	30	2,91	0,368	0,373	0,371	0,371 $\pm$ 0,003	
	40	3,89	0,501	0,506	0,509	0,505 $\pm$ 0,004	
	50	4,86	0,704	0,706	0,710	0,707 $\pm$ 0,003	
<i>S. tsukubaensis</i> ErmE* (prečiščen)	50	0,11	0,009	0,010	0,012	0,010 $\pm$ 0,001	0,229 $\pm$ 0,03
	100	0,21	0,058	0,058	0,058	0,058 $\pm$ 0,000	
	300	0,63	0,093	0,103	0,094	0,097 $\pm$ 0,005	
	400	0,85	0,156	0,158	0,159	0,158 $\pm$ 0,002	
	500	1,06	0,300	0,301	0,301	0,301 $\pm$ 0,001	

Redukcijsko sposobnost neprečiščenega in prečiščenega vzorca bakterije *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* smo kvantitativno ovrednotili kot naklona premic, ki opišeta odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin in sta predstavljeni na slikah 14 in 15. Redukcijska moč (C_R) je določena kot naklon premice. Večji naklon premice pomeni tudi večjo redukcijsko moč (C_R). Naklona premic smo določili s pomočjo linearne regresijske analize. Iz slik 14 in 15 je razvidno, da A_{740} narašča s koncentracijo fenolnih spojin. Vrednosti za redukcijsko moč za vzorec *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* pred in po čiščenju supernatantov so podane v preglednici 6.

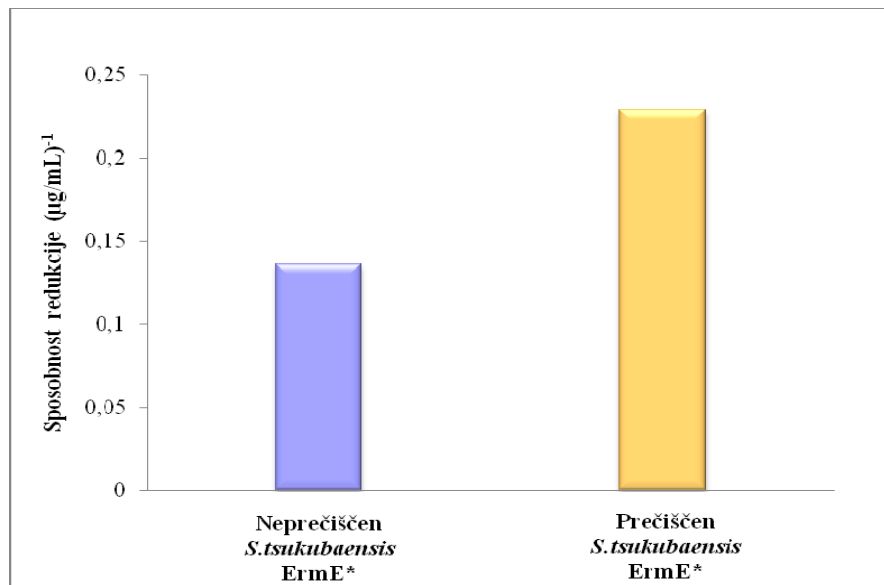


Slika 14: Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin neprečiščenega supernatanta *S. tsukubaensis* ErmE*



Slika 15: Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin prečiščenega supernatanta *S. tsukubaensis* ErmE*

Iz rezultatov, ki so zbrani v preglednici 6, opazimo, da imata oba vzorca sposobnost reducirati Fe^{3+} v Fe^{2+} . V primerjavi z neprečiščenim vzorcem, ki ima redukcijsko sposobnost $0,136 (\mu\text{g/mL})^{-1}$, je sposobnost redukcije prečiščenega vzorca večja in znaša $0,229 (\mu\text{g/mL})^{-1}$. To se vidi tudi na sliki 16, kjer sta zaradi boljše razvidnosti grafično prikazani redukcijski sposobnosti obeh vzorcev. Iz tega lahko sklepamo, da smo s fazo čiščenja uspeli v vzorcu zadržati spojine, ki so sposobne reducirati Fe^{3+} v Fe^{2+} in imajo posledično tudi boljšo antioksidativno učinkovitost.



