

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Aleš ŠPES

**VPLIV MAŠČOBNIH KISLIN NA BIOSINTEZO INHIBITORJA  
ESTERAZE SBR0501 PRI SEVU *Streptomyces* sp. K343-1**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EFFECT OF FATTY ACIDS ON BIOSYNTHESIS OF ESTERASE  
INHIBITOR SBR0501 IN *Streptomyces* sp. K343-1**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorja doc. dr. Hrvoja Petkovića in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentor: doc. dr. Hrvoje Petković

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član: prof. dr. Peter RASPOR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Hrvoje PETKOVIĆ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Veronika ABRAM  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleš Špes

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDC 579.66 : 579.2 : 577.15(043)=863  
KG *Streptomyces* sp. K343-1 / sekundarni metaboliti / biomasa / linolna kislina / polimiksin B / 2-bromoheksadekanojska kislina / 2-deoksiglukoza / inhibitor esteraze / SBR0501 / donos SBR0501  
AV ŠPES Aleš  
SA RASPOR, Peter (mentor), PETKOVIĆ, Hrvoje (somentor),  
ABRAM Veronika (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2006  
IN VPLIV MAŠČOBNIH KISLIN NA BIOSINTEZO INHIBITORJA ESTERAZE  
SBR0501 PRI SEVU *Streptomyces* sp. K343-1  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XII, 54 str., 11 pregl., 28 sl., 7 pril., 59 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Za povečanje donosa industrijsko pomembnih spojin lahko izbiramo med različnimi pristopi. Optimizacija gojišč, selekcija sevov in uporaba genskega inženiringa so le nekateri od možnih načinov za izboljševanje donosov. V diplomskem delu smo izbrali metodo selekcije. Selekcionirali smo izolate seva *Streptomyces* sp. K343-1 odporne na povečane koncentracije linolne kisline, ki daje prekurzorje za spojino SBR0501, toksičnih analogov linolne, izolate odporne na antibiotik polimiksin B, ki imajo spremenjene lastnosti celične membrane in izolate odporne na 2-deoksiglukozo, ki imajo dereguliran metabolizem linolne kisline. Ovrednotili smo produkcijski potencial izoliranih sevov. Končni donos SBR0501 smo določali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Rezultati kažejo, da se je končni donos SBR0501 v produkcijskem gojišču povečal pri sevih, ki so bili predhodno izpostavljeni povečanim koncentracijam linolne kisline in polimiksina B. Vendar donos ne narašča linearno z odpornostjo. V povprečju so imeli izolati odporni na linolno kislino povečano produkcijo spojine SBR0501 za 15 %, izolati odporni na polimiksin B pa za 52 %. Tudi koncentracije analoga linolne kisline 2-bromoheksadekanojske kisline pri naših poskusih so pozitivno vplivale na končni donos spojine SBR0501, saj so imeli izolati odporni na 5  $\mu$ M koncentracije 2-bromoheksadekanojske kisline v povprečju povečano produkcijo za 29 %. Pozitiven vpliv na donos ciljne spojine pa smo opazili tudi pri sevih odpornih na 2-deoksiglukozo. Izolati so imeli povečano produkcijo za 70 %. Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da lahko s selekcijo sevov dvignemo donos sekundarnega metabolita, spojine SBR0501.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.66 : 579.2 : 577.15(043)=863  
CX *Streptomyces* sp. K343-1 / secondary metabolites / biomass / linoleic acid / polymyxin B / 2-bromohexadecanoic acid / 2-deoxyglucose / esterase inhibitor / SBR0501 / yield SBR0501  
AU ŠPES Aleš  
AA RASPOR, Peter (supervisor)/ PETKOVIĆ, Hrvoje (co-advisor),  
ABRAM Veronika (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2006  
TI EFFECT OF FATTY ACIDS ON BIOSYNTHESIS OF ESTERASE INHIBITOR SBR0501 IN *Streptomyces* sp. K343-1  
DT Graduation Thesis  
NO XII, 54 p., 11 tab., 28 fig., 7 ann., 59 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB For the overproduction of industrial compounds we can choose from many different approaches. Media design and process optimization, screening and genetic alternations are just a few of the successfully applied technologies. In this work we have selected strains of *Streptomyces* sp. K343-1 by exposing them to increased concentrations of linoleic acid, which gives precursors for SBR0501, an esterase inhibitor. We have also selected strains by exposing them to increased concentrations of a toxic analogue of linoleic acid the antibiotic polymyxin B, which might alter membrane structure, and also to increased concentrations of 2-deoxyglucose (DOG), which gives rise to glucose-de-repressed strains. We have evaluated the production potential of the selected strains. Concentrations of secondary metabolite were measured with HPLC. Our results indicate increased production of SBR0501 in strains that were exposed to higher concentrations of linoleic acid and polymyxin B. However yields were not in linear correlation with the concentrations of these two compounds. On average strains that were resistant to linoleic acid produced 15 % more SBR0501 and strains resistant to polymyxin B produced 52 % more SBR0501. Resistance to a 5  $\mu$ M concentration of 2-bromohexadecanoic acid in our tests improved production of SBR0501 by 29 %. The biggest improvement in SBR0501 production was achieved with resistance to 2-deoxyglucose as DOG resistant strains produced 70 % more SBR0501. Based on HPLC results we can conclude that with strain selection we can improve yields of the secondary metabolite SBR0501.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>SLOVARČEK.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 SEKUNDARNI METABOLITI .....	3
2.1.1 Sekundarni metaboliti pri različnih skupinah organizmov .....	4
2.1.2 Delitev sekundarnih metabolitov glede na biosintezo .....	5
2.2 AKTINOMICETE .....	9
2.2.1 Aktinomicete .....	9
2.2.2 Taksonomija streptomicet.....	9
2.2.3 Morfologija in življenjski cikel .....	9
2.2.4 Genom .....	10
2.2.5 Ekologija in metabolizem.....	10
2.3 RAZGRADNJA MAŠČOBNIH KISLIN – $\beta$ -OKSIDACIJA .....	11
2.3.1 Reakcije $\beta$ -oksidacije .....	11
2.3.2 $\beta$ -oksidacija nenasičenih maščobnih kislin .....	12
2.4 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH METABOLITOV .....	13
2.5 IZBOLJŠAVA DELOVNEGA ORGANIZMA .....	14
2.5.1 Povečanje produkcije sekundarnih metabolitov .....	15
2.5.1.1 Selekcija .....	15
2.5.1.2 Mutageneza.....	16
2.5.1.3 Rekombinacija .....	17
2.5.1.4 Katabolična represija .....	18
2.5.1.5 Toksični metabolitični analogi .....	19

2.6	PRISTOPI ZA IZBOLJŠANJE DONOSA SPOJINE SBR0501 .....	19
2.6.1	Odpornost na povečane koncentracije linolne kisline .....	19
2.6.1.1	Peroksidacija.....	20
2.6.2	Odpornost na povečane koncentracije 2-bromoheksadekanojske kisline .....	21
2.6.2.1	Delovanje $\alpha$ -bromomaščobnih kislin kot model delovanja.....	21
2.6.3	Odpornost na povečane koncentracije polimiksina B .....	21
2.6.3.1	Toksičnost polimiksina B .....	22
2.6.4	Odpornost na 2-deoksiglukozo.....	22
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1	DELOVNI POSTOPKI .....	23
3.2	MATERIALI .....	27
3.2.1	Izolati.....	27
3.2.2	Gojišča.....	27
3.2.2.1	Trdno minimalno gojišče.....	27
3.2.2.2	Trdno sporulacijsko gojišče.....	27
3.2.2.3	Vegetativno gojišče .....	28
3.2.2.4	Produkcijsko gojišče.....	28
3.2.3	Raztopine in pufri .....	28
3.2.3.1	Priprava 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O} : \text{K}_2\text{HPO}_4$ pufra (5:7) .....	28
3.2.3.2	Priprava založne raztopine emulgatorja (5 g/100 ml) .....	28
3.2.3.3	Priprava mobilne faze za HPLC .....	29
3.2.3.4	Priprava založne raztopine polimiksina B (1 mg/ml).....	29
3.2.3.5	Priprava založne raztopine 2-bromoheksadekanojske kisline (1 mM)..	29
3.2.3.6	Priprava založne raztopine 2-DOG (2 mM) .....	29
3.2.4	Oprema .....	30
3.2.5	Steklovina in potrošni material.....	30
3.3	METODE DELA .....	31
3.3.1	Priprava gojišč .....	31
3.3.1.1	Trdno selekcijsko gojišče .....	31
3.3.1.2	Trdno sporulacijsko gojišče.....	31
3.3.1.3	Vegetativno gojišče za pripravo cepiva.....	31
3.3.1.4	Tekoče produkcijsko gojišče .....	31
3.3.2	Potek dela .....	32
3.3.3	Priprava vzorcev za analizo.....	32
3.3.4	Kvantitativno ovrednotenje količine inhibitorjev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.....	32
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>33</b>
4.1.1	Vpliv emulgatorja.....	33
4.1.2	Kultivacija na selekcijskem gojišču z linolno kislino .....	34
4.1.3	Rezultati tekočinske kromatografije visoke ločljivosti .....	35
4.1.4	Odpornost <i>Streptomyces</i> sp. K343-1 na linolno kislino in vpliv na donos SBR0501.....	35
4.1.5	Kultivacija na selekcijskem gojišču z 2-bromoheksadekanojsko kislino.....	38
4.1.6	Odpornost <i>Streptomyces</i> sp. K343-1 na 2-bromoheksadekanojsko kislino in vpliv na donos SBR0501 .....	38

4.1.7	Kultivacija na selekcijskem gojišču s polimiksinom B .....	40
4.1.8	Odpornost <i>Streptomyces</i> sp. K343-1 na polimiksin B in vpliv na donos SBR0501 .....	41
4.1.9	Kultivacija na selekcijskem gojišču z DOG .....	42
4.1.10	Odpornost <i>Streptomyces</i> sp. K343-1 na 2-deoksiglukozo in vpliv na donos SBR0501 .....	43
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>44</b>
5.1	RAZPRAVA .....	44
5.1.1	Vpliv zaščite sporulacijskega gojišča .....	44
5.1.2	Odpornost <i>Streptomyces</i> sp. K343-1 na linolno kislino, 2-bromoheksadekanojsko kislino, polimiksin B in 2-deoksiglukozo ter vpliv na donos SBR0501 .....	44
5.2	SKLEPI .....	47
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>49</b>

**ZAHVALA**  
**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Značilnosti primarnega in sekundarnega metabolizma (Hütter, 1986) .....	3
Preglednica 2: Vloga sekundarnih metabolitov (Döhren in Gräfe, 1997).....	4
Preglednica 3 : Vrste mutagenih sredstev in njihovo delovanje (Parekh in sod., 2000) ...	17
Preglednica 4: Maščobno kislinska sestava sojinega olja (O'Brien, 1998) .....	19
Preglednica 5: Sestava trdnega minimalnega gojišča NMMB (Hodgson, 1982) .....	27
Preglednica 6: Sestava trdnega sporulacijskega gojišča - modificirano ISP4 gojišče (Atlas, 1993).....	27
Preglednica 7: Sestava vegetativnega gojišča - modificirano obogateno gojišče z glicerolom (Atlas, 1993).....	28
Preglednica 8: Sestava produkcijskega gojišča - modificirano obogateno gojišče z glicerolom (Atlas, 1993).....	28
Preglednica 9: Seznam laboratorijske opreme.....	30
Preglednica 10: Vpliv emulgatorjev na rast sevov .....	33
Preglednica 11: Dodatki v selekcijska in sporulacijska gojišča, iz katerih smo izolirali seve .....	36



## KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturi dveh saharidnih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986).....	5
Slika 2: Strukturi dveh peptidnih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986) .....	6
Slika 3: Biosinteza penicilina G (Birmingham, 2006) .....	6
Slika 4: Strukturi dveh acilogeninskih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986).....	7
Slika 5: Strukturi dveh nukleolognih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986) .....	7
Slika 6: Strukturi dveh mešanih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986).....	8
Slika 7: Taksonomska opredelitev streptomocet (Bergey in Holt, 1994) .....	9
Slika 8: Življenjski krog streptomocet (van Wezel, 2002).....	10
Slika 9: Aktivacija maščobnih kislin (Boyer, 2005).....	11
Slika 10: Spiralna pot $\beta$ -oksidacije maščobne kisline (Boyer, 2005).....	12
Slika 11: Prikaz metabolizma nenasičene maščobne kisline 16:2 (Boyer, 2005) .....	13
Slika 12: Mehanizem fosfotransferaznega sistema (PTS) pri <i>Escherichii coli</i> (Madigan in sod., 2003) .....	18
Slika 13: Nastanek 13-hidroperoksi-9,11-oktadekadienojske kisline (13-HPODE) in 9- hidroperoksi-10,12- oktadekadienojske kisline (9-HPODE) (Spiteller in sod., 2001) .....	20
Slika 14: Hodogram poteka eksperimentalnega dela s kulturami odpornimi na linolno kislino .....	23
Slika 15: Hodogram poteka eksperimentalnega dela s kulturami odpornimi na 2- bromoheksadekanojsko kislino .....	24
Slika 16: Hodogram poteka eksperimentalnega dela s kulturami odpornimi na polimiksin B .....	25
Slika 17: Hodogram poteka eksperimentalnega dela s kulturami odpornimi na 2-deoksiglukozo .....	26
Slika 18: Preživelost v odvisnosti od koncentracije linolne kisline .....	34
Slika 19: HPLC kromatograma standarda (levo) in vzorca L44 (desno) .....	35
Slika 20: Donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na linolno kislino .....	36
Slika 21: Povprečne vrednosti donosa spojine SBR0501 izolatov odpornih na linolno kislino .....	37
Slika 22: Preživelost v odvisnosti od koncentracije 2-BrP.....	38
Slika 23: Donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na 2-BrP.....	39
Slika 24: Povprečne vrednosti donosa spojine SBR0501 izolatov odpornih na 2-BrP.....	39
Slika 25: Preživelost v odvisnosti od koncentracije polimiksina B.....	40
Slika 26: Donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na polimiksin B .....	41
Slika 27: Povprečne vrednosti donosa spojine SBR0501 izolatov odpornih na polimiksin B .....	42
Slika 28: Donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na 2-deoksiglukozo .....	43

## KAZALO PRILOG

	str.
Priloga A: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 3 % sojinega olja in 1 % linolne kisline (S:L=3:1).....	55
Priloga B: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % sojinega olja in 3 % linolne kisline (S:L=1:3).....	56
Priloga C: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 3 % sojinega olja in 1 % linolne kisline (S:L=3:1).....	57
Priloga D: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % sojinega olja in 3 % linolne kisline (S:L=1:3).....	58
Priloga E: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 3 % sojinega olja in 1 % linolne kisline (S:L=3:1).....	59
Priloga F: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % sojinega olja in 3 % linolne kisline (S:L=1:3).....	60
Priloga G: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % sojinega olja in 3 % linolne kisline (S:L=1:3).....	61

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-BrP	2-bromoheksadekanojska kislina
ACV-tripeptid	peptid sestavljen iz L-amino-adipinske kisline, L-cisteina in L-valina
AMP	adenozinmonofosfat
CAP	catabolite activator protein = katabolični aktivatorski protein
CCR	katabolična represija z virom ogljika (carbon catabolite repression )
CoA	koencim A
ddH <sub>2</sub> O	2x destilirana voda
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DMSO	dimetil sulfoksid
DOG	2-deoksiglukoza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
LPO	lipidna peroksidacija
NMMB	seleksijsko – minimalno gojišče (Hodgson, 1982)
pmz	pod mejo zaznave
SP	sporulacijsko gojišče
UV	ultravijolična svetloba

## SLOVARČEK

Analog – strukture, ki so si kemijsko sorodne, vendar ne identične

Katabolična derepresija – pojav, pri katerem je prekinjena katabolična represija

Končni donos spojine SBR0501 – koncentracija inhibitorja esteraz SBR0501 v bioproceni brozgi, katero proizvaja sev *Streptomyces* sp. K343-1

Inhibitor – vsaka snov, ki prepreči normalno delovanje encima, ne da bi uničila encim

Produkcijsko gojišče S:L=1:3 - produkcijsko gojišče, ki vsebuje 1 % (v/v) sojinega olja in 3 % (v/v) linolne kisline

Produkcijsko gojišče S:L=3:1 - produkcijsko gojišče, ki vsebuje 3 % (v/v) sojinega olja in 1 % (v/v) linolne kisline

## 1 UVOD

Sekundarni metaboliti so spojine, ki niso nujno potrebne za rast organizmov v laboratorijskem okolju. Njihova dejanska vloga je še vedno predmet razprav med znanstveniki, verjetno pa je pri različnih skupinah organizmov lahko zelo raznolika.

Za večino mikroorganizmov je značilno, da se tvorijo sekundarne metabolite v tako imenovani idiofazi. To je faza rasti, ki sledi fazi pospešene rasti (logaritemski fazi), nastopi pa zaradi pomanjkanja hranil, npr. dušika ali fosforja in lahko-metabolizirajočega vira ogljika. Med sekundarne metabolite sodijo tudi inhibitorji esteraz, ki so potencialno uporabni v medicini, saj esteraze razgrajujejo različna zdravila in tako vplivajo na njihovo učinkovitost. Z inhibitorji esteraz bi lahko zmanjšali delovanje karboksi esteraz ter tako posledično vplivali na učinkovitost in stranske pojave aktivnih učinkovin kot so npr. zdravila proti raku (cepacitabin), heroin, kokain, lokalni anestetik prokain. Inhibitorje esteraz proizvajajo tudi streptomicete (Urukalo, 2005).

Streptomiceta *Streptomyces* sp. K343-1 producira metabolit SBR0501, ki kaže zelo visoko inhibitorno aktivnost do esteraz že pri mikromolarnih koncentracijah.

Z optimizacijo, gojišča in pogojev gojenja lahko znatno vplivamo na biosintezo in končni donos sekundarnih metabolitov. Tako je Kirn (2005) pokazal, da dodatek maščobnih kislin (olja) pozitivno vpliva na končni donos spojine SBR0501 pri sevu *Streptomyces* sp. K343-1.

### 1.1 NAMEN DELA

Maščobne kisline v gojišču močno inducirajo biosintezo spojine SBR0501, vendar so tudi toksične v večjih koncentracijah (nad 3 mM), zato je bil cilj naloge izolirati mutante *Streptomyces* sp. K343-1, ki bi bile odporne na povečane koncentracije linolne kisline in/ali njenih analogov, ki lahko razen odpornosti vplivajo tudi na transport linolne kisline v celico.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Linolna kislina je v večjih koncentracijah toksična za delovni organizem, a je nujno potrebna za donos spojine SBR0501. Zato predvidevamo, da bi bilo mogoče dvigniti donos ciljne spojine SBR0501 s sevi, ki so:

- odporni na povečano koncentracijo linolne kisline ali toksičnih analogov (npr. 2-bromoheksadekanojska kislina) ali imeli povečan transport linolne kisline v celico (povečana odpornost na linolno kislino)
- imajo spremenjene lastnosti celične membrane (npr. odporne na polimiksin B),
- imeli dereguliran metabolizem (katabolizem) linolne kisline (npr. deregulacija katabolične represije, odpornost na 2-deoksiglukozo).

S tem namenom naj bi pripravili izolate seva *Streptomyces* sp. K343-1, ki naj bi prenesli večje koncentracije linolne kisline, 2-bromoheksadekanojske kisline ali pa bili odporni na

povečane koncentracije 2-deoksigluoze in polimiksina B in nato ovrednotili produkcijski potencial na ta način izoliranih mutant.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SEKUNDARNI METABOLITI

Sekundarni metaboliti so spojine, ki niso neposredno vključene v rast, razvoj in razmnoževanje organizmov, ki jih producirajo. Pozornost privabljajo zaradi zanimive in značilne strukture, predvsem pa zaradi praktične pomembnosti, tako v pozitivnem (antibiotiki) kot v negativnem smislu (toksini) (Hütter, 1986). Sekundarni metaboliti so produkti mikroorganizmov, živali in rastlin. Predpostavlja se, da je razpon bioloških aktivnosti sekundarnih metabolitov zelo širok. Služijo lahko kot signali »quorum« zaznavanja, ki sprožijo diferenciacijo celic ali proizvodnjo patogenih determinant (Martin in sod., 2005), lahko jim pomagajo preživeti v naravi (Vining, 1986), vplivajo lahko na razmerje spolnega in nespolnega razvoja spor pri *Aspergillus nidulans* (Calvo in sod., 2002), lahko so orožje proti tekmečem (Hütter, 1986), lahko so virulentni dejavniki (Calvo in sod., 2002), organizmu lahko dajejo dolgoročne prednosti pri preživetju v biološki skupnosti in okolju (Döhren in Gräfe, 1997), delujejo lahko kot kemijski agensi, ki posredujejo interakcije med organizmi oz. med organizmi in njihovim okoljem (Vining, 1986), lahko imajo tudi vlogo pri transportu kovin (Challis in Hopwood, 2003). Po eni od teorij (Hodgson, 2000) je možna biološka vloga sekundarnih metabolitov uravnavanje neuravnoteženih pogojev rasti z odstranitvijo prekomernih količin primarnih metabolitov, ki nastanejo pod ugodnimi pogoji, npr. velika količina aminokislin. Ne glede na strukturo sekundarnega metabolita lahko predpostavimo, da je odstranitev odvečnih produktov v korist celici (Hodgson, 2000).