Slika 16: Sposobnost redukcije neprečiščenega in prečiščenega supernatanta *S. tsukubaensis* ErmE*

4.5 SPOSOBNOST VEZAVE KOVINSKIH IONOV

V nadaljevanju smo želeli preveriti, ali se v supernatantu streptomicete *Streptomyces tsukubaensis* ob dodatku močnejšega promotorja ErmE*, ki se je pri do sedaj obravnavanih metodah izkazal za najučinkovitejšega in v katerem smo zaznali prisotnost flaviolina, nahajajo spojine, ki so sposobne vezave kovinskih ionov. Sposobnost tvorbe kompleksov izrazimo kot koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov (C_{CA}) in izračunamo po naslednji formuli:

$$C_{CA} = \left(1 - \frac{A_{vz562}}{A_{k562}} \right) \times 100 \% \quad \dots (10)$$

C_{CA} – koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov (%)

A_{vz562} – absorbanca vzorca

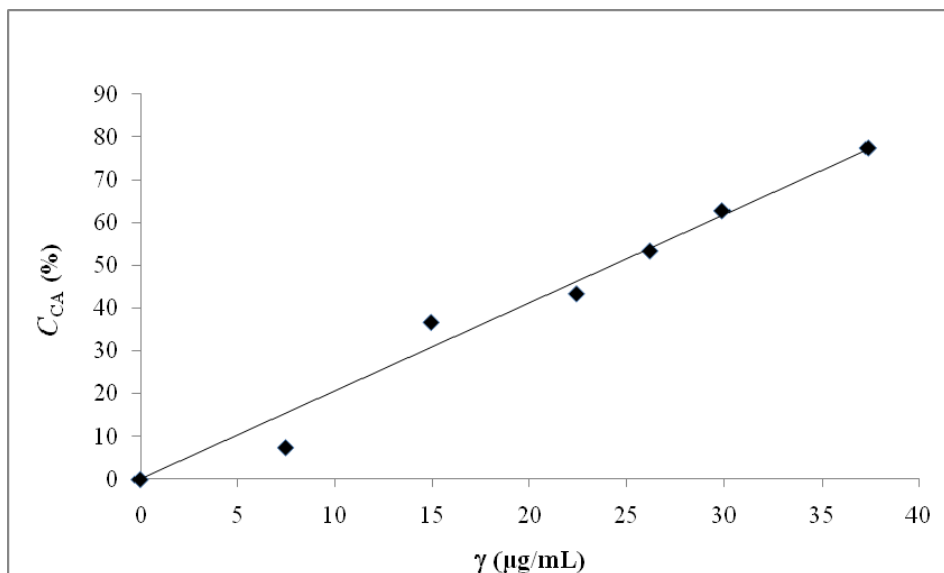
A_{k562} – absorbanca kontrolnega vzorca (za neprečiščen vzorec znaša 0,9936 in za prečiščen vzorec 1,0637)

V preglednici 7 so podane vrednosti za absorbanco A_{vz562} , vrednosti masnih koncentracij fenolnih spojin v reakcijski mešanici in vrednosti C_{CA} neprečiščenega in prečiščenega supernatanta *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*. Opazimo lahko, da večja vsebnost fenolnih spojin povzroči znižanje absorbance. To pomeni, da se je v reakcijski zmesi bolj ali manj porušila struktura kompleksa ferozin – ioni Fe^{2+} in tvoril se je novi kompleks fenolne spojine – ioni Fe^{2+} . Sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni smo za prečiščen vzorec *S. tsukubaensis* ErmE* določali v znatno višjem koncentracijskem območju kot smo določali sposobnost za neprečiščen vzorec *S. tsukubaensis* ErmE*. Pri koncentracijah, ki smo jih uporabili za neprečiščen vzorec, je namreč prišlo v primeru prečiščenega do prevelikega znižanja absorbance in obratno, fenolne spojine pri koncentraciji, ki smo jih uporabili za prečiščen vzorec, v primeru neprečiščenega niso povzročile opazne spremembe v absorbanci.