Na splošno velja, da poteka biosinteza sekundarnih metabolitov ali v času rasti ali pod posebnimi pogoji, ki niso povezani z maksimalno hitrostjo rasti (Hütter, 1986). Še več, maksimalna proizvodnja sekundarnih metabolitov so opazili, kadar v gojišču začne primanjkovati hranil. S proizvodnjo sekundarnih metabolitov so pogosto povezane tudi določene morfološke spremembe (npr. tvorba spor) (Döhren in Gräfe, 1997).

Sekundarni metaboliti so pogosto sintetizirani v družinah, to so skupine kemijsko sorodnih komponent. Zähler (1979) meni, da zaradi majhnih razlik v strukturi ali biosintezni poti lahko rečemo, da je sekundarni metabolizem nekakšno igrišče ali poligon evolucije. Vse dokler razvojna pot ali metaboliti ne prinesejo gostitelju slabšega položaja, ga ta obdrži ali prilagaja tekom več generacij (Zähler, 1979, citirano po Hütter, 1986).

Preglednica 1: Značilnosti primarnega in sekundarnega metabolizma (Hütter, 1986)

<b>Primarni metaboliti</b>	<b>Sekundarni metaboliti</b>
Pomembni za rast	Nepomembni za rast
Znana fiziološka vloga	Fiziološka vloga je težko opredeljiva
Prisotni skozi ves življenjski cikel	Prisotni predvsem v omejenem delu razvojnega cikla
Prisotni pod različnimi pogoji rasti	Prisotnost močno pogojena z ravnimi pogoji
Pogosto produkti z relativno enostavno kemijsko strukturo	Pogosto produkti s kompleksno kemijsko strukturo

Preglednica 2: Vloga sekundarnih metabolitov (Döhren in Gräfe, 1997)

Vloga v okolju	Vloga v organizmu
Zaščita pred ostalimi organizmi	Regulacijski signali za morfogenezo
Regulacija komenzalizma in sobivanja	Regulirajo parjenje
Zaščita pred škodljivimi vplivi okolja (UV)	Detoksifikacija metabolitov
Pridobivanje elementov v sledovih	
Detoksifikacija	

### 2.1.1 Sekundarni metaboliti pri različnih skupinah organizmov

Največ je znanega o sekundarnih metabolitih mikroorganizmov. Veliko jih je bilo odkritih med načrtnim iskanjem novih biološko aktivnih spojin za uporabo v medicini. Večino jih uvrščamo med antibiotike. Opisani so še sekundarni metaboliti brez opredeljene bioaktivnosti, ki so jih odkrili le zaradi njihovih značilnosti kot vonj, barva... (Vining, 1986).

Prokarionte, kot proizvajalce sekundarnih metabolitov, lahko po eni od teorij razdelimo v skupine glede na strategijo preživetja. Prva skupina, v katero sodijo aktinomicete, s sekundarnimi metaboliti (antibiotiki) uničijo tekmece. Ker pa so tekmece v naravnem okolju številčni, je tudi razpon sekundarnih metabolitov streptomicet zelo širok. V drugo skupino sodijo organizmi, ki za preživetje izkoriščajo hitro prilagajanje na drugačne okoljske pogoje in učinkovito izrabo hranil. Mednje sodijo enterobakterije (Vining, 1986). Med evkarionti so najpomembnejše nitaste glive, ki so razvile bogat in širok sekundarni metabolizem. V primerjavi s prokarionti pa tvorijo večcelične glive manj sekundarnih metabolitov (Vining, 1986).

Zelo raznoliki so tudi rastlinski sekundarni metaboliti. Predpostavlja se, da so vpleteni pri zaščiti pred mikroorganizmi, zajedalci in insekti, lahko so atraktanti ali repelenti, za detoksifikacijo toksinov (Döhren in Gräfe, 1997) ali pa za zaščito pred UV-sevanjem (Yazaki, 2005). Najbolj znani so alkaloidi, veliko pa je tudi esencialnih olj (evgenol, limonen), saponinov (triterpeni, steroidi), monoterpenov in flavonoidov (Wink, 2003; Wallace, 2004). Zanimivo vprašanje pa je, ali naj uvrščamo te substance v primarne ali sekundarne metabolite. Čeprav sodelujejo pri razmnoževanju, tako da privabljajo žuželke, nimajo pomembne vloge v metabolizmu (Vining, 1986).

V živalskem kraljestvu največ sekundarnih metabolitov tvorijo členonožci in ostali insekti. Najbolj poznani proizvajalci so pajki, kače, polži, škorpijoni. Pomen sekundarnih metabolitov živali je predvsem zaščita pred drugimi organizmi, imajo pa tudi vlogo pri komunikaciji. Vključujejo hlapne estre, feromone, snovi za označevanje ozemlja ter strupe (Vining, 1986; Mebs, 2001).



## 2.1.2 Delitev sekundarnih metabolitov glede na biosintezo

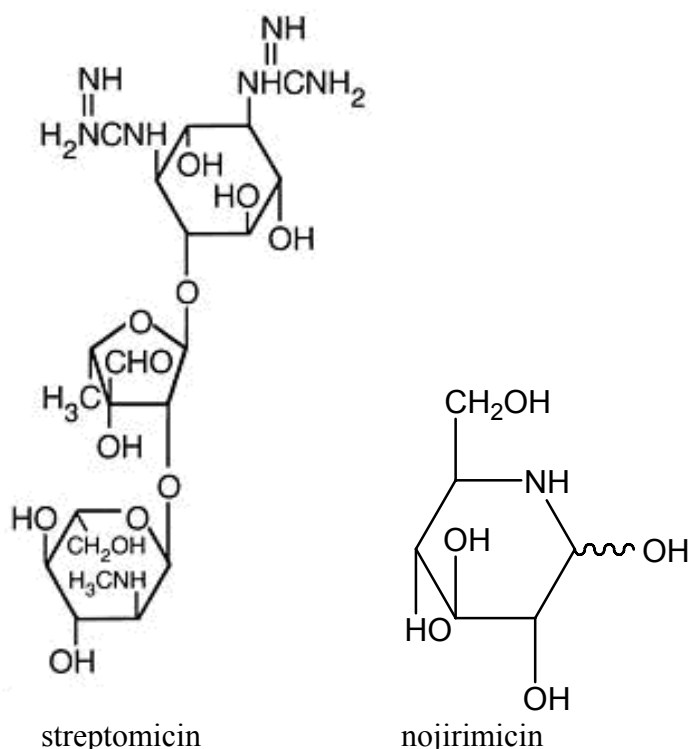
Obstajajo različni kriteriji, po katerih lahko delimo sekundarne metabolite v skupine. Pri mnogih delitvah se upošteva strukturno raznolikost, predvsem pri delitvi antibiotikov, ki so razdeljeni na skupine kot npr.  $\beta$ -laktamski, peptidni, aminoglikozidni, makrolidni antibiotiki, tetraciklini, ansamicini, ergotalkaloidi.

Druga delitev deli sekundarne metabolite glede na njihovo aktivnost. Tukaj so skupine: snovi z antibiotično aktivnostjo (protibakterijska, protiglivična, protivirusna, protirakasta), snovi s farmaloško aktivnostjo (encimski inhibitorji, imunološka aktivnost, biokemijska aktivnost) in snovi za uporabo v agronomiji (pesticidi, herbicidi in insekticidi) (Berdy, 2005).

Primarni metabolizem zagotavlja gradbene enote za sekundarni metabolizem, pri tem pa se določeni intermediati uporabljajo pogosteje kot drugi (Vining, 1986).

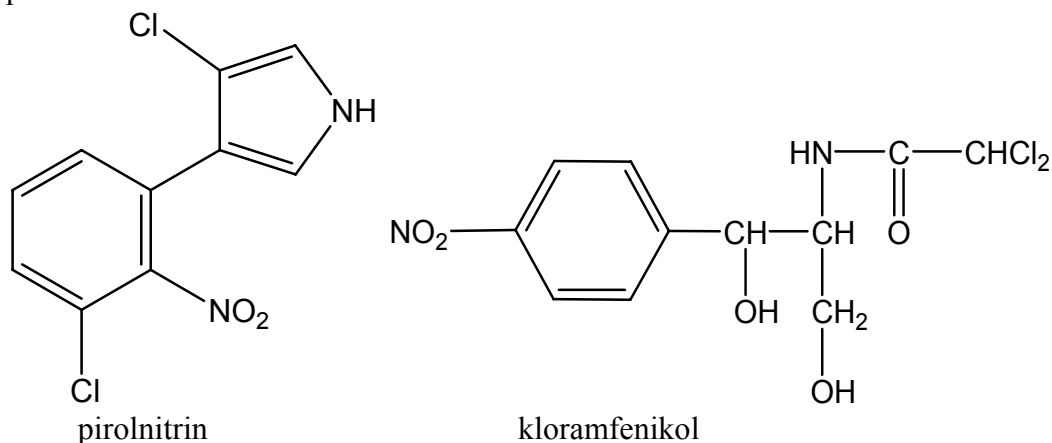
Tako lahko delimo sekundarne metabolite v štiri skupine (saharidi, peptidi, acilogenini, nuklelogi) glede na gradbene enote iz katerih so sestavljeni. V peti skupini pa so spojine, ki izhajajo iz večih različnih prekurzorjev.

- Saharidi: so spojine, ki imajo v osnovni strukturi monosaharide, oligosaharide in polisaharide. Primarni gradnik je navadno glukoza. Modificirana je s relativno kratkimi reakcijami in tvori produkte kot je npr. nojirimicin. Večje modifikacije tvorijo tudi oligosaharide, kot je npr. streptomycin.

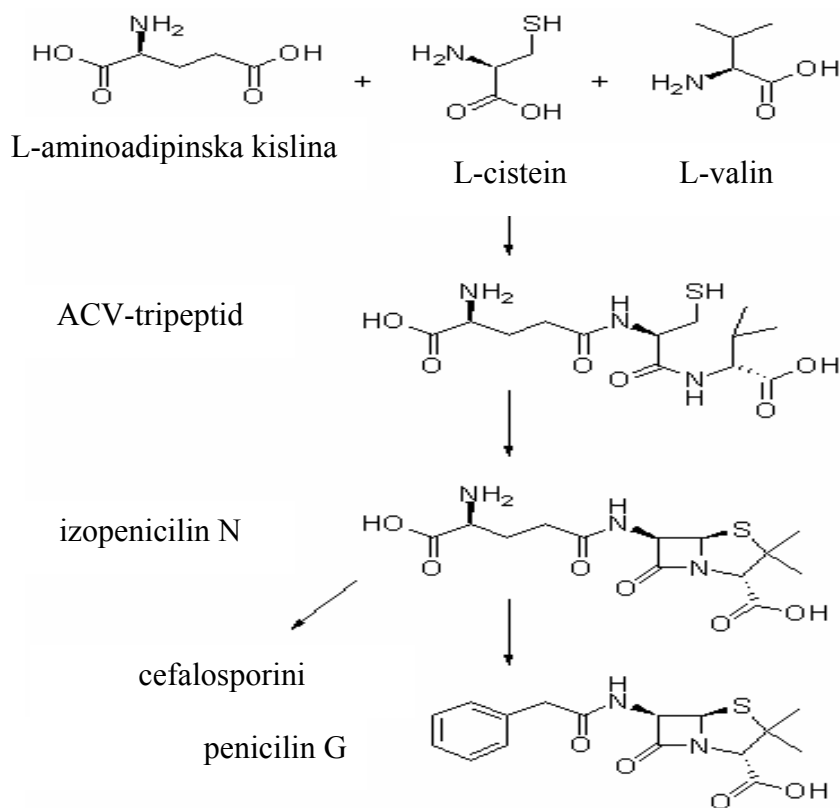


Slika 1: Strukturi dveh saharidnih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986)

- Peptidi: ti pogosto nastanejo z modifikacijo aminokislin, npr. pirolnitrin (iz triptofana). Vendar to ni edina pot, dobro je poznana tudi skupina oligopeptidnih sekundarnih metabolitov, npr. tirocidin (antibiotik). Te spojine imajo vključene tudi D-aminokislino. Peptidni sekundarni metaboliti lahko nastanejo tudi iz vmesnih produktov biosinteze aminokislin, npr. kloramfenikol. Sintaza peptidnih sekundarnih metabolitov je navadno neribosomska sinteza proteinov, vendar ribosomsko sintetizirani peptidni sekundarni metaboliti niso posebnost.

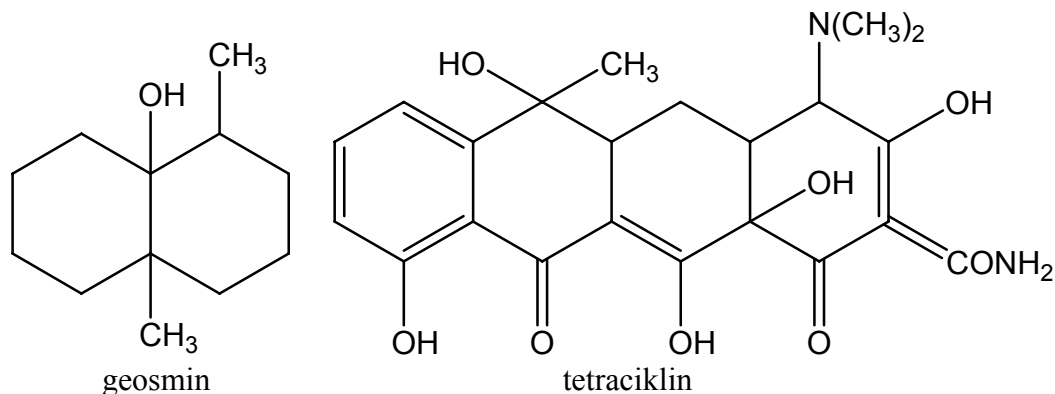


Slika 2: Strukturi dveh peptidnih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986)



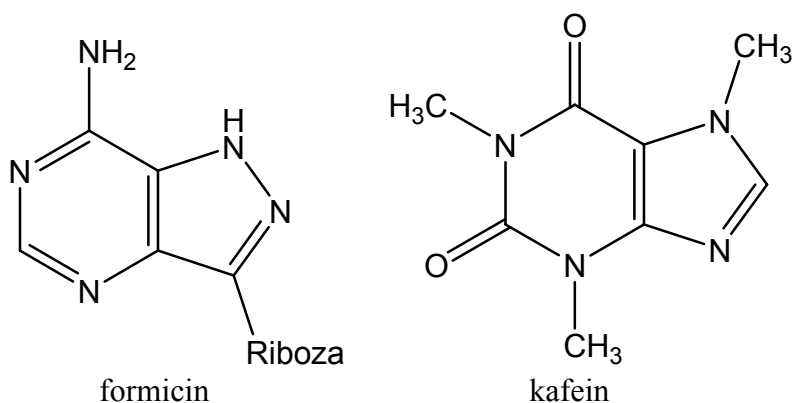
Slika 3: Biosinteza penicilina G (Birmingham, 2006)

- Acilogenini: nastanejo iz aktiviranih acilnih prekurzorjev. Z združitvijo tvorijo različne strukture terpenov, steroidov in karotenoidov (geosmin, geraniol). To vključuje še poliketide, ki npr. eritromicin, tetracikline in cianidin (pigment).



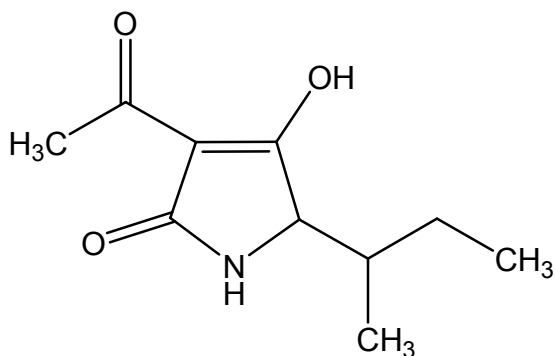
Slika 4: Strukturi dveh acilogeninskih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986)

- Nukleologi: to so sekundarni metaboliti z izrazito podobnostjo monomernim komponentam nukleinskih kislin. So predvsem modificirani nukleotidi. Sem sodijo spojine kot so npr. formicin in kafein.

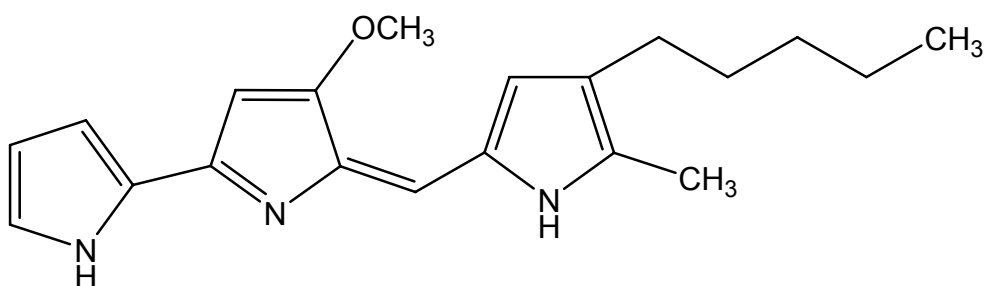


Slika 5: Strukturi dveh nukleognih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986)

- Mešani: te ne moremo uvrstiti med ostale skupine, saj so zgrajeni iz različnih prekurzorjev iz zgornjih skupin. Med te uvrščamo razne neesencialne porfirine, razne kisline iz prekurzorjev Krebsovega cikla, spojine, ki so nastale z združitvijo aminokislin in acilnega prekurzorja.



tenavzojska kislina



prodigiosin

Slika 6: Strukturi dveh mešanih sekundarnih metabolitov (Vining, 1986)

## 2.2 AKTINOMICETE

### 2.2.1 Aktinomicete

Aktinomicete so velika skupina navadno filamentoznih po Gramu pozitivnih bakterij, ki pogosto tvorijo razvejano mrežo filamentov oziroma tako imenovani micelij. Dimenzije micelija aktinomicet so po velikosti podobne dimenzijam bakterij, po obliki pa so podobne miceliju nitastih gliv. Večina aktinomicet tvori spore, vendar se proces nastanka spor med skupinami razlikuje (Madigan in sod., 2003).

Znane so postale kot proizvajalci antibiotikov ter ostalih biološko aktivnih spojin leta 1940, ko so odkrili aktinomycin, še posebno pa leta 1943, ko so odkrili streptomcin, prvi učinkoviti antibiotik v zdravljenju tuberkuloze (Challis in Hopwood, 2003). Aktinomicete proizvajajo 2/3 znanih antibiotikov, ki jih proizvajajo mikroorganizmi, in okoli 60 % vseh ostalih sekundarnih metabolitov z biološko aktivnostjo (Kieser in sod., 2000). K temu deležu rod *Streptomyces* prispeva 70-80 %, ostale deleže prispevajo *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* in *Actinoplanes* (Challis in Hopwood, 2003).

### 2.2.2 Taksonomija streptomicet

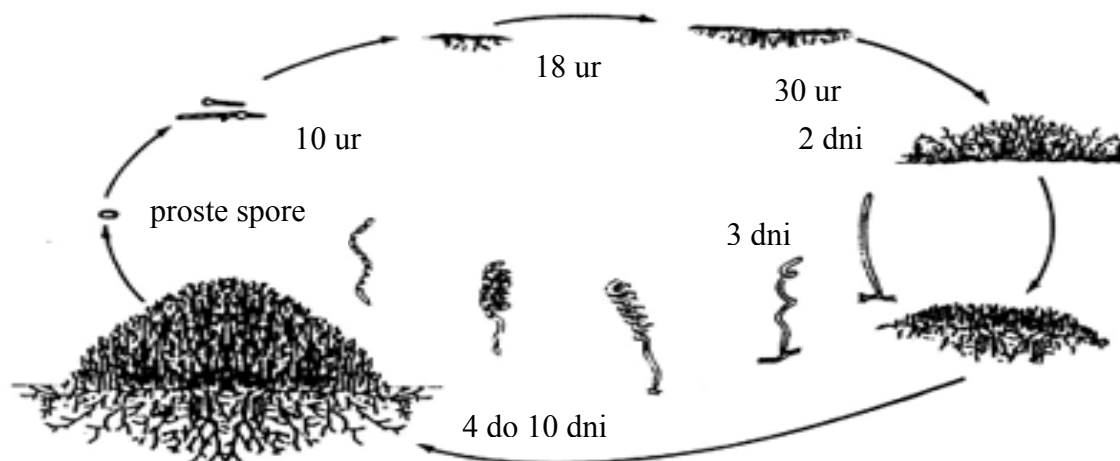
domena: BACTERIA  
deblo: Firmicutes  
razred: Actinobacteria  
podrazred: Actinobacteridae  
red: Actinomycetales  
podred: Streptomycineae  
družina: Streptomycetaceae  
rod: Streptomyces

Slika 7: Taksonomska opredelitev streptomicet (Bergey in Holt, 1994)

### 2.2.3 Morfologija in življenjski cikel

Kljub različnim barvam kolonij lahko streptomicete na agarju enostavno prepoznamo po nejasnih, hrapavih oblikah, značilni barvi in kompaktni strukturi. Filamenti streptomicet so običajno premera 0,5-1,0  $\mu\text{m}$ , različno dolgi in jim pogosto manjka prečna stena med vegetativno fazo rasti. Rast se pojavlja na koncih filamentov, kjer tudi pogosto pride do razvejanja, kar privede do kompleksnega prepleta matriksa. S staranjem kolonije se začnejo tvoriti sporofori, zračne hife, ki se dvigajo nad površino in tvorijo spore. Spore se imenujejo konidiji in niso sorodni z endosporami bakterij rodu *Bacillus* in *Clostridium*. Tvorijo se z nastankom prečne stene v večjedrnih sporoforih, čemur sledi ločevanje posameznih celic naravnost v spore. Spore služijo predvsem v razmnoževalne namene. Elementi zračnega micelija se razlikujejo po obliki in ureditvi pri posameznih vrstah rodu *Streptomyces* ter so eden od bistvenih ključev za razvrščanje streptomicet v skupine.