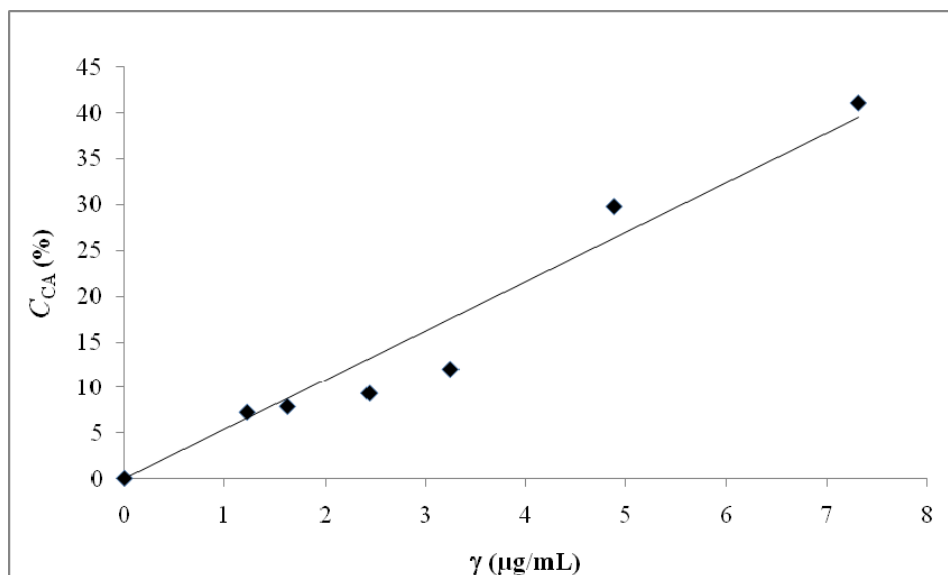
Preglednica 7: Vrednosti volumnov (V), absorbanc (A_{vz562}), masnih koncentracij FS (γ) in koeficientov sposobnosti tvorbe kompleksov (C_{CA}) neprečiščenega in prečiščenega vzorca *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*

Vzorec	V (μL)	γ ($\mu\text{g/mL}$)	A_{vz562}			$\bar{A}_{562} \pm \text{SD}$	C_{CA} (%)
			A_1	A_2	A_3		
<i>S. tsukubaensis</i> ErmE* (neprečiščen)	20	7,47	0,9200	0,9198	0,9188	$0,9195 \pm 0,0061$	$7,45 \pm 0,05$
	40	14,94	0,6287	0,6285	0,6289	$0,6287 \pm 0,0002$	$36,72 \pm 0,01$
	60	22,41	0,5630	0,5626	0,5621	$0,5625 \pm 0,0004$	$43,38 \pm 0,03$
	70	26,15	0,4635	0,4628	0,4626	$0,4630 \pm 0,0004$	$53,40 \pm 0,05$
	80	29,88	0,3703	0,3693	0,3693	$0,3697 \pm 0,0005$	$62,79 \pm 0,08$
	100	37,35	0,2244	0,2241	0,2236	$0,2240 \pm 0,0004$	$77,45 \pm 0,14$
<i>S. tsukubaensis</i> ErmE* (prečiščen)	150	1,22	0,9854	0,9867	0,9887	$0,9869 \pm 0,0016$	$7,22 \pm 0,01$
	200	1,62	0,9794	0,9806	0,9800	$0,9800 \pm 0,0006$	$7,86 \pm 0,01$
	300	2,44	0,9643	0,9648	0,9648	$0,9646 \pm 0,0002$	$9,31 \pm 0,002$
	400	3,25	0,9354	0,9360	0,9363	$0,9359 \pm 0,0004$	$12,01 \pm 0,01$
	600	4,88	0,7476	0,7455	0,7466	$0,7466 \pm 0,0010$	$29,81 \pm 0,04$
	900	7,32	0,6244	0,6261	0,6283	$0,6263 \pm 0,0019$	$41,12 \pm 0,12$

Na slikah 17 in 18 je grafično predstavljena odvisnost C_{CA} od masne koncentracije fenolnih spojin neprečiščenega in prečiščenega supernatanta *S. tsukubaensis* ErmE*. Vrednosti C_{CA} se večajo z naraščajočo koncentracijo. Ocenimo lahko, da sposobnost tvorbe kompleksov s kovinskimi ioni linearno narašča s povečanjem koncentracije fenolnih spojin. S pomočjo metode linearne regresije smo določili naklon premic (k). Vrednost naklona premice znaša za neprečiščen vzorec *S. tsukubaensis* ErmE* ($2,06 \pm 0,02$) ($\mu\text{g/mL}$)⁻¹ in za prečiščen vzorec *S. tsukubaensis* ErmE* ($5,40 \pm 0,04$) ($\mu\text{g/mL}$)⁻¹.