Konidiji in sporofori pogosto vsebujejo pigmente, ki dajejo značilno barvo zreli koloniji (Madigan in sod., 2003).



Slika 8: Življenjski krog streptomicet (van Wezel, 2002)

#### 2.2.4 Genom

Vsebnost GC-nukleotidnih parov pri streptomicetah je 70–74 % ali več. Odvisno od vrste je velikost kromosomskega zapisa približno 7,8–8,0 Mb (Kieser in sod., 2000), lahko pa je tudi večji.

Nukleotidno zaporedje celotnega genoma *Streptomyces coelicolor* je bilo določeno julija leta 2001. Dolgo je 8.667.507 bp in naj bi vsebovalo 7825 genov, kar je približno dvakrat več od *E. coli*. Je tudi največji sekvenciran bakterijski genom. *Streptomyces avermitilis* ima sicer 9.025.608 bp, a ocenjujejo, da ima le 7575 odprtih bralnih okvirjev (*Streptomyces*, 2006).

Večina streptomicet vsebuje linearni kromosom. Velike delecije in podvojitve, ki se pojavljajo s frekvenco 0,1–1 % so značilne za to skupino mikroorganizmov. Zaradi terminalnih delecij na kromosomu se lahko povežeta dva konca in tvorita krožni kromosom, ki je zmožen podvojitve (Kieser in sod., 2000).

Večina streptomicet vsebuje plazmide, tako linearne kot tudi krožne, ki so konjugativni in se sami podvojujejo. So velikosti 10–600 kb. Krožni so kovalentno zaprti krogi, ki so v več kopijah, če so majhni, in v manj, če so večji. Večina plazmidov ne nosi zapisa za sintezo antibiotikov (Kieser in sod., 2000).

#### 2.2.5 Ekologija in metabolizem

Streptomicete v naravi najpogosteje najdemo kot prostoživeče saprofite v rizosferi (tanka plast zemlje, ki je v kontaktu z rastlinskimi koreninami), kjer s svojimi antibiotiki ščitijo pred potencialnimi patogenimi mikroorganizmi (Challis in Hopwood, 2003) in celo v vodnih območjih (Madigan in sod., 2003). Značilen vonj po zemlji je posledica sinteze vrste metabolitov, ki jih imenujemo geosmini. Večino streptomicet najdemo v alkalnih in

nevtralnih tleh. Več jih je v vodopropustnih tleh, kot so peščena tla, kar kaže na to, da za rast potrebujejo manjši vodni potencial od večine bakterij v zemlji (Madigan in sod., 2003). Večina streptomicet ima dokaj različne zahteve po virih ogljika. Uporabljajo lahko: ogljikove hidrate, sladkorje, alkohole, maščobne in organske kisline, aminokisline in aromatske spojine (Madigan in sod., 2003).

V naravi, kjer streptomicete živijo predvsem v zemlji, je dovolj virov ogljika (kompleksni polisaharidi), toda malo dušika. Posledično imajo aktinomicete za ogljikove hidrate različne katabolične poti. Zaradi pomanjkanja dušika ni presenetljivo, da ima biosinteza aminokislin pri streptomicetah zelo redko inhibicijo s povratno zanko (Hodgson, 2000).

Kirn (2005) je pokazal, da dodatek maščobnih kislin (olja) pozitivno vpliva na donos spojine SBR0501 pri sevu *Streptomyces* sp. K343-1, zato je proces razgradnje maščobnih kislin pri streptomicetah omenjen v posebnem poglavju.

## 2.3 RAZGRADNJA MAŠČOBNIH KISLIN – $\beta$ -OKSIDACIJA

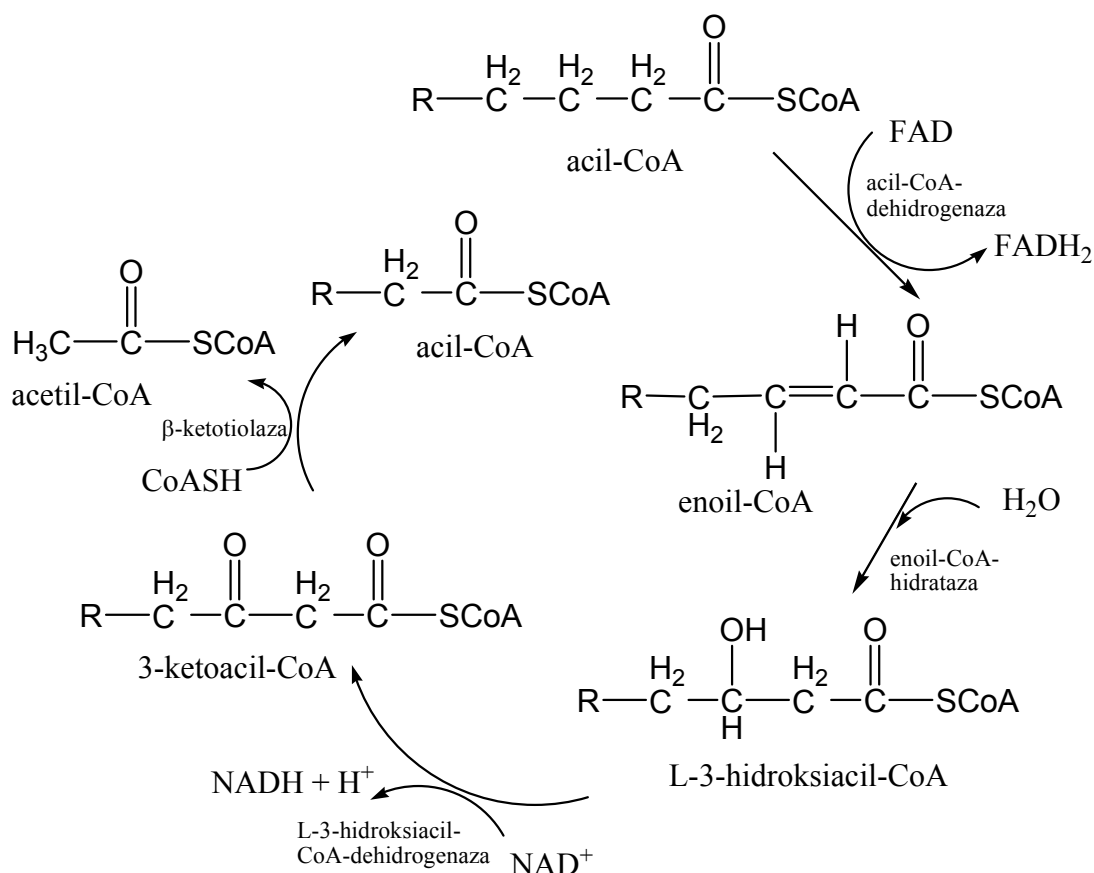
Produkti  $\beta$ -oksidacije so gradbeni elementi ciljnega produkta, spojine SBR0501. Maščobne kisline se morajo za razgradnjo najprej aktivirati. Tako nasičene kot nenasičene maščobne kisline se aktivirajo na enak način.



Slika 9: Aktivacija maščobnih kislin (Boyer, 2005)

### 2.3.1 Reakcije $\beta$ -oksidacije

Acil-CoA vstopi v spiralno pot  $\beta$ -oksidacije. Vsak popoln obrat spirale vključuje štiri encimsko katalizirane reakcije, ki vodijo do sprostitve acetil-CoA in verige maščobne kisline, krajše za dva ogljikova atoma. Te reakcije so: (1) oksidacija enojne vezi med dvema ogljikovima atomoma do dvojne vezi, v sodelovanju s FAD, (2) adicija vode na dvojno vez z uvedbo hidroksilne skupine na enega od ogljikov, (3) oksidacija hidroksilne skupine v prisotnosti  $\text{NAD}^+$  do ketoskupine in (4) razcep vezi C-C in sprostitvev acetil-CoA. Število obratov ne ustreza neposredno številu nastalih acetil-CoA, ker v zadnjem obratu nastaneta dva acetil-CoA. Razgradnjo maščobnih kislin predstavljajo predvsem oksidacijske reakcije (dve od štirih reakcij). Drugi dve sta reakciji nehidrolitične cepitve ob adiciji na dvojno vez (Boyer, 2005).



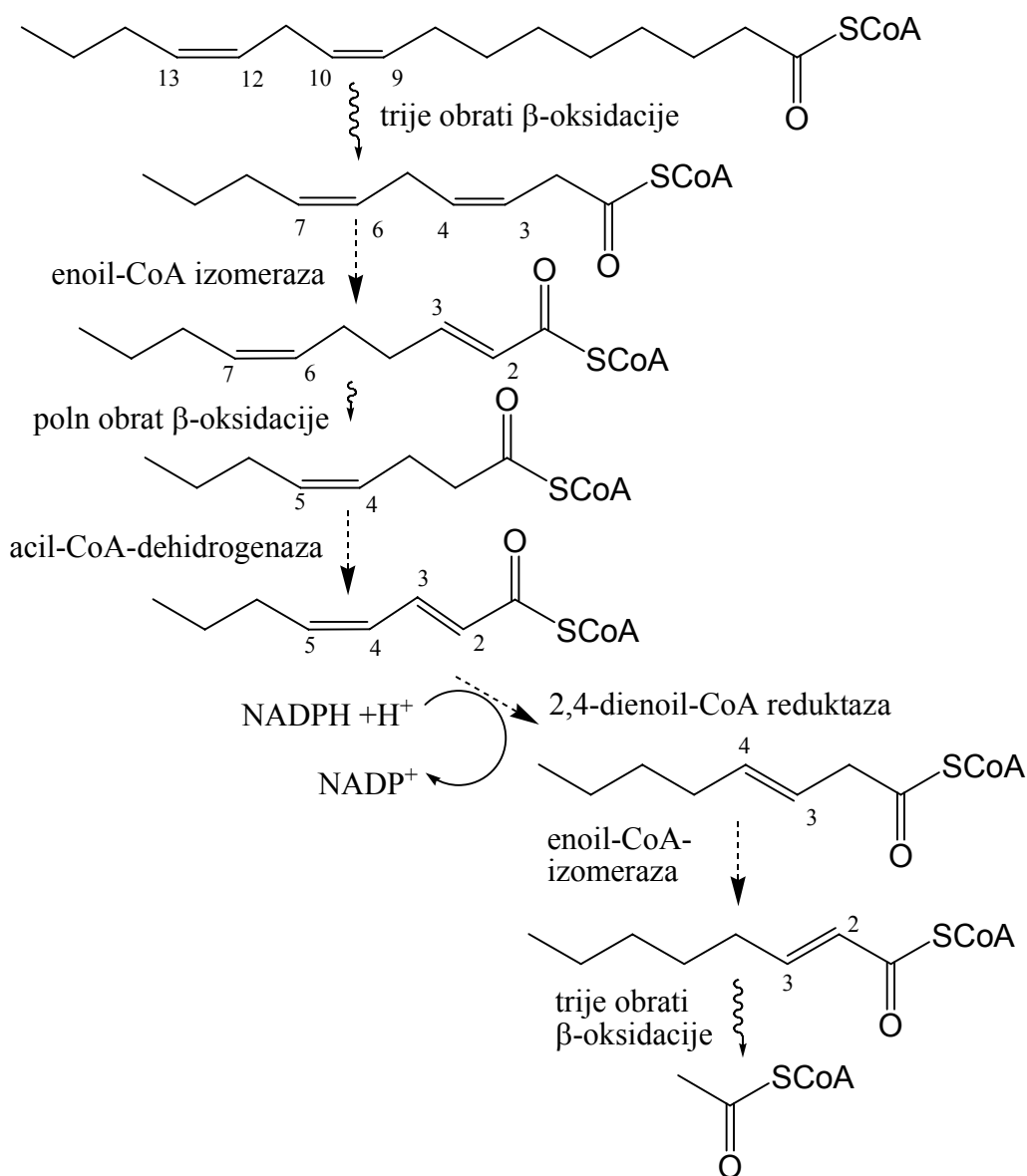
Slika 10: Spiralna pot  $\beta$ -oksidacije maščobne kisline (Boyer, 2005)

### 2.3.2 $\beta$ -oksidacija nenasičenih maščobnih kislin

Maščobne kisline z dvojno vezjo nastanejo tudi kot intermediati v procesu  $\beta$ -oksidacije. Vendar ima dvojna vez v intermediatu enoil-CoA konfiguracijo *trans*, medtem ko je dvojna vez v naravnih maščobnih kislinah v konfiguraciji *cis*. Za popolno razgradnjo nenasičenih maščobnih kislin zato potrebujemo poleg štirih encimov  $\beta$ -oksidacije še dva pomožna encima.

Prvi je enoil-CoA-izomeraza in katalizira preureditev  $\Delta^3$ -dvojne vezi s *cis* konfiguracijo v  $\Delta^2$ -dvojno vez s *trans* konfiguracijo. Drugi, 2,4-dienoil-CoA-reduktaza, pa s koencimom NADPH pretvori intermediat *trans*- $\Delta^2$ , *cis*- $\Delta^4$  v *trans*- $\Delta^3$ -enoil-CoA. Pri tej reakciji se ena dvojna vez reducira in druga premakne (Boyer, 2005).





Slika 11: Prikaz metabolizma nenasičene maščobne kisline 16:2 (Boyer, 2005)

## 2.4 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA PRODUKCIJO SEKUNDARNIH METABOLITOV

Tvorba sekundarnih metabolitov je pogojena z določenimi dejavniki, kot so (Vining, 1986):

- Katabolična represija z ogljikom: spojine, ki omogočajo hitro asimilacijo vira ogljika zavirajo uporabo alternativnih virov ogljika. Visoka vsebnost glukoze v gojišču, ki je najbolj proučeni primer represije, zavira sintezo encimov, potrebnih za metabolizem ostalih virov ogljika in za sintezo sekundarnih metabolitov.

- Katabolična represija z dušikom: oblika, v kateri je celici dostopen dušik, predvsem kot amonijev ion, močno vpliva na donos sekundarnih metabolitov. Slabše dostopni viri verjetno sproščajo amonijev ion le počasi in omejujejo hitrost rasti celice. Takšno stanje, poznano kot delno stradanje dušika, pozitivno vpliva na sintezo določenih sekundarnih metabolitov, npr. acilogeninov. Podobne učinke so opazili tudi pri dodatku raznih spojin, ki vežejo amonijev ion, npr. magnezijev fosfat. Te vežejo amonijev ion v kompleks, iz katerega ga potem počasi sproščajo in omogočajo rast organizmu.
- Regulacija s fosfatom: organizmi tvorijo neznatne količine sekundarnih metabolitov, če je v gojišču presežek fosfata. Glavna tarča regulacije s fosfatom naj bi bila sinteza encimov sekundarnega metabolizma. Presežek fosfata zavira sintezo določenih encimov, saj zavira sintezo fosfataz. Dvig znotrajcelične koncentracije ATP, za 2- do 3-krat, povzroči takojšnjo inhibicijo sinteze antibiotikov.
- Bioregulatorji: pri sintezi sekundarnih metabolitov so potrebne določene molekule, ki po strukturi niso povezane s sekundarnimi metaboliti, niti z njihovimi intermediati. Takšen primer je A-faktor pri sintezi streptomicina. Mutante *S. griseus*, ki nimajo A-faktorja, imajo blokiran mehanizem diferenciacije in ne morejo sporulirati. Vendar je ta mehanizem prisoten le pri nekaterih vrstah in ni splošen. Vrsta *S. coelicolor* sporulira normalno tudi brez A-faktorja

## 2.5 IZBOLJŠAVA DELOVNEGA ORGANIZMA

Izboljšava delovnega organizma vključuje fenotipske spremembe kot so npr. povečana produkcija zelenih metabolitov, odstranitev neželenih metabolitov ali sprememba celične morfologije, ki omogoči lažjo ločitev organizma od produkta (Queener in Lively, 1986).

Z izjemo živilske industrije zelo malo komercialnih procesov uporablja divje tipe sevov, izoliranih neposredno iz narave. Uporabljajo se mutanti, ki so prilagojeni na specifičen proces. Ena od glavnih motivacij za razvoj industrijskih sevov je ekonomika, kajti donos ciljnih produktov pri divjih tipov je navadno prenizek za biosintezo. Obsežen program razvoja sevov lahko traja tudi več let, donosi pa se lahko povečajo tudi za 100 in več krat. Uspešnost programa je odvisna od delovnega seva, procesa in narave ciljnega produkta, ki jo pridobivamo (Crueger in Crueger, 1990).

Za stroškovno upravičen proces so potrebni sevi z izboljšanimi bioprocesnimi lastnostmi. Odvisno od sistema so zaželeni sevi, ki imajo krajši čas bioprocasa, ne tvorijo neželenih pigmentov ali drugih stranskih produktov, imajo zmanjšane potrebe po kisiku ali lahko uporabljajo cenejše substrate.

Naravni izolati pogosto tvorijo mešanico kemijsko podobnih spojin, praviloma pa želimo mutante, ki tvorijo le eno spojino (Crueger in Crueger, 1990).

## 2.5.1 Povečanje produkcije sekundarnih metabolitov

Bioaktivne molekule so močno oksidirane in gledano z metaboličnega stališča zelo energetske potratne molekule, zato jih naravni izolati v naravi tvorijo v majhnih količinah (Prosser in Tough, 1991).

Produkcijo sekundarnih metabolitov nadzira 5 različnih skupin genov (Crueger in Crueger, 1990):

- Strukturni geni – kodirajo encime za biosintezo sekundarnih metabolitov.
- Regulatorni geni – sekundarnega metabolizma.
- Geni za odpornost – dajejo odpornost proizvajalcem antibiotikov na lastne metabolite.
- Geni za permeabilnost – nadzorujejo privzem in izločanje spojin.
- Regulatorni geni – primarnega metabolizma in tako posredno tudi sekundarnega.

Spremembe v metabolizmu, ki lahko povzročijo povečanje donosa (Döhren in Gräfe, 1997; Nielsen, 1998; Oksman-Caldentey in Inze, 2004):

- Eliminacija ozkih grl pri sintezi prekursorjev oziroma gradbenih elementov, kateri tvorijo sekundarni metabolit.
- Odprava negativne katabolične regulacije.
- Dvignjena odpornost organizma na lasten ciljni metabolit
- Odsotnost negativne povratne regulacije (»feedback regulation«) sekundarnih metabolitov na lastno sintezo.
- Povečano izražanje biosinteznih genov vključenih v pot.
- Zmanjšan katabolizem (razgradnja) ciljne spojine.
- Zmanjšan pretok metabolitov skozi biosintezne poti, ki jih lahko naš ciljni metabolit deli z ostalimi sekundarnimi metaboliti.
- Povečana prepustnost membrane za prekursorje želenega produkta.

Obstaja več osnovnih genskih pristopov za izboljšanje donosa ciljnega produkta pri biosinteznih postopkih, kot so npr. mutageneza, rekombinacija in kloniranje (Baltz, 1986a).

Selekcije, mutageneza in genske rekombinacije so znane in uporabne metode za izboljšanje produkcije sekundarnih metabolitov pri aktinomicetah. Vendar ne dajejo informacij o genih, ki so pomembni za visoko produkcijo sekundarnih metabolitov. Gre za naključne mutacije, ki jih navadno ni mogoče definirati (locirati) (Baltz in Hosted, 1996).

### 2.5.1.1 Selekcija

Selekcija je postopek, ko namerno gojimo mutante ali rekombinantne mikroorganizme v pogojih, pri katerih lahko rastejo le tisti z ustreznim genotipom.

Direktna uporaba bogatitvenih postopkov za večjo produkcijo sekundarnih metabolitov je težja. Selekcija mora biti posredna, saj so sekundarni metaboliti nepotrebni za preživetje celice (Queener in Lively, 1986). Kot primer selekcije lahko navedemo izolacijo seva, ki če je odporen na več antibiotikov, proizvaja večje količine nekega drugega sekundarnega

metabolita. Tako se na primer proizvodnja aktinorodina poveča za 1,6–3-krat, če je sev odporen na gentamicin, rifampin ali streptomycin. Še za 1,7–2,5-krat se poveča proizvodnja, če je sev odporen na streptomycin in gentamicin ali streptomycin in rifampin. V primerjavi z divjim tipom pa sev, odporen na vse tri antibiotike, proizvaja kar 48-krat več aktinorodina (Hu in Ochi, 2001). Podobne poskuse je napravil tudi Tamehiro in sod. (2003). Z odpornostjo na streptomycin, gentamicin in rifampin je dvignil produkcijo salinomicina za 2,3-krat.

Posebni okoljski pogoji, toksični za večino celic, a netoksični za manjšino, se uporabljajo za bogatitev celične populacije s spremenjenim fenotipom, ki pogosto vpliva tudi na biosintezo zelenega metabolita. Takšni selekcijski postopki se imenujejo bogatitveni postopki. Razviti so na podlagi razumevanja celičnega metabolizma in zelenega biosinteze produkta (Queener in Lively, 1986).

#### 2.5.1.2 Mutageneza

Mutacija je trajna sprememba enega ali več nukleotidov v DNA verigi. V večini primerov so mutacije škodljive, vendar nekatere omogočijo organizmu boljše prilagajanje okolju (Parekh in sod., 2000).

Mutageneza je najbolj neposreden in najcenejši postopek izboljšanja industrijskih mikroorganizmov (Queener in Lively, 1986). Je tudi najbolj preprosta: ni potrebno veliko znanja o genetiki in fiziologiji biosinteznih poti delovnega mikroorganizma, ki so vpleteni v biosintezo zelenega produkta (Baltz, 1986a). Za izboljšano produkcijo industrijskih sevov streptomycet se uporablja kemijsko ali radiacijsko inducirana mutageneza (Kieser in sod., 2000). Izbira primerne mutagena in njegove količine je bistvenega pomena za uspeh. Za vsak mutagen in organizem je potrebno ovrednotiti primernost mutagenega sredstva in optimizirati koncentracije mutagena, čas izpostavitve in pogoje kultivacije, ki dajejo največji donos (Queener in Lively, 1986).

Stopnja spontanih mutacij je navadno 1 od  $10^7$  ali  $10^6$ . Pojavljajo se vsi tipi mutacij: insercije, delecije, transverzije, tranzicije, premiki bralnega okvirja... Z uporabo mutagenih sredstev lahko frekvenco mutacij povečamo na 1 od  $10^5$  -  $10^3$  (Crueger in Crueger, 1990).

Glavni cilj naključnih mutacij je povečanje frekvence zelenih mutacij, obenem pa zmanjšati frekvence ostalih negativnih mutacij, ki bi negativno vplivale na donos ciljnega metabolita. Za pridobitev naključnih mutacij se navadno uporabljajo fizikalna in kemijska mutagena sredstva, ko so npr. UV svetloba, hidroksilamin, etil metansulfonat, metil metansulfonat (Baltz, 1986b).

Preglednica 3 : Vrste mutagenih sredstev in njihovo delovanje (Parekh in sod., 2000)

Mutageno sredstvo	Povzročena mutacija	Učinek na DNA
Radiacija		
X-žarki, gama žarki	Prelomi DNA	Delecije, strukturne spremembe
UV žarki	Tvorba pirimidinskih dimerov	Transverzije, delecije, premik bralnega okvirja
Kemikalije		
5-Bromouracil	Napačno parjenje baz	Tranzicije
Hidroksilamin	Deaminacija citozina	Tranzicije
Etil metansulfonat	Alkilacija citozina in adenina	Tranzicije
Etidijev bromid	Interkalacija med dvema bazama	Premik bralnega okvirja
Biološki dejavniki		
Fagi, plazmidi	Zamenjave baz, lomi DNK	Delecije, insercije, podvajanje

Ko s pomočjo postopka selekcije in mutageneze pridobimo z mutacijo izboljšan sev, ga uporabimo kot izhodni sev v novem ciklu selekcije in mutageneze (Parekh in sod., 2000). Pridobljen sev, ki kaže povečan donos, se podrobno testira in statistično ovrednoti. Postopek mutageneze je kontinuiran proces, ki se ga najprej uporablja za doseganje večjega donosa, nato pa se z njim vzdržuje selekcijski pritisk na seve.

### 2.5.1.3 Rekombinacija

Uporaba naravnega križanja (natural mating) ali fuzije protoplastov za kombiniranje zelenih genov iz različnih mutiranih sevov je bila uspešna le poredko, pa še te podatki so težko dostopni zaradi industrijskih skrivnosti (Kieser in sod., 2000). Fuzija protoplastov je vsestranska tehnika za indukcijo rekombinacije. Veliko se uporablja za industrijske mikroorganizme. Zahteva natančne postopke za nastanek protoplastov, fuzijo protoplastov in za regeneracijo celic (Matsushima in Baltz, 1986). Genski inženiring se uspešno uporablja za izboljšanje produkcije primarnih metabolitov in ekstracelularnih encimov, prekomerna produkcija sekundarnih encimov pa je veliko bolj kompleksna zaradi kompleksne in večslojne celične regulacije diferenciacije in produkcije sekundarnih encimov (Parekh in sod., 2000).

Ena od strategij za izboljšanje produktivnosti uporabnih produktov z genskim inženirstvom je povečanje ekspresije ključnih biosinteznih in regulatornih genov. Vendar ima ta strategija lahko šibko točko, saj prehitro izražanje sekundarnih metabolitov ali proteinov zavre rast celic in posledično količino zelenega produkta. Zato je potrebno razviti regulatorni sistem, ki bo zaviral ekspresijo tarčnih genov, dokler celice ne dosežejo pravšnje gostote, tedaj pa bo vključil ekspresijo genov (Herai in sod., 2004).

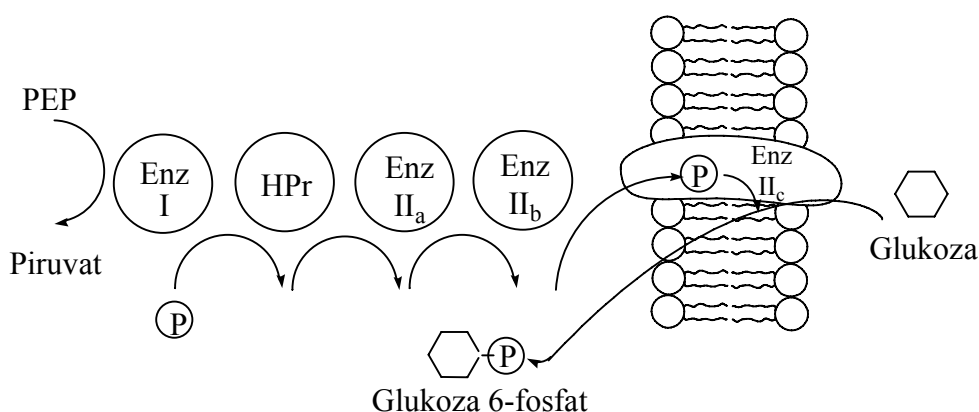
Z povečanjem ekspresije genov *pcbC* (izopenicilin-N-sintaza) in *pcbDE* (aciltransferaza) pri sevu *Penicillium chrysogenum* povečamo donos penicilina za 40 % v primerjavi z divjim tipom (Nielsen, 1998).

#### 2.5.1.4 Katabolična represija

Katabolična represija je v naravi široko razširjen pojav. Lahko bi ga definirali kot represijo encimske aktivnosti v prisotnosti razgradnjega produkta (katabolita). Čeprav je to lahko kateri koli razgradnji produkt, je večino zanimanja pritegnil mehanizem glukozne represije (Kwakman in Postma, 1994).

Bakterije bodo preferenčno razgradile heksoze, če rastejo v okolju z različnimi viri ogljika. Če je prisotna glukoza, jo bodo bakterije prednostno uporabile. Pojav se imenuje glukoza represija. Glukoza z represijo transkripcije operonov (kot so *lac*, *gal* in *ara*) prepreči uporabo alternativnih virov ogljika (Lewin, 2004). Študije so bile napravljene tako na kvasovkah (*Saccharomyces cerevisiae*), na po Gramu negativnih bakterijah (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) in na po Gramu pozitivnih bakterijah (*Bacillus subtilis*, *Streptomyces coelicolor*) (Kwakman in Postma, 1994).

Skupinska translokacija je transportni proces, pri katerem se pri prehodu skozi membrano transportirana molekula kemijsko spremeni. Pri prehodu skozi membrano se monosaharidi glukoza, manoza in fruktoza fosforilirajo s fosfotransferaznim sistemom (PTS) (slika 12).



Slika 12: Mehanizem fosfotransferaznega sistema (PTS) pri *Escherichii coli* (Madigan in sod., 2003)

Raziskave so pokazale, da je encim streptomocet Iia (imenovan tudi Iia<sup>Cr</sup>) močno podoben encimu Iia pri *E.coli* (imenovan tudi Iia<sup>Glc</sup>). Fosfotransferazi PTS sistema encim I in HPr fosforilirata encim Iia (Kamionka in sod., 2002). Fosforiliran encim Iia<sup>Glc</sup> fosforilira glukozo. Nefosforiliran Iia<sup>Glc</sup> inhibira katabolične encime in permeaze za sladkorje. Ker je Iia<sup>Glc</sup> defosforiliran, ne more stimulirati adenilat-ciklaze in celična koncentracija cAMP ostane nizka. Pomanjkanje cAMP ne more aktivirati transkripcijskega dejavnika CAP, ki je globalni aktivator genov pod katabolično kontrolo (Kamionka in sod., 2002).

Hkratna izraba različnih substratov bi povečala možnost navzkrižne inhibicije (intermediati ene poti lahko vplivajo na encime druge poti), zaradi dodatnih metabolnih zank se kakšen substrat lahko spremeni v produkt, dodatni encimi bi povzročili gnečo v citoplazmi, dodatne poti bi lahko vplivale na razmerja ključnih intermediatov, tudi dodatni transportni proteini bi povzročili gnečo v membrani.

### 2.5.1.5 Toksični metabolitični analogi

Namen uporabe toksičnih metabolitičnih analogov je inhibicija encima, ki je nujen za preživetje celice in je vključen v biosintezno pot ciljnega metabolita. Celice, ki bi imele odpornost na večje koncentracije takšnega analoga, naj bi prekomerno izražale gena za encim. To pa bi pomenilo povečan pretok metabolitov preko te biosintezne poti, kar bi lahko pozitivno vplivalo na biosintezo ciljnega metabolita (Parekh in sod., 2000).

Poleg tega lahko z dodatkom analogov snovi, ki regulirajo lastno sintezo, dobimo mutanto brez mehanizma s povratno zanko, ki tvori večje količine metabolitov. Primer so biosinteza aminokislin in vitaminov (Queener in Lively, 1986).

## 2.6 PRISTOPI ZA IZBOLJŠANJE DONOSA SPOJINE SBR0501

Kirn (2005) je pokazal, da je za produkcijo spojine SBR0501 najboljši vir ogljika sojino olje ali linolna kislina. V tej nalogi smo želeli preveriti vpliv večjih koncentracij sojinega olja ali linolne kisline na donos spojine SBR0501.

Procesirana maščobna kislina (linolna kislina) je prekursor ciljne spojine, zato smo z odpornostjo na povečane koncentracije linolne kisline, 2-bromoheksadekanoidske kisline in polimiksin B, poskušali povečati donos spojine SBR0501.

### SOJINO OLJE

Sojino olje je dober vir linolne kisline.

Preglednica 4: Maščobno kislinska sestava sojinega olja (O'Brien, 1998)

Maščobna kislina	%
Linolna	53,7
Oleinska	23,3
Palmitinska	10,6
Linolenska	7,6
Stearinska	4,0
Ostale skupaj	0,8

### 2.6.1 Odpornost na povečane koncentracije linolne kisline

Linolna kislina maščobna kislina in kot takšna podvržena celičnemu metabolizmu. Pri tem pa se lahko tvorijo za celico toksične spojine. Poskušali smo izolirati seve, ki bi imeli večjo odpornost na linolno kislino, saj bi tako morda v gojišče dali več linolne kisline in tako dvignili donos spojine SBR0501.

Lipidi se oksidirajo po treh različnih mehanizmih: encimska oksidacija, neencimska z radikali posredovana oksidacija in neencimska neradikalna oksidacija. Vsak tip tvori

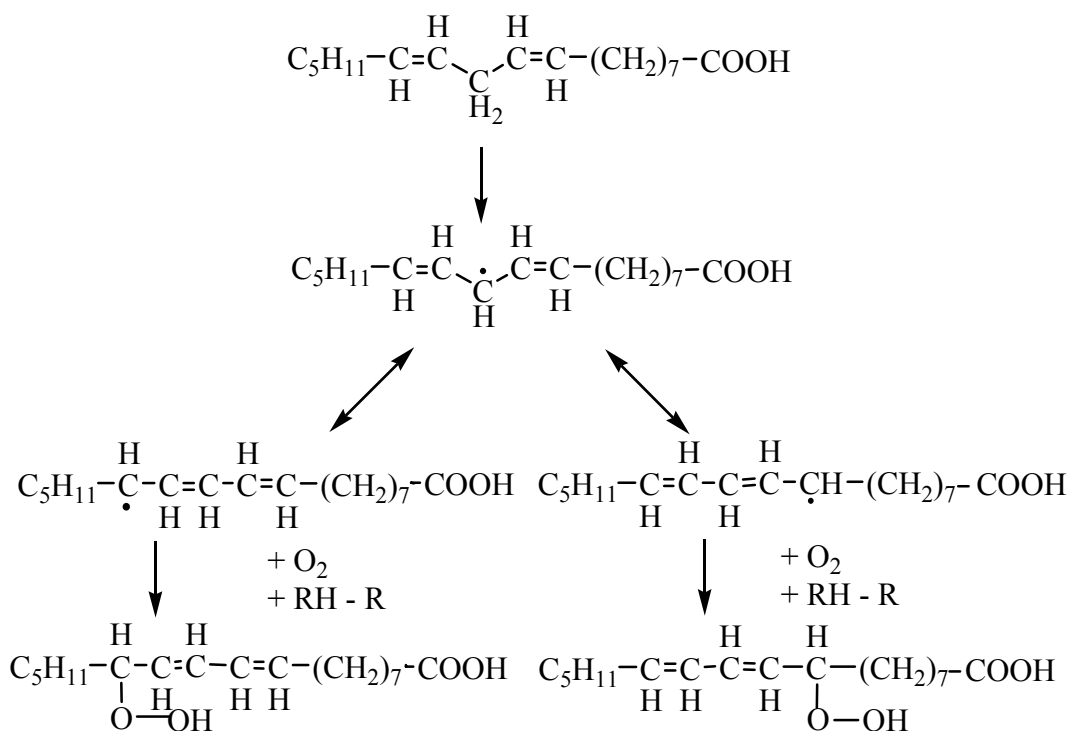
specifične produkte (Niki in sod., 2005). Nekateri izmed njih so esencialni za celico (acetil-CoA iz  $\beta$ -oksidacije), drugi pa imajo tudi toksične učinke.

### 2.6.1.1 Peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LPO) je proces, v katerem se večkratnenasičene maščobne (PUFA) pretvorijo v lipidne hidroperoksidge (LOOH), katalizirajo pa ga encimi ali prosti radikali. LOOHs se ob prisotnosti dvovalentnih ionov razgradijo v radikale, ki inducirajo nastanek širokega spektra reaktivnih komponent (Spiteller, 2001).

### Toksični produkti peroksidacije

Primarni produkti lipidne peroksidacije so hidroperoksidge (Niki in sod., 2005). Prekurzorski molekuli produktov lipidne peroksidacije linolne kisline sta 13-hidroperoksi-9,11-oktadekadienojska kislina (13-HPODE) in 9-hidroperoksi-10,12-oktadekadienojska kislina (9-HPODE). Iz njiju nastanejo razni produkti s toksičnimi učinki: 4-hidroksi-2-nonenal in 2,4-dekadienal, ki sta zelo toksična za celice sesalcev, v rastlinah 4-hidroksi-2-nonenal inhibira rast patogencev. 2-alkenali so genotoksični in inhibirajo rast gliv (Spiteller in sod., 2001). Heksanal in ostali aldehidi zmanjšajo kalitev semen (Spiteller in sod., 2001).



Slika 13: Nastanek 13-hidroperoksi-9,11-oktadekadienojske kisline (13-HPODE) in 9-hidroperoksi-10,12-oktadekadienojske kisline (9-HPODE) (Spiteller in sod., 2001)

Med ostalimi toksičnimi metaboliti so omenjeni še monoepoksidge. Monoepoksidge 9,10-cis-epoksioktadekadienojska kislina (9,10-EOA) in 12,13-cis-epoksioktadekadienojska kislina



(12,13-EOA) ter diola 9,10-dihidroksioktadekanojska kislina (9,10-DHOA) in 12,13-dihidroksioktadekanojska kislina (12,13-DHOA) inhibirajo prenos elektronov v transportni verigi (Mitchell in sod., 2002).

Monoepoksidi linolne kisline se tvorijo z lipidno avtooksidacijo ali spontano pri reakciji OH<sup>-</sup> skupine z linolno kislino. Levkotoksin je takšen derivat linolne kisline, ki pa je toksičen, če se pretvori v levkotoksindiol. Ta negativno vpliva na transport natrija in kalija preko membrane (Stimers in sod., 1999).

### Drugi toksični vplivi linolne kisline

Med lipidno peroksidacijo nastanejo tudi aldehidi. Med količinsko najbolj zastopanimi je že omenjeni 4-hidroksi-2-nonenal. Aldehidi so zaradi velike reaktivnosti zelo toksični za celico. Reagirajo lahko z aminokislinami, peptidi in proteini. S pospešitvijo depolimeracije aktina in tubulina poškodujejo citoskelet celice. Modificirajo proteosomske proteine in s tem ovirajo razgradnjo škodljivih proteinov v celici. Zaradi svoje velike reaktivnosti z membranami jim spremenijo strukturo in fizikalno-kemijske lastnosti. Povečajo permeabilnost membrane in povzročijo razpad celičnih komunikacij (Davydov in sod., 2004).

Možno je tudi, da so nenasičene maščobne kisline toksične za celice v fazi pospešene rasti. Dodatek nenasičenih maščobnih kislin v gojišče pomeni povečano vgraditev teh gradnikov v celično membrano, ki zaradi tega postane zelo nestabilna (Carson in Daneo-Moore, 1980).

## 2.6.2 Odpornost na povečane koncentracije 2-bromoheksadekanojske kisline

2-bromoheksadekanojska kislina (2-BrP) je analog palmitata (Webb in sod., 2000). Inhibira celično rast v mnogo manjših koncentracijah kot linolna kislina in če bi izolirali sev, odporen na večje koncentracije 2-BrP, predpostavljamo, da bi lahko povečali odpornost tudi na linolno kislino.

### 2.6.2.1 Delovanje $\alpha$ -bromomaščobnih kislin kot model delovanja

$\alpha$ -bromomaščobne kisline imajo skelet iz ogljikovih atomov, na katerega imajo pripeto -COOH skupino in bromov (fluorov) atom na  $\alpha$ -C atomu. Z vezavo z acil-CoA-sintetazo preprečujejo tvorbo acil-CoA derivatov (Grillo in sod., 2001). Sevi, ki bi rasli ob povečanih koncentracijah  $\alpha$ -bromo analogov maščobnih kislin, bi morali imeti povečane koncentracije encima acil-CoA-sintetaze. Tako bi lahko hitreje metabolizirali maščobne kisline, ki so prekurzorji ciljnega metabolita.

## 2.6.3 Odpornost na povečane koncentracije polimiksina B

Tarča delovanja polimiksina B je celična membrana. S spremembo lastnosti celične membrane bi lahko vplivali na odpornost na linolno kislino.

### 2.6.3.1 Toksičnost polimiksina B

Polimiksini so neribosomsko sintetizirani peptidi po Gramu-pozitivnih bakterij. Čeprav so jih odkrili že pred več kot 50 leti, način njihovega delovanja še ni popolnoma pojasnjen. Številne študije pa nakazujejo njihovo delovanje na bakterijske citoplazmatske membrane (Clausell in sod., 2003).

Zmanjšana prepustnost membran se kaže kot povečana odpornost na različne antibiotike. Polikationski antibiotiki, kot je polimiksin B, povečajo prepustnost membrane (Rahaman in sod., 1998). Vendar pa novejšje študije izključujejo prepustnost membran kot način delovanja teh antibiotikov. Osnova primarnega stresa povzročenegega z antibiotiki naj bi bila sposobnost peptidov (antibiotikov) tvorbe povezav med fosfolipidi. Kationski polimiksini imajo veliko afiniteto do kislih fosfolipidov. Tvorile naj bi se stabilne povezave med vezikli anionskih fosfolipidov, med temi povezavami pa je hitra izmenjava fosfolipidov. Ta izmenjava je zelo selektivna, saj lahko prehajajo le monoanionski fosfolipidi, ostale komponente pa ne (Clausell in sod., 2003).