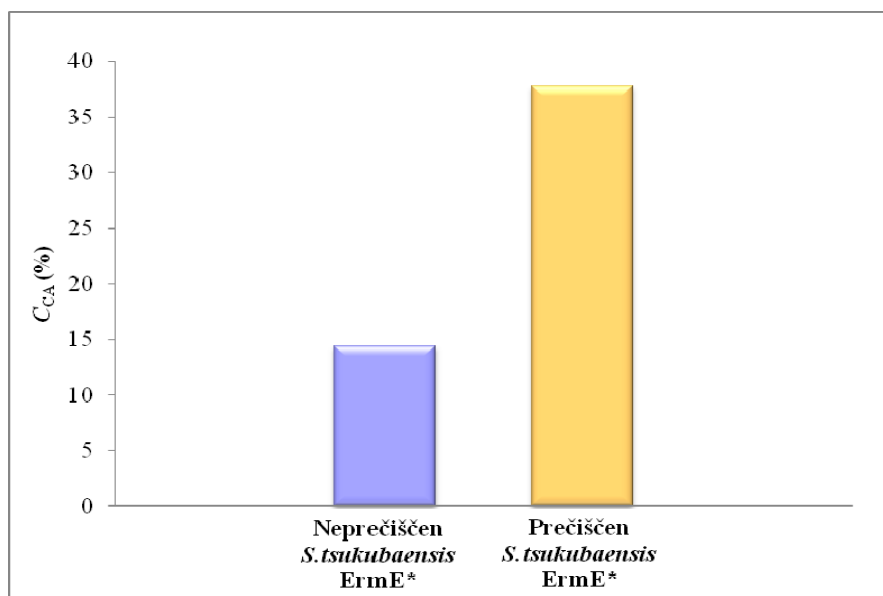


Slika 17: Odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti (C_{CA}) od masne koncentracije fenolnih spojin (γ) neprečiščenega supernatanta *S. tsukubaensis* ErmE*



Slika 18: Odvisnost koeficienta antioksidativne učinkovitosti (C_{CA}) od masne koncentracije fenolnih spojin (γ) prečiščenega supernatanta *S. tsukubaensis* ErmE*

Zaradi nazornejše primerjave smo iz smernih koeficientov izračunali vrednosti C_{CA} pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 7 $\mu\text{g/mL}$ in na sliki 19 grafično predstavili. Vidimo lahko, da so fenolne spojine prečiščenega supernatanta pri koncentraciji v reakcijski zmesi 7 $\mu\text{g/mL}$ dosegle znatno večje vrednosti C_{CA} od spojin neprečiščenega supernatanta. Vrednost C_{CA} pri prečiščenem vzorcu znaša 37 %, medtem ko je pri neprečiščenem 14 %. To potrjuje tudi opažanja na slikah 17 in 18, kjer je razvidno, da smo pri prečiščenem vzorcu pri znatno manjši koncentraciji kot pri neprečiščenem dosegli boljšo sposobnost tvorbe kompleksov.



Slika 19: Koeficient sposobnosti tvorbe kompleksov (C_{CA}) za neprečiščen in prečiščen vzorec *S. tsukubaensis* ErmE* pri masni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski mešanici 7 $\mu\text{g/mL}$

5 SKLEPI

Glede na dobljene rezultate v okviru diplomskega dela lahko zaključimo:

- Seva bakterij *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamomensis*, v katera je vnešen gen *rppA* pod kontrolo promotorjev ErmE in močnega promotorja ErmE*, izločata fenolne spojine.
- Z izražanjem gena *rppA* pod močnim promotorjem ErmE* pri obeh sevih, *S. tsukubaensis* in *S. cinnamomensis*, dosežemo večjo produkcijo fenolnih spojin, kot pri sevih, ki vsebujejo gen pod šibkejšim promotorjem ErmE. Kot je bilo tudi pričakovano, tudi kontrola sevov, ki ne vsebujeta gena *rppA*, so identificirali fenolne spojine, vendar v nižji vsebnosti.
- S postopkom ekstrakcije na trdni fazi delno odstranimo spojine, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, kar je posledično vplivalo na znižanje rezultatov. Predvidevamo, da odstranimo reducirajoče snovi, kot so sladkorji, aminokisline in peptidi.
- Supernatanti obeh sevov streptomicet, ki sta vsebovala gen *rppA*, so pokazali antioksidativni učinek fenolnih spojin.
- Na antioksidativni učinek fenolnih spojin vpliva izbira promotorja. Pri obeh vrstah streptomicet so imele fenolne spojine pri sevu, ki je imel gen *rppA* izražen pod močnim promotorjem ErmE*, boljšo antioksidativno učinkovitost od *rppA* gena pod ErmE promotorjem.
- Antioksidativni učinek je tudi odvisen od seva streptomicet. V supernatantu mikroorganizma *Streptomyces tsukubaensis* so spojine boljši lovilci DPPH• radikala kot pri *Streptomyces cinnamomensis*.
- Prečiščen vzorec *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* ima znatno boljšo sposobnost lovljenja prostega DPPH• radikala od neprečiščenega vzorca *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*.
- Prečiščeni vzorec *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* reducira več Fe^{3+} ionov od neprečiščenega vzorca *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*.
- Prečiščeni vzorec *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* ima boljšo sposobnost vezave kovinskih ionov od neprečiščenega vzorca *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*.
- HPLC analiza je od vseh šestih vzorcev pokazala na prisotnost flaviolina le v supernatantu bakterije *Streptomyces tsukubaensis* z *rppA* genom izraženim pod močnejšim promotorjem ErmE*.

Rezultati raziskovalnega dela so potrdili vse naše delovne hipoteze.

6 POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo ugotavljali razlike v produkciji fenolnih spojin pri dveh rekombinantnih sevih *Streptomyces tsukubaensis* in *Streptomyces cinnamomensis*, v katere smo vnesli gen *rppA*, izoliran iz aktinomicete *Saccharopolyspora erythraea*. Gen *rppA* kodira encim kalkon sintazo, zato oba seva proizvajata rdeče-rjavo obarvane flavioline. Oba seva sta bila transformirana z integrativnim plazmidom, ki je vseboval gen *rppA* pod kontrolo promotorjev ErmE in močnega promotorja ErmE*. Kot kontrolo pa smo uporabili ekstrakte obeh sevov, ki niso vsebovali *rppA* gena. Oba seva streptomicet smo v vseh treh oblikah kultivirali na ustreznih gojiščih. Pridobljene brozge smo centrifugirali in nato dobljene supernatante uporabili za nadaljnjo analizo. Zaradi potreb kromatografske analize smo supernatante prečistili tako, da smo izvedli ekstrakcijo na trdnem nosilcu.

Rezultati HPLC analize so pokazali, da se pri bakteriji *Streptomyces tsukubaensis*, ki ima vnešen gen *rppA*, ki je izražen pod kontrolo promotorja ErmE* v primerjavi s kontrolo, kjer pika ni, pojavi dodatni pik, ki naj bi ustrezal molski masi flaviolina. V primeru dodanega šibkejšega promotorja (ErmE) ustreznega pika ne zaznamo. Pri bakteriji *Streptomyces cinnamomensis* se dodatni pik, ki naj bi potrdil prisotnost flaviolina, ne pokaže v primeru nobenega dodanega promotorja.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili s Folin-Ciocalteu metodo in izrazili kot ekvivalent galne kisline. Analiza je pokazala, da vsebuje kontrola manj spojin, ki jih določimo s Folin-Ciocalteu metodo, kot pa supernatanti streptomicet, kjer je bil prisoten promotor. Prisotnost močnejšega promotorja ErmE* je pri obeh kulturah povzročila večje izločanje spojin, ki jih določimo s Folin-Ciocalteu metodo, kot dodatek šibkejšega promotorja. V neprečiščenih vzorcih vsebuje najmanj spojin, ki jih določimo s Folin-Ciocalteu metodo, supernatant *Streptomyces tsukubaensis* kontrola (1,193 mg/mL), medtem ko jih je imel največ *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* (1,868 mg/mL). Primerjava rezultatov je pokazala, da vsebujejo neprečiščeni supernatanti obeh bakterij več spojin, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom, od prečiščenih vzorcev. Tako je med slednjimi supernatant mikroorganizma *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* vseboval 0,0427 mg/mL omenjenih spojin. Z metodo čiščenja smo iz supernatantov najverjetneje odstranili predvsem različne nefenolne snovi, ki sicer reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom in dobili nižje vrednosti rezultatov.