Polimiksin ima 5 pozitivnih nabojev, s katerimi se lahko poveže z negativnimi naboji dela celične membrane. Ko je dosežena kritična koncentracija polimiksina na membrani, naj bi se tvorile začasne odprtine/pore v dvosloju, skozi katere lahko nato polimiksin preide v celico (Gutsmann in sod., 2005). Zato predpostavljamo, da bi lahko mutante odporne na manjše koncentracije polimiksina B imele neposredno, hitro in selektivno izmenjavo fosfolipidov brez fuzij. Večje koncentracije pa naj bi inducirale fuzijo membran, pri tem pa pride do izgube vodne faze.

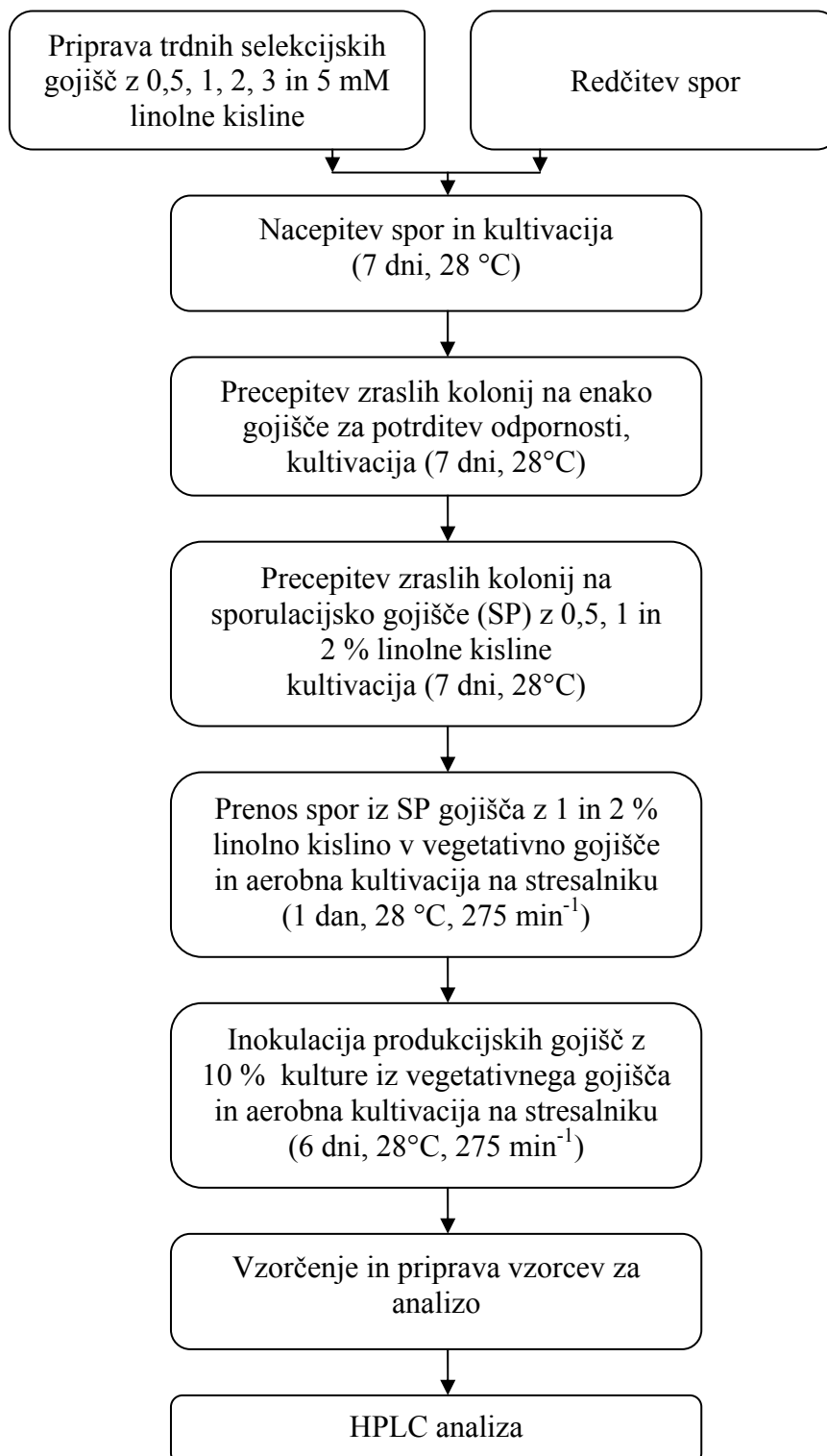
Pri manjših koncentracijah (2 mol %) se pojavijo posamezni kontakti med vezikli, pri večjih koncentracijah (nad 2 mol %) pa pride do fuzije membran. Predpostavljamo, da pri večjih koncentracijah polimiksin B globlje prodre v lipidni dvosloj (Clausell in sod., 2003).

### 2.6.4 Odpornost na 2-deoksiglukozo

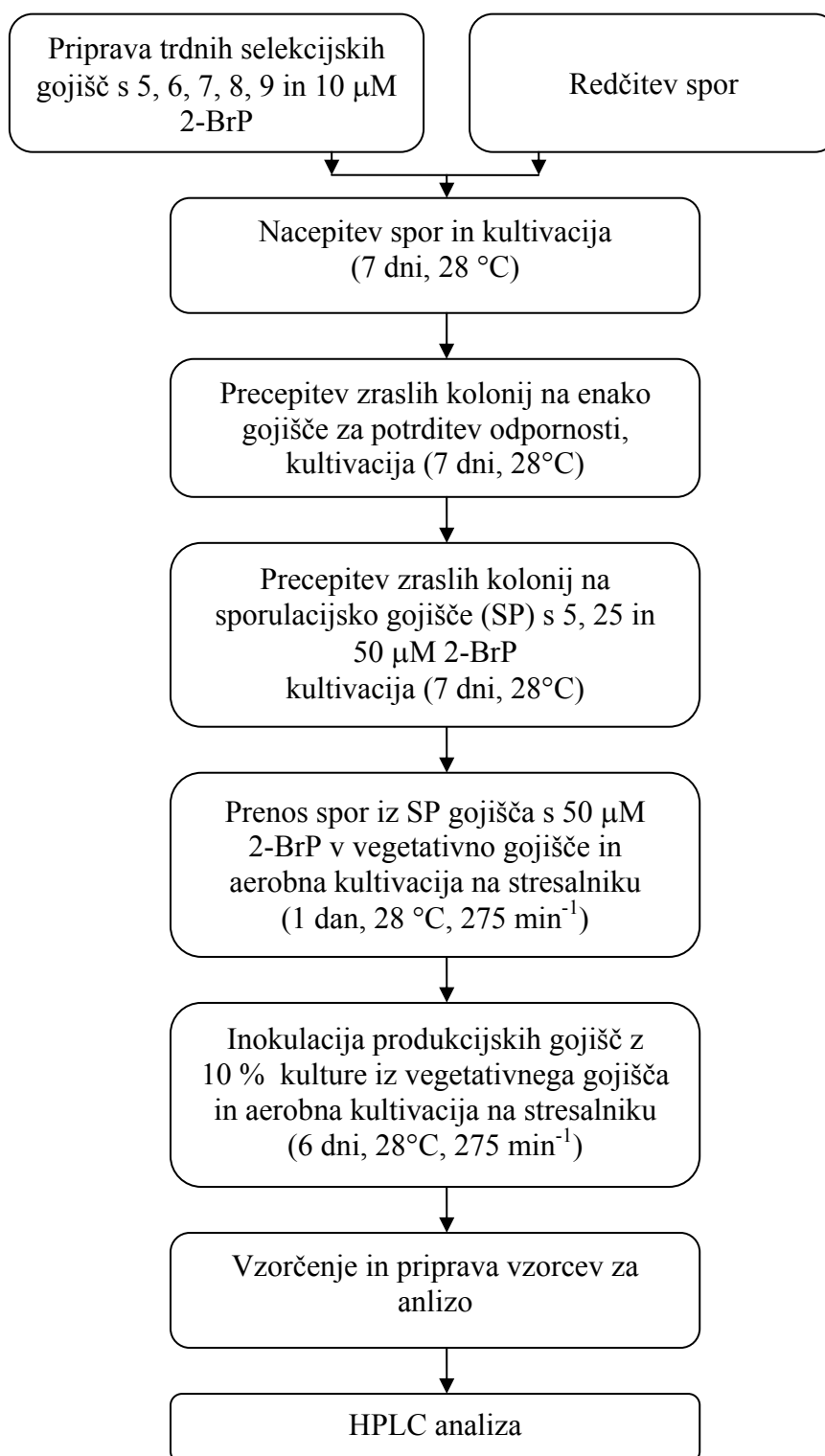
Glukoza preprečuje uporabo alternativnih virov ogljika s sistemom glukozne represije. Tako lahko bakterije uporabljajo linolno kislino šele, ko zmanjka glukoze (ali kakšnega drugega preferenčnega vira ogljika (C)). Linolna kislina se bo tedaj uporabljala kot vir C in ne kot prekursor ciljnega metabolita. 2-deoksiglukoza (DOG) je glukozni analog, ki se ne metabolizira, a še vedno aktivira glukozno represijo. Med sevi, ki bi bili odporni na povečane koncentracije DOG, bi lahko izolirali mutante ki ne podležejo katabolični represiji z glukozo. Verjetno ne bi imeli sistema glukozne represije, ali pa bi izgubili transportni sistem za prenos DOG v celico (Hodgson, 1982).

### 3 MATERIALI IN METODE

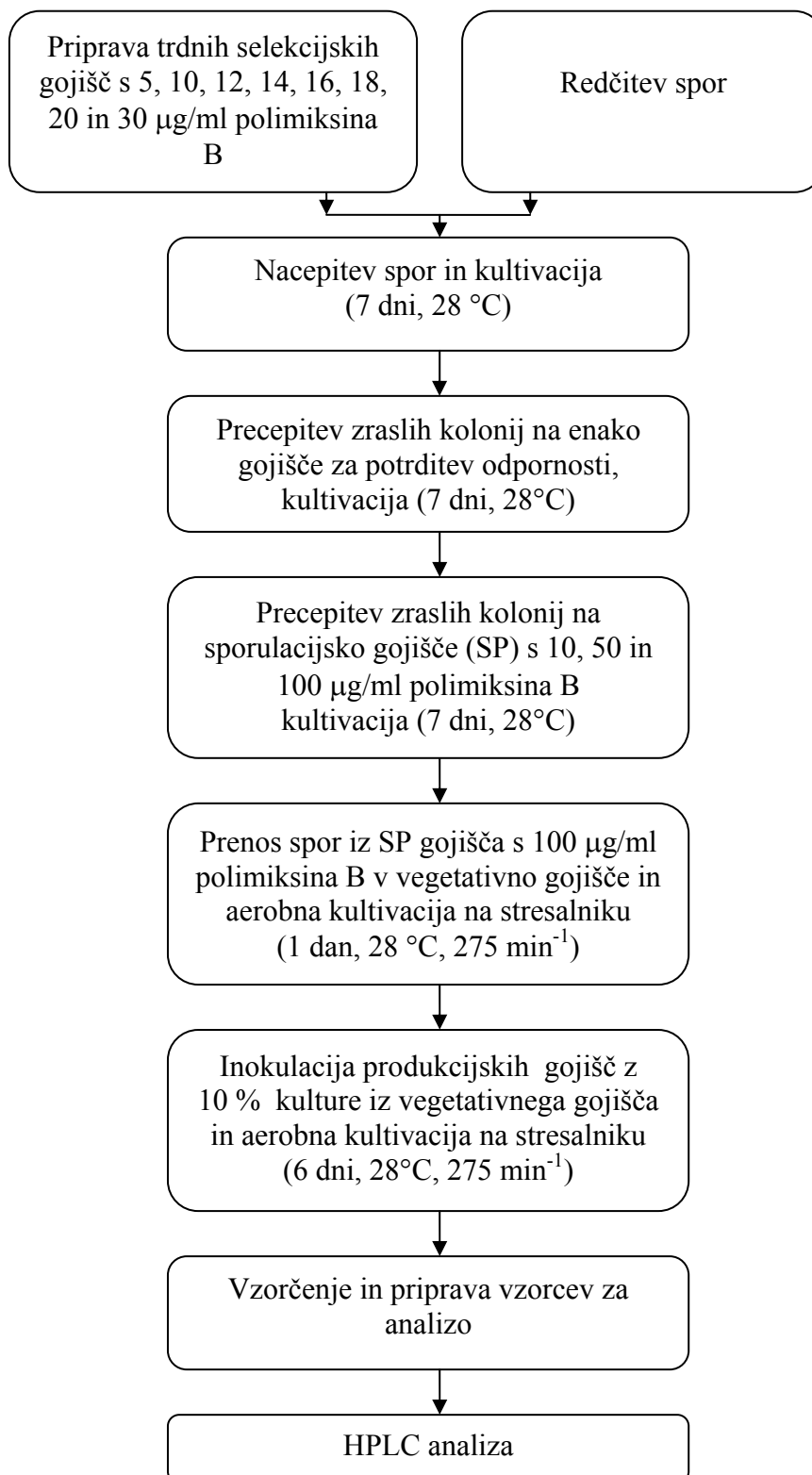
#### 3.1 DELOVNI POSTOPKI



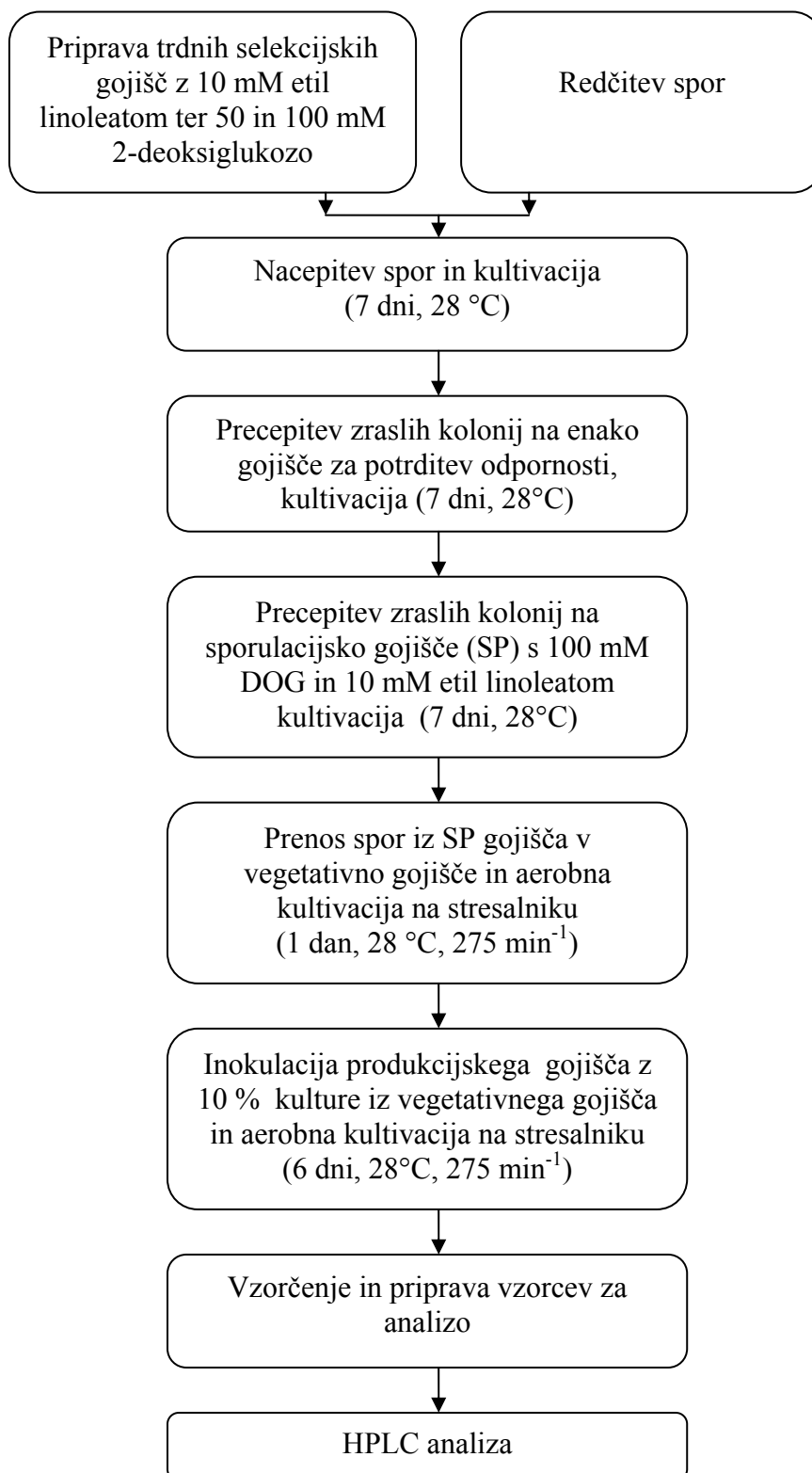
Slika 14: Hodogram poteka eksperimentalnega dela s kulturami odpornimi na linolno kislino



Slika 15: Hodogram poteka eksperimentalnega dela s kulturami odpornimi na 2-bromoheksadekanojsko kislino



Slika 16: Hodogram poteka eksperimentalnega dela s kulturami odpornimi na polimiksin B



Slika 17: Hodogram poteka eksperimentalnega dela s kulturami odpornimi na 2-deoksiglukozo

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Izolati

Izolat bakterij rodu *Streptomyces* sp. K343-1 smo dobili iz zbirke mikroorganizmov tovarne zdravil Krka, d.d., Novo mesto

### 3.2.2 Gojišča

#### 3.2.2.1 Trdno minimalno gojišče

Preglednica 5: Sestava trdnega minimalnega gojišča NMMB (Hodgson, 1982)

Sestavina	Koncentracija	Proizvajalec	Čistost
glicerol	10 mM		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/l	MERCK, Nemčija	p.a.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/l	MERCK, Nemčija	p.a.
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l	SIGMA, Nemčija	min. 99,0 %
FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,01g/l	KEMIKA, Hrvaška	p.a.
1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pufer (5:7)	15 ml/l		
bakteriološki agar	20 g/l	BIOLIFE, Italija	
dH <sub>2</sub> O	dopolnimo do skupnega volumna 1l		

#### 3.2.2.2 Trdno sporulacijsko gojišče

Preglednica 6: Sestava trdnega sporulacijskega gojišča - modificirano ISP4 gojišče (Atlas, 1993)

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
koruzni škrob	30	Cerestar
dekstrin*	40	Fidelinka
sojina moka*	30	Carbill Foods
amonijev sulfat	2	Merck
kalcijev karbonat	6	Kalcit
bakteriološki agar	15	Biolife
pitna voda	dopolnimo do skupnega volumna 1l	

\* dekstrin in sojina moka sta dodana ISP4 gojišču

### 3.2.2.3 Vegetativno gojišče

Preglednica 7: Sestava vegetativnega gojišča - modificirano obogateno gojišče z glicerolom (Atlas, 1993)

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
sojina moka*	10	Carbill Foods
glicerol	20	Pan Century Oleochemicals
kvasni ekstrakt	5	Sigma
pitna voda	dopolnimo do skupnega volumna 1l	

\* sojino moko smo uporabili namesto peptona

### 3.2.2.4 Producersko gojišče

Preglednica 8: Sestava producerskega gojišča - modificirano obogateno gojišče z glicerolom (Atlas, 1993)

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
sojin lecitin*	14	Degussa
glicerol	20	Pan Century Oleochemicals
sojina moka**	32	Carbill Foods
kalcijev karbonat	2	Kalcit
MES hidrat (4-morfolinetansulfonična kislina)	2	Sigma
sojino olje*	10/30	Cognis
linolna kislina	10/30	Cognis
pitna voda	dopolnimo do skupnega volumna 1l	

\* sojino olje in sojin lecitin sta dodana gojišču z glicerolom

\*\* sojino moko smo uporabili namesto peptona

## 3.2.3 Raztopine in pufri

### 3.2.3.1 Priprava 1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ : $\text{K}_2\text{HPO}_4$ pufra (5:7)

V steklenico zatehtamo 69 g in dopolnimo do 500 ml z destilirano vodo. V drugo steklenico zatehtamo 87 g in dopolnimo do 500 ml z destilirano vodo.

V gojišče dodajamo v razmerju 5:7 (6,25 ml raztopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 8,75 ml raztopine  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  na liter gojišča)

### 3.2.3.2 Priprava založne raztopine emulgatorja (5 g/100 ml)

V erlernmajerjevo steklenico zatehtamo 5 g emulgatorja in dopolnimo do 100 ml z destilirano vodo. Na magnetnem mešalu mešamo, dokler se emulgator ne raztopi. Avtoklaviramo 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bara.