Pri ugotavljanju antioksidativne učinkovitosti smo izvedli metodo določitve sposobnosti lovljenja DPPH• radikala. Pri tem so se spojine v supernatantih *Streptomyces cinnamomensis* izkazale kot manj učinkovite od spojin v supernatantih *Streptomyces tsukubaensis*. Med slednjimi se je kot najbolj učinkovit izkazal supernatant *Streptomyces tsukubaensis* ob prisotnosti močnejšega promotorja ErmE*. Prečiščen supernatant *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* je, za razliko od neprečiščenih vzorcev, ki so pokazali dosti slabšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala, potreboval le 11,4 µg/mL fenolnih spojin za polovično zmanjšanje začetne koncentracije DPPH• radikala.

Redukcijsko sposobnost in sposobnost vezave kovinskih ionov smo določili v supernatantu prečiščenega in neprečiščenega vzorca *Streptomyces tsukubaensis* ErmE*. Slednjega smo izbrali zato, ker smo v njem zaznali prisotnost flaviolina in se je med vsemi preiskovanimi izkazal za najučinkovitejšega pri lovljenju DPPH• radikala. Poleg tega, pa smo želeli dodatno preveriti vpliv čiščenja supernatantov (ekstrakcija na trdnem nosilcu).

Ugotovili smo, da so spojine v supernatantu *Streptomyces tsukubaensis* ErmE* sposobne redukcije in vezave kovinskih ionov. Raziskava je pokazala, da prečiščen vzorec *S. tsukubaensis* ErmE* vsebuje več spojin, ki reducirajo Fe^{3+} ione v Fe^{2+} ione kot neprečiščen vzorec *S. tsukubaensis* ErmE* in da so spojine v prečiščenem supernatantu boljši kelatorji kovinskih ionov.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-589
- Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave-funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu-uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99: 191-203
- Bibb M.J., Janssen G.R., Ward J.M. 1985. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (ermE) of *Streptomyces erythraeus*. Gene, 38: 215-226
- Bibb M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces*. Current Opinion in Microbiology, 8: 208-215
- Binnie C., Cossar J.D., Stewart D.I.H. 1997. Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. Trends in Biotechnology, 15: 315-320
- Blažič M., Lešnik U., Goranovič D., Petković H. 2009. Biosintezni inženiring: novejši postopki pri razvoju protimikrobnih učinkovin. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana, 29. in 30. januar 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49 - 49
- Botić T., Škerget M., Knez Ž. 2009. Izolacija protimikrobnih snovi iz rastlinskega tkiva. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana, 29. in 30. januar 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 161- 161
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 432 - 432
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56: 317-333
- Caballero B. 2003. Flavonoids. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 10. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 2953-2954

- Cortes J., Velasco J., Foster G., Blackaby A.P., Rudd B.A.M., Wilkinson B. 2002. Identification and cloning of a type III polyketide synthase required for diffusible pigment biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular Microbiology*, 44, 5: 1213-1224
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343-356
- Decker E.A., Welch B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 674-677
- Funa N., Ohnishi Y., Fujii I., Shibuya M., Ebizuka Y., Horinouchi S. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*, 400: 897-899
- Gasparič A. 2009. Antibiotiki v farmaciji in medicini. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana, 29. in 30. januar 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 15-23
- Georgiev M., Alipieva K., Pashova S., Denev P., Angelova M., Kerns G., Bley T. 2010. Antioxidant activity of devil's claw cell biomass and its active constituents. *Food Chemistry*, 121: 967-972
- Glazer A.N., Nikaido H. 2007. *Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology*. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press: 324-330
- Gordon M.H. 2003. Antioxidants. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 261-289
- Gorinstein S., Martin-Belloso O., Katrich E., Lojek A., Čiz M., Gligelmo-Miguel N., Harvenkit R., Park Y.S., Jung S.T., Trakhtenberg S. 2003. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 154-159
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58: 966-968
- Halliwell B. 1996. Radikali v bolezni in zdravju. *Kemija v šoli*, 8, 4: 10-13
- Hanson J.R. 2003. Natural products: the secondary metabolites. Cambridge, Royal Society of Chemistry: 147 -147
- Holt G.J., Krieg R.N., Sneath H.A.P., Staley T.J., Williams S.T. 1994. *The Actinomycetes*. V: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Holt G.J., Krieg R.N., Sneath H.A.P., Staley T.J., Williams S.T. (eds.). Maryland, Williams & Wilkins: 22-29

- Hopwood D.A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 97, 7: 2465-2497
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856
- Javornik B. 2008. Funkcionalna hrana: Rastlinska biotehnologija in genomika. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu. Uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi. 2008. Ljubljana, 17. in 18. april 2008. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 178 - 178
- Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandl S., Bauer F. 2006. The antioxidative properties of holy basil and galangal in cooked ground pork. *Meat Science*, 72: 446-456
- Kač M. 2000. Oksidacija. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-9
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, John Innes Foundation: 610 - 610
- Kim H.S., Park Y.I. 2008. Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 4: 418-421
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 249 - 250
- Kuščer E., Raspor P., Abram V., Petković H. 2009. Regulacija biosinteze rapamicina. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana, 29. in 30. januar 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 61-77
- Li C., Hazzard C., Florova G., Reynolds K.A. 2009. High titer production of tetracenomycins by heterologous expression of the pathway in a *Streptomyces cinnamomensis* industrial monensin producer strain. *Metabolic Engineering*, 11: 319-327
- Likar M. 1987. Mikrobiologija. Ljubljana, Cankarjeva založba: 329 - 329
- Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., Cod'sson J.D., Rinaldi M., Arlorio M. 2009. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, 144: 889-897
- Madhavi G., Sitachitta N., Davidson B.S. 1996. New L-pyrone-containing metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron*, 52, 24: 8073-8080

- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2004. Brock biology of microorganisms. 11th ed. New Jersey, Upper Saddle River: 325-335
- Magdevska V., Gaber R., Goranovič D., Kuščer E., Boakes S., Duran A.M.B., Santamaria R.I., Raspor P., Leadlay P.F., Fujs Š., Petković H. 2010. Robust reporter system based on chalcone synthase rppA gene from *Saccharopolyspora erythraea*. Journal of Microbiological Methods, 83: 111-119
- Marinelli F. 2009. Antibiotics and *Streptomyces*: the future of antibiotic discovery. Microbiology Today: 20-23
- Matthäus B., Abdalbasit M.A., Ismail H.A. 2002. Antioxidant properties of methanolic extracts from different parts of *Sclerocarya birrea*. International Journal of Food Science and Technology, 43, 5: 921-926
- McGovern E.P., Bentley R. 1975. Biosynthesis of flaviolin and 5,8-dihydroxy-2,7-dimethoxy-1,4-naphthoquinone. Biochemistry, 14: 3138-3143
- Medina M.B. 2011. Determination of the total phenolics in juices and super fruits by a novel chemical method. Journal of Functional Foods, 3, 2: 79-87
- Merillon J.M., Ramawat K.G. 2007. Biotechnology secondary metabolites: plants and microbes. 2nd ed. New Hampshire, Science Publishers Inc: 22-22, 54-54
- Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 8. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 4507-4514
- Petković H., Cullum J., Daslav H. 2006. Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70, 3: 704-728
- Petković H., Zhou L., Raspor P., Waterman P.G., Hranueli D., Hunter I.S. 1998. Inaktivacija otcD-ORF1 gena, vpletenega v zgodnje faze biosinteze oksitetraciklina iz *Streptomyces rimosus*. V: Zbornik s programom. 2. Kongres slovenskih mikrobiologov z mednarodno udeležbo. Portorož, 27-30 september 1998. Zbornik s programom. Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 73-76
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 4290-4302
- Pühler A. 1993. Biotechnology, genetic fundamentals and genetic engineering. Vol. 2. 2nd ed. New York, VCH Publishers Inc: 465-478
- Raspor P. 1996. Bakterije in arheje. V: Biotehnologija: osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA d.o.o.: 21- 23

- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 7: 933-956
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 24 - 24, 46 - 46
- Sharma O.P., Bhat T.K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113: 1202-1205
- Skoog D.A., West D.M., Holler F.J. 2006. Fundamentals of analytical chemistry. 7th ed. Philadelphia, Saunders College publishing: 701-707
- Swanson B.G. 2003. Tannins and polyphenols. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 9. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 5729-5733
- Talaro Park K., Cowan M.K., Chess B. 2009. Foundations in microbiology. 7th ed. New York, McGraw-Hill: 350-352
- Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-107
- Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176: 386-390