### 3.2.3.3 Priprava mobilne faze za HPLC

Acetonitril : 0,1 % (v/v) raztopina fosforne kisline (70:30):

V merilni valj odmerimo 300 ml ddH<sub>2</sub>O, 300 µl ortofosforne kisline (85 %) in dopolnimo z acetonitrilom do 1 l. Filtriramo skozi membranski filter 0,45 µm.

### 3.2.3.4 Priprava založne raztopine polimiksina B (1 mg/ml)

Raztopino pripravimo v falkon kiveti, kamor zatehtamo 10 mg polimiksin B sulfata (Sigma), ga raztopimo v 10 ml dH<sub>2</sub>O in prefiltriramo skozi 0,2 µm membranski filter.

### 3.2.3.5 Priprava založne raztopine 2-bromoheksadekanojske kisline (1 mM)

Raztopino pripravimo v falkon kiveti. Zatehtamo 1 mg 2-bromoheksadekanojske kisline (97 %, Aldrich) in jo raztopimo v 3 ml DMSO. Raztopino 2-bromoheksadekanojske kisline smo dodali v gojišče v eno odstotni koncentraciji (v/v), ki še ni toksična.

### 3.2.3.6 Priprava založne raztopine 2-DOG (2 mM)

Zatehtamo 0,656 g 2-DOG (Acros Organics) in jo raztopimo v 2 ml destilirane vode.

Pri eksperimentalnemu delu smo uporabljali še naslednje reagente:

- Metanol (p.a., Merck)
- DMSO (min. 99,9 %, Sigma)
- Acetonitril (HPLC kvaliteta, J. T. Baker)
- Emulgator Triton X-100 (Merck)
- Emulgator Tween 80 (Merck)
- Emulgator Pemulen TR1 (BF Goodrich)
- Etil linoleat (Sigma)

### 3.2.4 Oprema

Preglednica 9: Seznam laboratorijske opreme

<b>Aparatura</b>	<b>Oznaka modela</b>	<b>Proizvajalec</b>
avtoklav	SU 300	Sutjeska, Srbija in Črna gora
avtomatske pipete	P1, P10, P100, P200, P1000	Gilson, Francija
brezprašna komora	PIO SMBC 122	Iskra, Slovenija
centrifuga	5415C	Eppendorf, Nemčija
digestorij		
filtrirna naprava		Sartorius, Nemčija
hladilnik	SK 405	LTH, Slovenija
inkubator		Sutjeska, Srbija in Črna gora
magnetno mešalo	RH basic 2	IKA Works, Brazilija
mikrovalovna pečica		Sanyo
pH meter	Sevenmulti	Mettler Toledo, Švica
sistem HPLC		Thermo Separation Products
stresalnik	Vrvi-403	Tehtnica, Slovenija
sušilnik	SO-250S	Elektromedica, Slovenija
analitska tehtnica	Sartorius, analytic	Sartorius, Nemčija
tehtnica	Sartorius, excellence	Sartorius, Nemčija
vakuumska črpalka	Typ.1.20 00 02	Veb Reglerwerk, Nemčija
vodna kopel		Heto, Danska
vrtničnik	Vibromix 104 EV	Tehtnica, Slovenija
zmrzovalnik		LTH, Slovenija

### 3.2.5 Steklovina in potrošni material

- Čaše
- Epruvete
- Erlenmajerjeve steklenice (250, 500, 1000 ml)
- Falkon kivete (12 in 50 ml)
- Merilni valji
- Nastavki za pipete
- Petrijevke
- Steklenice
- Cevke za prenos (Transfertubes) (Spectrum, ZDA)
- Viale (Thermo Separation Products)
- Membranski filtri (Millipore, Irska)

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Priprava gojišč

##### 3.3.1.1 Trdno selekcijsko gojišče

Zatehtali smo vse sestavine (točka 3.2.2.1) razen glicerola in agarja, dodali destilirano vodo in mešali na magnetnem mešalu. Po dodatku agarja smo gojišče sterilizirali. Posebej smo sterilizirali glicerol, ki smo ga po sterilizaciji v brezprašni komori dodali v ohlajeno gojišče, premešali in razlili na petrijeve plošče. Po dodatku glicerola smo dodali še različne inhibitorje in po potrebi emulgator.

##### 3.3.1.2 Trdno sporulacijsko gojišče

Vse sestavine (točka 3.2.2.2) razen agarja smo zatehtali, dodali vodovodno vodo in segrevali do 85 °C ob mešanju na magnetnem mešalu. Ko je temperatura dosegla 85 °C smo prestavili na navadno mešalo (brez segrevanja) ter počakali, da se je gojišče ohladilo. Dodali smo agar, premešali, da se je raztopil, in sterilizirali. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili in v brezprašni komori razlili na petrijeve plošče. Po sterilizaciji smo v gojišče dodali različne inhibitorje in po potrebi emulgator.

##### 3.3.1.3 Vegetativno gojišče za pripravo cepiva

Glicerol smo zatehtali v stekleno čašo, dodali vodovodno vodo ter ob segrevanju mešali, dokler se glicerol ni raztopil. Med mešanjem smo počasi dodali sojino moko in kvasni ekstrakt. Ko je bilo gojišče homogeno, smo uravnali pH na 7,0. Potrebne alikvote (5 ml) smo odpipetirali v falkon kivete. Na falkon kivete smo z gunicami pričvrstili krpice iz blaga in vse sterilizirali.

##### 3.3.1.4 Tekoče produkcijsko gojišče

V stekleno čašo smo zatehtali sojin lecitin in glicerol. Dodali smo vodovodno vodo in ob segrevanju mešali na magnetnem mešalu. Ko sta se lecitin in glicerol raztopila, smo nehali segrevati in med mešanjem počasi dodali še sojino moko, kalcijev karbonat in MES. Uravnali smo pH (7,4) ter v falkon kivete, v katere smo predhodno pipetirali ustrezne količine sojinega olja in linolne kisline, pipetirali alikvote gojišča (5 ml). Na falkon kivete smo z gunicami pričvrstili krpice iz blaga in vse sterilizirali.

Uporabljali smo dve različici produkcijskega gojišča. Prvo gojišče je vsebovalo 1 % (v/v) sojinega olja in 3 % (v/v) linolne kisline, drugo pa 3 % (v/v) sojinega olja in 1 % (v/v) linolne kisline.

Sterilizacija vseh gojišč je potekala v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bara.

### 3.3.2 Potek dela

Na selekcijsko gojišče z inhibitorjem v različnih koncentracijah smo nacepili 50  $\mu$ l spor. Po potrebi smo spore tudi desetiško redčili. Kot kontrolo smo uporabili selekcijsko gojišče brez inhibitorja. Kulture smo inkubirali pri temperaturi 28 °C. Kolonije, ki so zrastle pri največjih koncentracijah inhibitorjev smo precepili na identično selekcijsko gojišče in tako potrdili, da so selekcionirane kulture zares odporne na uporabljeno koncentracijo inhibitorja. Izbrane kolonije smo precepili na sporulacijska gojišča z inhibitorjem. Koncentracije inhibitorja so bile tokrat 5- in 10-krat večje kot v selekcijskem gojišču. Iz sporulacijskega gojišča smo spore s pomočjo cevke za prenos prenesli v vegetativno gojišče. Sledila je aerobna kultivacija na stresalniku pri temperaturi 28 °C in 275 min<sup>-1</sup>. Po 24 urni kultivaciji na vegetativnem gojišču smo inokulirali produkcijsko gojišče z 10 % kulture iz vegetativnega gojišča. Naslednjih šest dni je potekala aerobna kultivacija na stresalniku pri temperaturi 28 °C in 275 min<sup>-1</sup>. Po končani kultivaciji smo od vsake kulture vzeli tri vzorce po 0,5 ml in jih do analize shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Celotno delo s kulturami je bilo opravljeno aseptično ob gorilniku v brezprašni komori.

### 3.3.3 Priprava vzorcev za analizo

Vzorce kultur smo za analizo odmrznili na sobni temperaturi. Dodali smo jim metanol v razmerju 1:10 in ekstrahirali eno uro na sobni temperaturi. Odvzeli smo 1 ml metanolnega ekstrakta vzorca, ga prenesli v novo Eppendorfovo epruveto in centrifugirali 10 minut pri 12000 min<sup>-1</sup> (centrifuga 5415C, Eppendorf, Nemčija). Supernatant smo prenesli vialo in analizirali s HPLC napravo.

### 3.3.4 Kvantitativno ovrednotenje količine inhibitorjev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

V sistem HPLC smo vstavili kolono Inertisil ODS2 (125 mm  $\times$  4,0 mm, delci premera 5  $\mu$ m) in jo spirali z mobilno fazo. V vzorcu volumna 10  $\mu$ l, injiciranega z uporabo vzorčevalnika, smo s 6-minutno metodo pri temperaturi 50 °C in pretoku 2,0 ml/min z uporabo UV-detektorja pri 200 nm določali koncentracijo inhibitorja.

Za umerjanje opisanega analitskega postopka smo uporabili metodo zunanjih standardov, kjer je bila površina določenega vrha standardna mera za koncentracijo. Kot standard smo uporabili izolirano inhibitorno spojino izolata K343-10 (SBR0501).

## 4 REZULTATI

Skladno z delovno hipotezo smo skušali povečati donos spojine SBR0501. Z različnimi pristopi smo od aprila 2005 do oktobra 2005 poskušali izboljšati donos selekcioninih sevov streptomicet. Delo je obsegalo 562 ur.

S selekcijo smo želeli pridobiti mutante, ki bi bile odporne na povečane koncentracije linolne kisline, polimiksina B, 2-bromoheksadekanojske kisline in 2-deoksiglukoze. Omenjene substance smo dodajali v različnih koncentracijah v trdna minimalna gojišča NMMB, ugotavljali njihov vpliv na rast sevov in na končni donos spojine SBR0501.

### 4.1.1 Vpliv emulgatorja

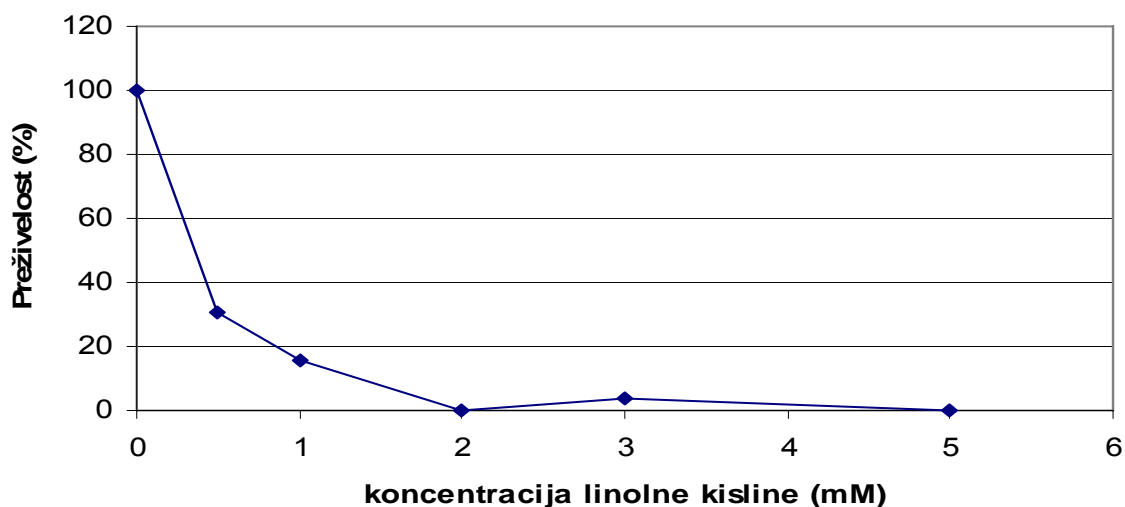
Linolna kislina je slabo topna v vodi. Za dobro porazdelitev (disperzijo) kisline v gojišču smo dodali različne emulgatorje. To so površinsko aktivne snovi, ki navadno vplivajo na strukturo in posledično tudi na delovanje celične membrane. Zato smo preverili učinek samih emulgatorjev na seve. Testirali smo tri različne emulgatorje in sicer Pemulen, Triton X-100 in Tween 80, vsakega v dodatku 0,05, 0,1 in 0,25 % (v/v). Ovrednotili smo vpliv emulgatorjev na rast ciljnega mikroorganizma na trdnem selekcijskem gojišču (Preglednica 10).

Preglednica 10: Vpliv emulgatorjev na rast sevov

emulgator \ volumski delež	0,05 %	0,1 %	0,25 %
Pemulen	preraščena plošča	posamezne kolonije	ni rasti
Triton X-100	ni rasti	ni rasti	ni rasti
Tween 80	preraščena plošča	preraščena plošča	preraščena plošča

Na podlagi rezultatov smo se odločili za uporabo Tween 80 v koncentraciji 0,25 % (v/v).

#### 4.1.2 Kultivacija na selekcijskem gojišču z linolno kislino



Slika 18: Preživelost v odvisnosti od koncentracije linolne kisline

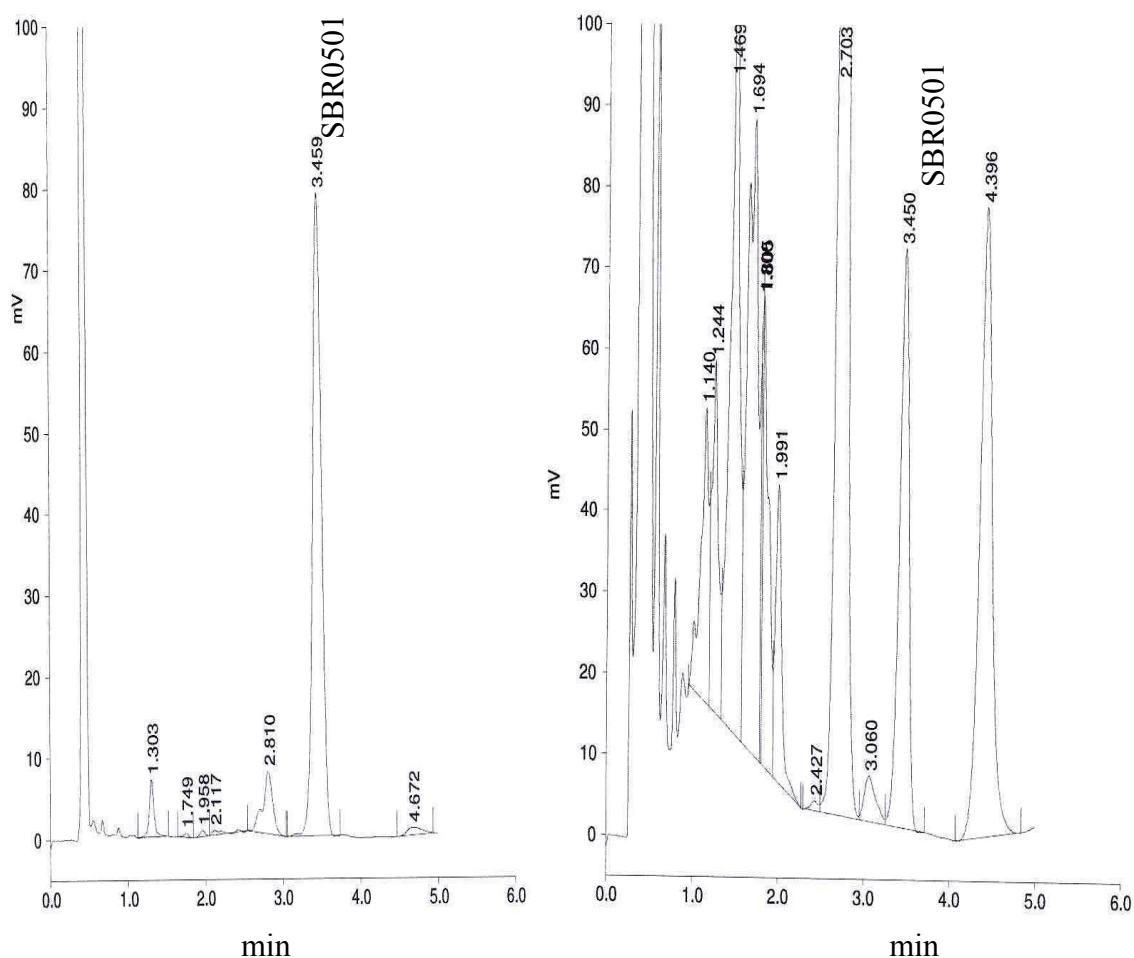
Slika 18 prikazuje vpliv koncentracije linolne kisline na preživetje seva K343-1 na trdnem selekcijskem gojišču. Na ploščah z 0,5 mM koncentracijo linolne kisline smo določili 31 odstotno preživelost. Število preživelih celic je še naprej upadalo tako pri dodatku 1 mM linolne kisline (preživelost 15 %), 2 mM linolne kisline (preživelost 0,2 %), 3 mM linolne kisline (preživelost 3,8 %) in 5 mM linolne kisline (preživelost 0,001 %).

Zrasle kolonije smo precepili na plošče z enakimi koncentracijami linolne kisline, iz katerih so bile izolirane, zato, da bi potrdili rast na tej koncentraciji. Kolonije, ki so zrasle na ploščah z 0,5 in 1 mM koncentracijo linolne kisline, so po precepitvi ponovno zrasle. Kolonije, ki smo jih izolirali na ploščah z 2 mM linolno kislino po ponovnem precepljanju niso tvorile popolnoma konfluentne rasti, kolonije s plošč s 3 mM linolno kislino so tvorile zgolj posamezne kolonije, tiste s plošč s 5 mM linolno kislino pa sploh niso zrasle.

Kolonije, ki so zrasle na trdnem selekcijskem gojišču z 1 mM in 2 mM linolno kislino, smo precepili tudi na enako gojišče brez glicerola. Te kolonije naj bi uporabljale linolno kislino kot edini vir ogljika. Dobili smo nekaj kolonij, ki smo jih ponovno precepili na enako gojišče.

### 4.1.3 Rezultati tekočinske kromatografije visoke ločljivosti

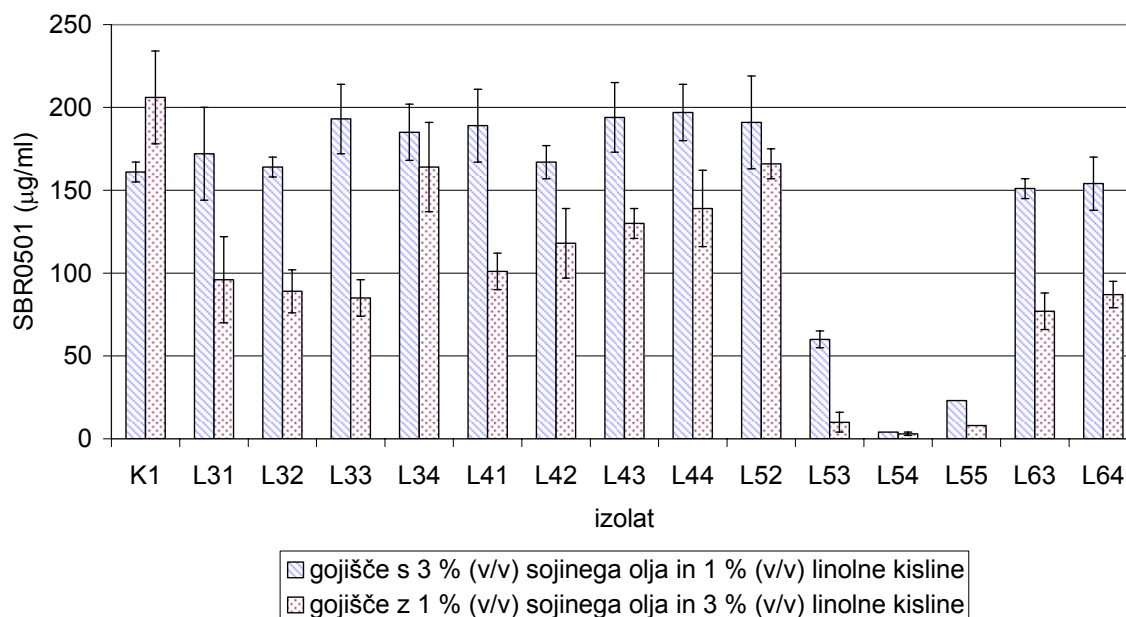
Z analizo standarda smo določili retencijski čas spojine SBR0501, ki je bil približno 3,46 minute. Na podlagi te ocene smo pri vzorcih določili temu najbližji vrh na kromatogramu in računalnik je iz površine izračunal koncentracije spojine SBR0501 v vzorcih. Na sliki 19 je na levi strani kromatogram standarda, na desni strani pa kromatogram enega izmed vzorcev.



Slika 19: HPLC kromatograma standarda (levo) in vzorca L44 (desno)

### 4.1.4 Odpornost *Streptomyces* sp. K343-1 na linolno kislino in vpliv na donos SBR0501

Pri dodatku različnih koncentracij linolne kisline v sporulacijska gojišča je bila preživelost sevov odvisna od dodane koncentracije linolne kisline. Pri dodatku 0,5 % in 1 % linolne kisline je bila preživelost 100 %, pri dodatku 2 % linolne kisline pa 53 %. Zaradi primerjave vpliva linolne kisline v sporulacijskem gojišču na donos spojine SBR0501 smo testirali izolate iz sporulacijskega gojišča z 1 in 2 % linolno kislino.



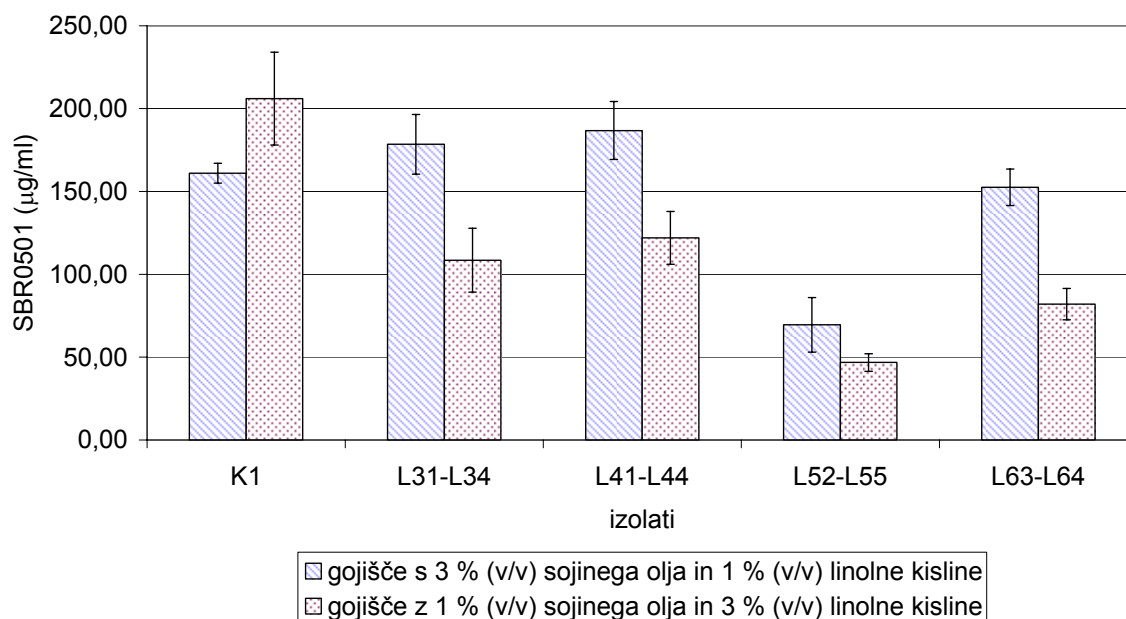
Slika 20: Donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na linolno kislino

Slika 20 prikazuje donose spojine SBR0501 posameznih sevov odpornih na linolno kislino. V preglednici 11 so naštetih dodatki v selekcijska in sporulacijska gojišča, na katerih so zrastle te sevi in na sliki 21 so sevi združeni v skupine glede na predhodno izpostavljenost linolni kislini.

Preglednica 11: Dodatki v selekcijska in sporulacijska gojišča, iz katerih smo izolirali seve

Oznaka seva	Selekcijsko gojišče		Sporulacijsko gojišče
	Linolna kislina	Glicerol	Linolna kislina
L31	1 mM	10 mM	2 %
L32	1 mM	10 mM	2 %
L33	1 mM	10 mM	1 %
L34	1 mM	10 mM	1 %
L41	1mM	/	2 %
L42	1mM	/	1 %
L43	1mM	/	1 %
L44	1mM	/	1 %
L52	2mM	10 mM	2 %
L53	2mM	10 mM	1 %
L54	2mM	10 mM	2 %
L55	2mM	10 mM	1 %
L62	2mM	/	2 %
L63	2mM	/	2 %
L64	2mM	/	2 %
K1	/	/	/



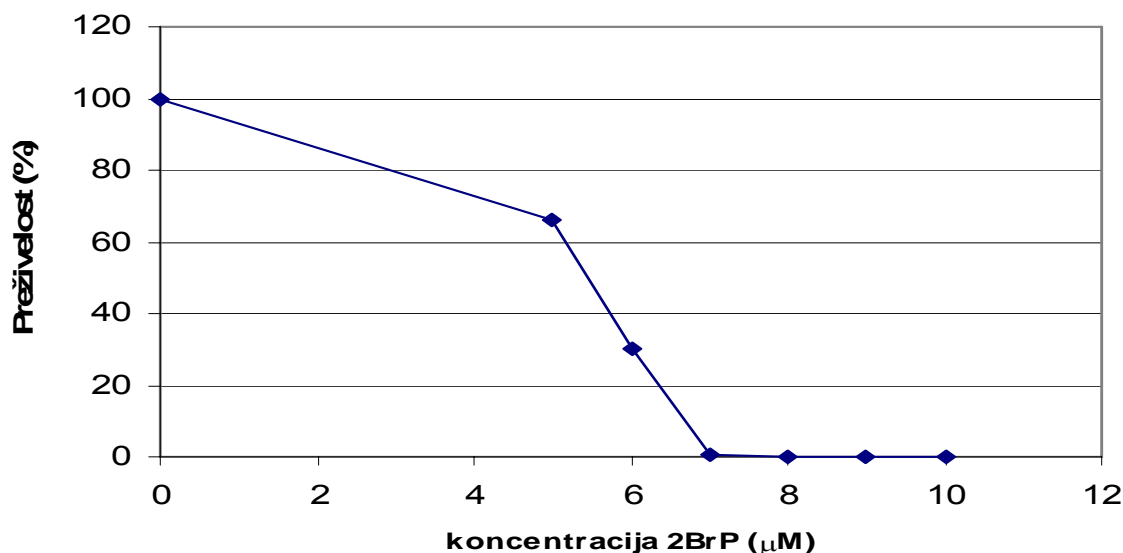


Slika 21: Povprečne vrednosti donosa spojine SBR0501 izolatov odpornih na linolno kislino

Na sliki 21 vidimo, da je v produkcijskem gojišču s 3 % (v/v) sojinega olja in 1 % (v/v) linolne kisline donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na 1 mM linolno kislino v selekcijskem gojišču v povprečju boljši kot pri kontrolnih sevih in izolatih odpornih na 2 mM linolno kislino v selekcijskem gojišču. Ob dodatku 10 mM glicerola je bil donos večji za 11 %, brez glicerola pa za 15 %. Odpornost na 2 mM linolno kislino je zmanjšala donos spojine SBR0501 in sicer za 57 % ob dodatku 10 mM glicerola in za 5 % brez dodatka glicerola v selekcijsko gojišče (Priloga A).

V produkcijskem gojišču z 1 % (v/v) sojinega olja in 3 % (v/v) linolne kisline je donos spojine SBR0501 izolatov manjši kot pri kontrolnih sevih. Pri sevih odpornih na 1 mM linolno kislino v selekcijskem gojišču z dodatkom 10 mM glicerola je bil donos manjši za 47 %, brez glicerola pa za 41 %. Odpornost na 2 mM linolno kislino v selekcijskem gojišču je zmanjšala donos za 77 % ob dodatku 10 mM glicerola in za 60 % brez dodanega glicerola (Priloga B).

#### 4.1.5 Kultivacija na selekcijskem gojišču z 2-bromoheksadekanojsko kislino

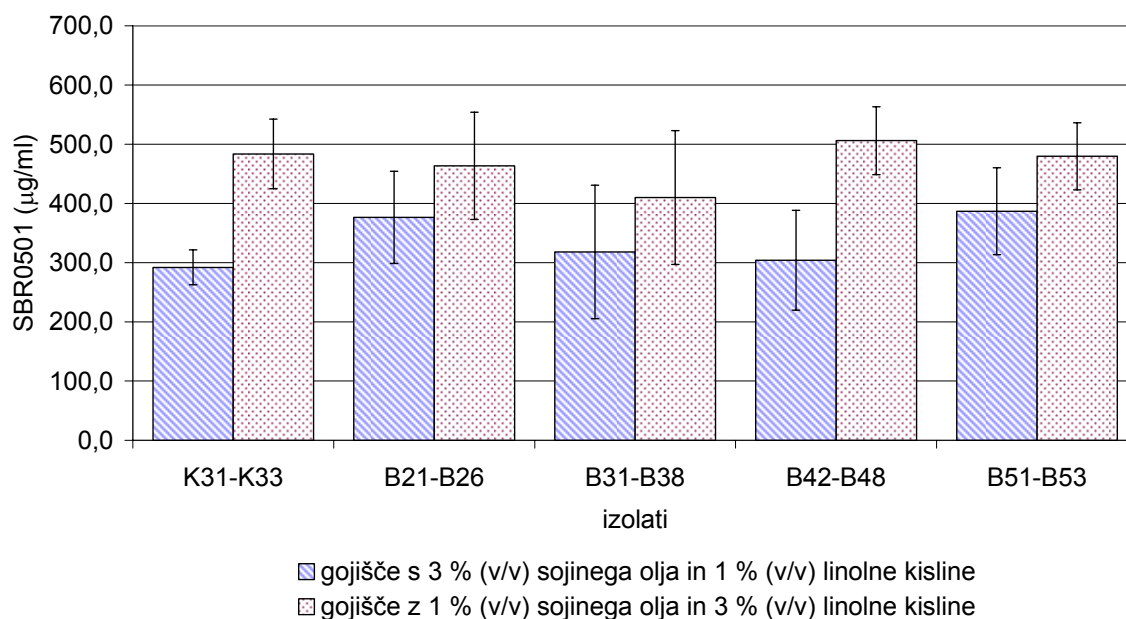


Slika 22: Preživelost v odvisnosti od koncentracije 2-BrP

Slika 22 prikazuje vpliv koncentracije 2-bromoheksadekanojske kisline (2-BrP) na preživetje sevov. 2-BrP je analog maščobne kisline, ki smo ga testirali. V koncentracijskem območju med 50  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{M}$  je bila inhibicija rasti popolna. Ugotovili smo, da 2-BrP inhibira rast v 1000-krat manjših koncentracijah kot linolna kislina. Preživelost na ploščah s 5  $\mu\text{M}$  koncentracijo 2-BrP je bila 66 % in je padala do 0,02 % pri dodatku 10  $\mu\text{M}$  2-BrP. Po precepljanju na enaka gojišča, iz katerih so bile kolonije izolirane, številne kolonije niso zrasle, podobno kot pri eksperimentu z linolno kislino. Pri ploščah s 5  $\mu\text{M}$  koncentracijo 2-BrP smo po precepljanju opazili konfluentno rast, na ploščah z 10  $\mu\text{M}$  koncentracijo 2-BrP pa le posamezne kolonije. Ocenili smo, da 5 do 8  $\mu\text{M}$  koncentracija 2-BrP na pločah omogoča izolacijo uporabnih kolonij in smo zato le te tudi dalje testirali.

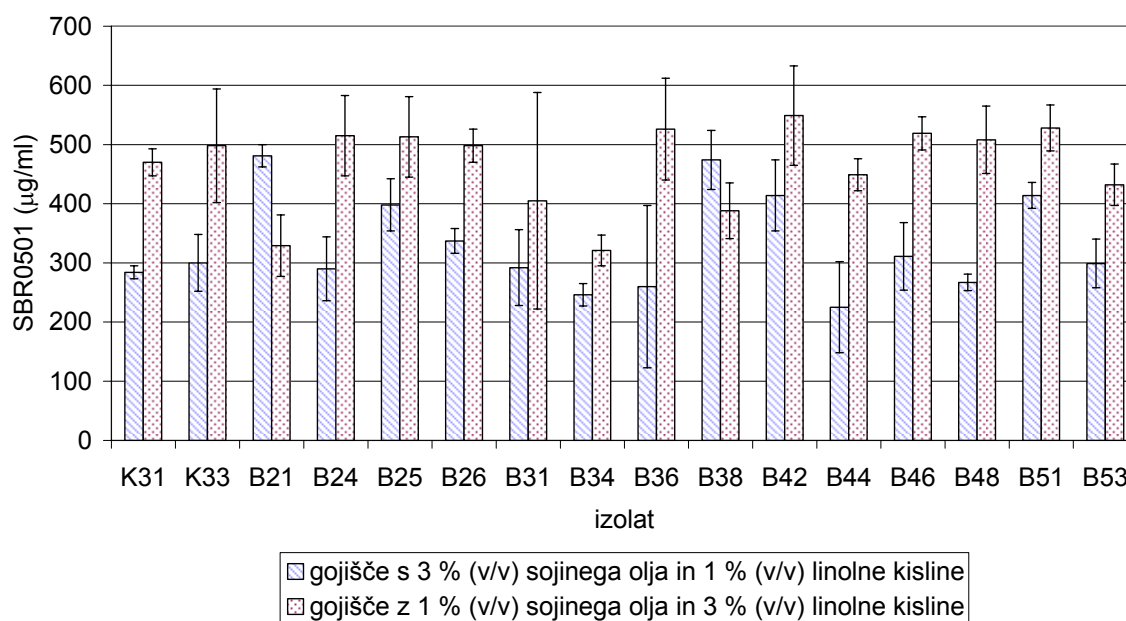
#### 4.1.6 Odpornost *Streptomyces* sp. K343-1 na 2-bromoheksadekanojsko kislino in vpliv na donos SBR0501

Na sporulacijskem gojišču s 50  $\mu\text{M}$  2-BrP so zrasli vsi sevi. Sevov, ki so zrasli na sporulacijskem gojišču z 5  $\mu\text{M}$  ali 25  $\mu\text{M}$  2-BrP, tako nismo testirali, saj naj bi bili sevi iz sporulacijskega gojišča s 50  $\mu\text{M}$  2-BrP bolj odporni na 2-BrP. Na sliki 23 so prikazani donosi spojine SBR0501 izolatov, ki so zrasli na trdnih selekcijskih gojiščih z različnimi koncentracijami 2-BrP.



Slika 23: Donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na 2-BrP

Sevi s slike 23 so združeni v skupine in prikazani na sliki 24. Seva K31 in K33 sta kontrolni in v gojišču nista imeli 2-BrP. Izolati od B21 do B26 so bili izolirani na selekcijskem gojišču s 5 µM 2-BrP, izolati od B31 do B38 na selekcijskem gojišču s 6 µM 2-BrP, izolati od B42 do B48 na selekcijskem gojišču s 7 µM 2-BrP ter izolata B51 in B53 na selekcijskem gojišču z 8 µM 2-BrP.



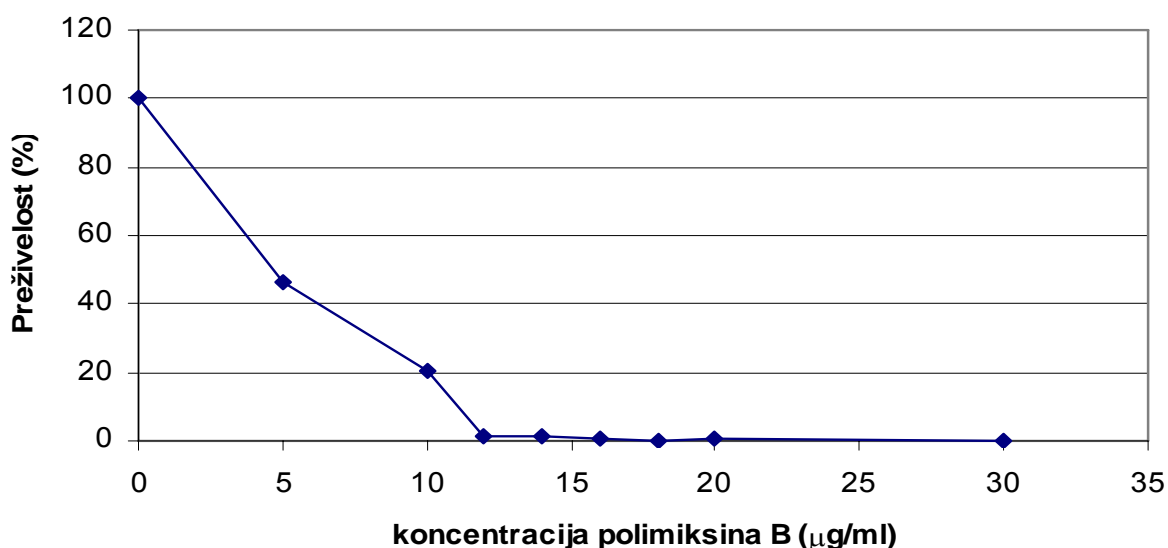
Slika 24: Povprečne vrednosti donosa spojine SBR0501 izolatov odpornih na 2-BrP

Že pri kontrolnih sevih smo opazili, da razmerje med sojinim oljem in linolno kislino vpliva na donos spojine SBR0501. Donos kontrolnih sevov je boljši v gojišču, v katerem je bilo 1 % (v/v) sojinoga olja in 3 % (v/v) linolne kisline.

V produkcijskem gojišču s 3 % (v/v) sojinoga olja in 1 % (v/v) linolne kisline (S:L=3:1) je imela večina selekcioniranih izolatov v povprečju boljši donos spojine SBR0501 od kontrolnih sevov. Pri izolatih, odpornimi na 5  $\mu\text{M}$  koncentracijo 2-BrP, je bil povprečen donos večji za 29 %, pri izolatih, odpornimi na 6  $\mu\text{M}$  koncentracijo 2-BrP, je bil večji za 9 %, pri izolatih, odpornimi na 7  $\mu\text{M}$  koncentracije 2-BrP, je bil večji za 4 %. Največji donos je bil pri izolatih, odpornimi na 8  $\mu\text{M}$  koncentracije 2-BrP, in sicer je bil od kontrolnih sevov večji za 32 % (Priloga C). Pri gojišču S:L=3:1 je povečana odpornost na 2-BrP pozitivno vplivala na donos spojine SBR0501.

Nasprotno so v produkcijskem gojišču z 1 % (v/v) sojinoga olja in 3 % (v/v) linolne kisline (S:L=1:3) imeli izolati odporni na različne koncentracije 2-BrP na selekcijskem gojišču v povprečju enak ali manjši donos kot kontrolni sevi (Priloga D). Pri izolatih, odpornimi na 5  $\mu\text{M}$  koncentracijo 2-BrP, je bil povprečen donos manjši za 4 %, pri izolatih, odpornimi na 6  $\mu\text{M}$  koncentracijo 2-BrP, je bil manjši za 15 %, pri izolatih, odpornimi na 7  $\mu\text{M}$  koncentracije 2-BrP, je bil večji za 5 % ter za 1 % manjši pri izolatih, odpornimi na 8  $\mu\text{M}$  koncentracije 2-BrP (Priloga D).

#### 4.1.7 Kultivacija na selekcijskem gojišču s polimiksinom B



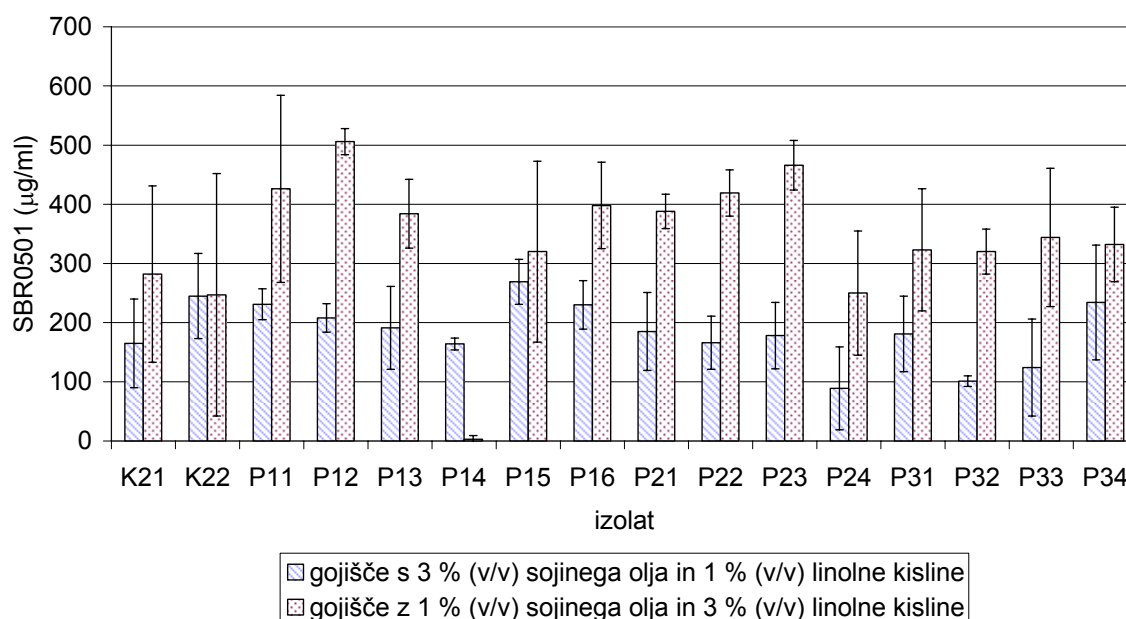
Slika 25: Preživelost v odvisnosti od koncentracije polimiksina B

Slika 25 prikazuje vpliv koncentracije polimiksina B na preživetje sevov. Polimiksin B je pri koncentraciji 5  $\mu\text{g/ml}$  na ploščah inhibiral rast 54 % sevov. Pri koncentraciji 20  $\mu\text{g/ml}$  polimiksina B je bila preživelost 0,4 odstotka, pri 30  $\mu\text{g/ml}$  pa le 0,003 %. Za nadaljnje

teste smo uporabili le seve, ki so zrasli po 5-6 dneh pri koncentracijah 10, 20 in 30  $\mu\text{g/ml}$ . Po šestem dnevu inkubacije se je namreč pojavilo mnogo majhnih kolonij, kar je verjetno posledica razgradnje polimiksina B. Za razliko od testov, pri katerih smo uporabili linolno kislino in 2-BrP, pa je bila rast vseh polimiksin B-odpornih kolonij po precepljanju na plošče z enako koncentracijo polimiksina B konfluentna, kar potrjuje, da so bile vse kolonije zares odporne na polimiksin.

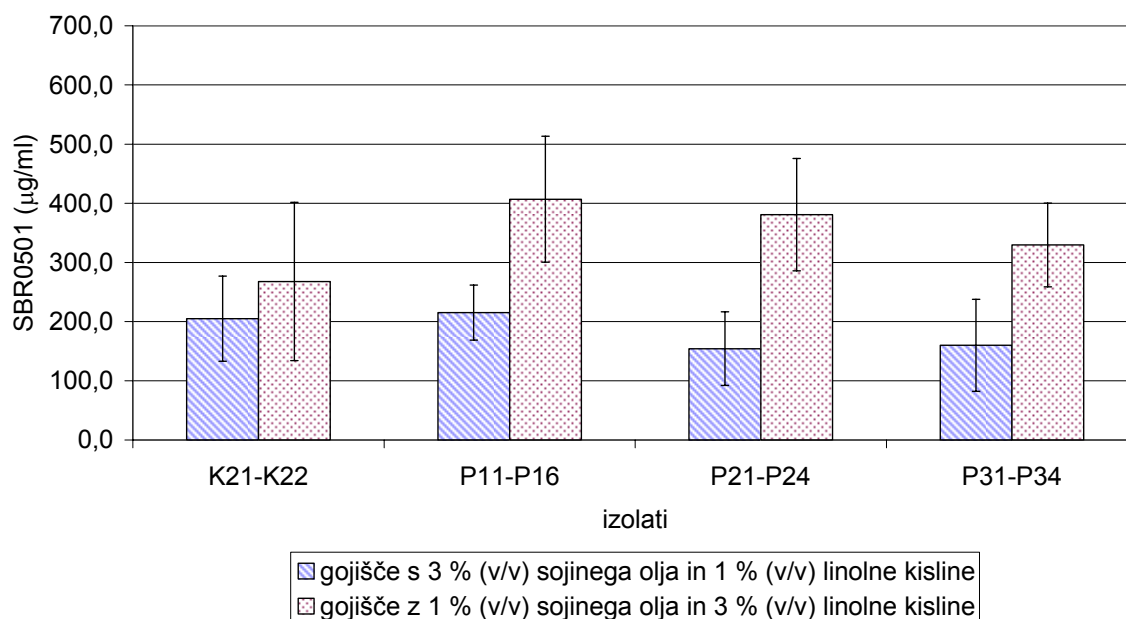
#### 4.1.8 Odpornost *Streptomyces* sp. K343-1 na polimiksin B in vpliv na donos SBR0501

Na sporulacijskih gojiščih z dodanim 10, 50 in 100  $\mu\text{g/ml}$  polimiksina B so zrasli vsi izolati. Za nadaljna testiranja smo uporabili le izolate, ki so zrasli s 100  $\mu\text{g/ml}$  polimiksina B v sporulacijskem gojišču. Na sliki 25 so prikazani končni donosi spojine SBR0501 izolatov iz tega gojišča.



Slika 26: Donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na polimiksin B

Sevi s slike 26 so združeni po skupinah in predstavljeni na sliki 27. Seva K21 in K22 sta kontroli in v selekcijskem gojišču nista imeli polimiksina B. Sevi od P11 do P16 so bili izolirani iz selekcijskega gojišča z 10  $\mu\text{g/ml}$  polimiksina B, sevi od P21 do P24 iz selekcijskega gojišča z 20  $\mu\text{g/ml}$  polimiksina B ter sevi od P31 do P34 iz selekcijskega gojišča s 30  $\mu\text{g/ml}$  polimiksina B.



Slika 27: Povprečne vrednosti donosa spojine SBR0501 izolatov odpornih na polimiksin B

V produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 3 % (v/v) sojinega olja in 1 % (v/v) linolne kisline, so imeli sevi, odporni na 10 µg/ml polimiksina B v selekcijskem gojišču, v povprečju za 5 % večji donos spojine SBR0501 od kontrolnih sevov. Pri sevih odpornih na 20 µg/ml in 30 µg/ml polimiksina B v selekcijskem gojišču, pa se je donos v povprečju zmanjšal za 25 oz. 23 % (Priloga E).

V produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % (v/v) sojinega olja in 3 % (v/v) linolne kisline, so imeli vsi selekcionirani sevi boljše donose spojine SBR0501 od kontrolnih sevov. Sevi, odporni na 10 µg/ml polimiksina B, so imeli v povprečju za 52 % večji donos, sevi, odporni na 20 µg/ml polimiksina B, v povprečju za 42 % večjega, sevi, odporni na 30 µg/ml polimiksina B, pa v povprečju za 23 % večji donos kot kontrolni sevi (Priloga F). Tako se donos spojine s povečano odpornostjo na polimiksin B zmanjšuje.

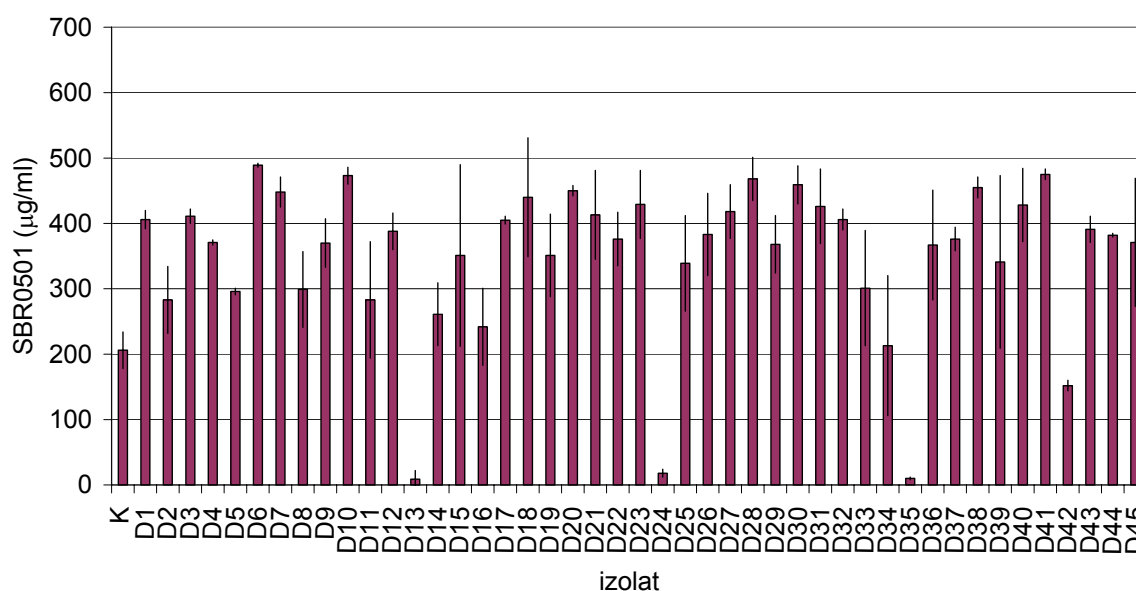
#### 4.1.9 Kultivacija na selekcijskem gojišču z DOG

Selekcijo odpornih sevov na 2-DOG smo izvedli na selekcijskem gojišču, ki je vsebovalo 100 mM 2-DOG in 10 mM etil linoleat. Na vsaki plošči je zraslo nekaj posameznih kolonij. Na ploščo smo nacepili  $5 \times 10^6$  spor, povprečno pa nam je zraslo 5 kolonij. Povprečna preživelost je bila 0,0001 %. DOG-odporne kolonije smo za potrditev odpornosti precepili na enako gojišče. Če so ponovno zrasle, smo jih precepili na sporulacijsko gojišče ter jih testirali na donos spojine SBR0501. Kot kontrolo smo uporabili nekaj kolonij, ki so zrasle na gojišču brez DOG.

#### 4.1.10 Odpornost *Streptomyces* sp. K343-1 na 2-deoksiglukozo in vpliv na donos SBR0501

Na donos spojine SBR0501 smo testirali seve, ki naj bi imeli katabolično derepresijo. Za njihovo selekcijo smo uporabili seve, ki so zrastle na gojišču s 100 mM 2-DOG in 10 mM etil linoleata. Na podlagi predhodnih poskusov donosa spojine SBR0501 v produkcijskih gojiščih smo tu uporabili le produkcijsko gojišče s 1 % (v/v) sojinega olja in 3 % (v/v) linolne kisline, ki je omogočalo večje donose.

Testirali smo 44 sevov s potencialno katabolično derepresijo in večina katabolično derepresiranih sevov je v povprečju imela boljši donos spojine SBR0501 kot kontrolni sevi. Donosi posameznih sevov so prikazani na sliki 28, iz priloge G pa lahko izračunamo, da je donos v povprečju boljši kar za 70 %.



Slika 28: Donos spojine SBR0501 izolatov odpornih na 2-deoksiglukozo

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Maščobne kisline v gojišču močno inducirajo biosintezo spojine SBR0501, vendar so tudi toksične v večjih koncentracijah (nad 3 mM), zato je bil cilj naloge izolirati mutante *Streptomyces* sp. K343-1, ki so odporne na povečane koncentracije linolne kisline, 2-BrP, polimiksina B ter preučitev vloge katabolične represije na donos zelene spojine.

#### 5.1.1 Vpliv zaščite sporulacijskega gojišča

Selekcionirane seve smo nacepili na sporulacijska gojišča. Sporulacijsko gojišče je t.i. kompleksno gojišče, ki vsebuje sestavine naravnega izvora, kot so sojina moka, koruzni škrob in dekstrini. Zato navadno ne poznamo natančno sestavo kompleksnih gojišč. Toksičnost inhibitorjev običajno upade na kompleksnih gojiščih, zato smo zaradi ohranitve selekcijskega pritiska v sporulacijsko gojišče dodali večje koncentracije inhibitorjev.

V poskusih z linolno kislino, ki jih je opravil Mitchell (Mitchell in sod., 2002) na celicah insektov *Sf-21*, je bila preživelost pod 3 % že pri 100  $\mu$ M koncentracijah linolne kisline. V istih poskusih je bilo ugotovljeno še, da pri dodatku 500  $\mu$ M BSA (goveji serumski albumin) in 100  $\mu$ M koncentracije linolne kisline celice ohranijo enako preživelost, kot kontrolne celice. Pri naših poskusih smo ugotovili, da dodatek 1 % (v/v) linolne kisline v sporulacijskem gojišču ne vpliva na preživelost bakterije *Streptomyces* sp. K343-1, dodatek 2 % (v/v) linolne kisline pa zmanjša preživelost za 47 %.

#### 5.1.2 Odpornost *Streptomyces* sp. K343-1 na linolno kislino, 2-bromoheksadekanojsko kislino, polimiksin B in 2-deoksiglukoza ter vpliv na donos SBR0501

Naš prvi cilj je bil ugotoviti, kolikšne koncentracije linolne kisline v selekcijskem gojišču lahko tolerira sev *Streptomyces* sp. K343-1. Ugotovili smo, da je že pri 2 mM (0,056 % v/v) koncentraciji linolne kisline v selekcijskem gojišču preživelost 0,2 % (slika 18).

Banchio in Gramajo (1997) sta za *Streptomyces coliecolor* ugotovila, da so koncentracije različnih maščobnih kislin, na katerih bakterija raste, med 0,02 % in 0,1 %. Pri naših poskusih je bila koncentracija linolne kisline, pri kateri je še rasla bakterija *Streptomyces* sp. K343-1 znotraj teh meja.

Pričakovali smo, da bodo sevi s povečano odpornostjo na linolno kislino imeli boljši donos spojine SBR0501. Pričakovanja so se potrdila le pri izolatih, ki smo jih izolirali na sporulacijskih gojiščih z 1 % (v/v) linolno kislino. Povečanje donosa smo opazili le v primeru, ko smo uporabili produkcijsko gojišče s 3 % (v/v) sojinega olja in 1 % (v/v) linolne kisline (sliki 20 in 21).



Ti sevi so bili izmed vseh testiranih sevov izpostavljeni najmanjšim koncentracijam linolne kisline. Sevi s sporulacijskega gojišča z 2 % (v/v) linolno kislino so v produkcijskem gojišču s 3 % (v/v) sojinim oljem in 1 % (v/v) linolne kisline imeli v povprečju enake donose SBR0501 kot kontrolni sevi. Trend, ki ga tukaj opazimo in se nadaljuje tudi pri ostalih sevih (sliki 20 in 21), nam kaže, da izpostavljenost večjim koncentracijam linolne kisline negativno vpliva na donos spojine SBR0501.

Predvidevamo lahko, da se poškodbe, ki jih povzročijo toksični produkti razgradnje linolne kisline, kopičijo in negativno vplivajo na donos ciljnega metabolita. Sekundarni metaboliti pa za preživetje celic niso nujni, zato verjetno celice porabljajo svojo energijo za odpravo poškodb, ne pa za tvorbo nepotrebnih spojin.

2-bromoheksadekanojska kislina je toksični analog palmitinske kisline, ki ireverzibilno inhibira  $\beta$ -oksidacijo maščobnih kislin (Fong in sod., 1997). Inhibira acil-CoA-sintetazo (Grillo in sod., 2001).

Sevi, ki bi bili odporni na povečane koncentracije 2-BrP, bi verjetno imeli več encimov  $\beta$ -oksidacije. Z odstranitvijo inhibitorja bi lahko ti sevi procesirali večje koncentracije linolne kisline. Tako bi dobili več prekurzorjev ciljnega metabolita in posledično več same spojine SBR0501.

Na slikah 22 in 23 lahko vidimo, da je donos spojine SBR0501 pri izolatih, odpornimi na 2-BrP, večji pri dodatku večje količine linolne kisline v produkcijsko gojišče (S:L=1:3). To bi lahko pripisali dejstvu, da je v sojinem olju manj same linolne kisline (glej preglednico 4) in tako imajo celice manj substrata za tvorbo ciljnega metabolita.

Selekcionirani sevi, odporni na 2-BrP, so imeli boljši donos spojine SBR0501 v primerjavi s kontrolnimi sevi le v primeru, ko smo uporabili produkcijsko gojišče s 3 % (v/v) sojinega olja in 1 % (v/v) linolne kisline. Nasprotno, v produkcijskem gojišču z 1 % (v/v) sojinega olja in 3 % (v/v) linolne kisline pa so imeli selekcionirani sevi v povprečju enak donos kot kontrolni sevi.

Ena od razlag je, da nekateri sevi, odporni na 2-BrP, v resnici niso imeli večjih koncentracij encimov  $\beta$ -oksidacijskega ciklusa, temveč so imeli inhibiran transportni sistem za prenos 2-BrP v celico. S takšno inhibicijo bi lahko preživeli ob visokih koncentracijah 2-BrP, saj 2-BrP ne bi prišel v celico, kjer bi lahko inhibiral celične procese.

Glede na donose kontrolnih sevov ostalih kultivacij pa je možna še ena razlaga. Na slikah 20, 21, 26 in 27 vidimo, da je donos kontrol v produkcijskem gojišču z 1 % (v/v) sojinega olja in 3 % (v/v) linolne kisline med seboj podoben, na slikah 23 in 24 pa je 2-krat večji. Zato je možno, da smo tu naredili eksperimentalno napako in da imajo sevi dejansko boljši donos spojine SBR0501.

Od sestave celične stene je odvisno, kakšna koncentracija polimksina B je potrebna, da bo inhibirala celično rast. Po Gramu negativne bakterije so manj odporne in pri njih je  $MIC_{90}$ , koncentracija, ki inhibira rast 90 % bakterij, med 2 in 16  $\mu\text{g/ml}$ . Po Gramu pozitivne bakterije imajo debelejšo plast peptidoglikana v celični steni in velike molekule težje prodrejo do mesta delovanja, ki je v tem primeru celična membrana. Za te bakterije je  $MIC_{90}$  večja od 20  $\mu\text{g/ml}$ , kar je odvisno od posameznega organizma. *Streptomyces* sp. K343-1 pripada k po Gramu pozitivnim bakterijam in smo zato pričakovali, da odpornost

na večje koncentracije polimiksina B lahko vpliva na prepustnost membrane in na donos naše ciljne spojine (Savage in sod., 2002).

V literaturi najdemo opis poskusov, pri katerih so donos sekundarnega metabolita povečali s povečano odpornostjo na antibiotike. Med drugim sta Hu in Ochi (2001) z odpornostjo *Streptomyces coelicolor* na en antibiotik dvignila donos sekundarnega metabolita aktinorodina za 1,6–3-krat. Pri tem je bilo le med 13 in 18 % sevov takšnih, ki so imeli povečano odpornost na antibiotik. Pri sevih odpornih na tri različne antibiotike je bil donos celo za 48-krat večji od kontrolnega seva.

Testirali smo izolate *Streptomyces* sp. K343-1, ki so bili odporni na 10, 20 in 30 µg/ml polimiksina B v selekcijskem gojišču. Na slikah 26 in 27 lahko vidimo, da se donos spojine SBR0501 v gojišču s 3 % (v/v) sojinega olja in 1 % (v/v) linolne kisline pri sevih, odpornih na polimiksin B, ne spremeni v pozitivnem smislu, saj je manjši tudi za 25 %. V gojišču s 1 % (v/v) sojinega olja in 3 % (v/v) linolne kisline pa je bil donos pri sevih odpornih na 10 µg/ml polimiksina B, kar za 52 % večji, kot pri kontrolnih sevih. Z naraščanjem odpornosti na polimiksin B pa donos rahlo padal, vendar je še vedno večji kot pri kontrolnih sevih. Pri odpornosti na polimiksin B se lahko spremeni permeabilnost membrane, kar verjetno povzroči večji vnos linolne kisline v celico, predvsem v gojišču z več linolne kisline, kjer je večji koncentracijski gradient. Možno pa je tudi, da so izolati imeli okvarjen mehanizem za vnos polimiksina B v celico in je bila odpornost posledica tega pojava. Poznano je, da transport dolgoveržnih maščobnih kislin pri večjih koncentracijah poteka z difuzijo (Banchio in Gramajo, 1997).

Bakterije rodu *Streptomyces* lahko uporabljajo širok spekter različnih hranil. V primarnem metabolizmu so različne metabolne poti podvržene katabolični represiji z virom ogljika, kar preprečuje učinkovito porabo sekundarnih virov ogljika v prisotnosti enostavnih virov ogljika (npr. glukoze, glicerola). Za regulacijo porabe enostavnih virov ogljika je ključen encim glukoza-kinaza, ki aktivira glukozo. Odporni mutanti bakterij *Streptomyces* na toksičen analog glukoze 2-deoksiglukozo (DOG) imajo lahko neaktiven encim glukoza-kinazo in zato ne morejo uporabljati glukoze kot vir ogljika, kakor tudi nimajo represije z glukozo v prisotnost drugih virov ogljika, npr. glicerola (Ingram in Westpheling, 1995).

Donos spojine SBR0501 izolatov *Streptomyces* sp. K343-1 odpornimi na 2-deoksiglukozo je v primerjavi s kontrolnimi sevi boljši za 70 % (Slika 28). Sevi, ki nimajo katabolične represije v različnih metabolnih poteh – pri porabi enostavnih sladkorjev, glicerola..., prenesajo večje začetne koncentracije vira C (linolne, glicerola), kakor tudi prej začnejo porabljati sekundarni vir C, tako pride prej do tvorbe sekundarnih metabolitov (Saito in sod., 1998), kar verjetno vodi do večjega končnega donosa spojine SBR0501.

## 5.2 SKLEPI

V diplomskem delu smo skladno z delovno hipotezo pripravili seve *Streptomyces* sp. K343-1 odpornimi na linolno kislino, 2-bromoheksadekanojsko kislino, polimiksin B in 2-deoksiglukozo ter ovrednotili vpliv tovrstnih izolatov seva *Streptomyces* sp. K343-1 na donos spojine SBR0501. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko podamo naslednje sklepe:

- Sestava produkcijskega gojišča oz. razmerje med sojinim oljem in linolno kislino vpliva na donos spojine SBR0501. Kot boljše se je pokazalo gojišče z večjo vsebnostjo linolne kisline (S:L=1:3).
- Odpornost izolatov na linolno kislino nima bistvenega vpliva oz. celo negativno deluje na donos spojine SBR0501.
- Odpornost izolatov na analog linolne kisline, 2-bromoheksadekanojsko kislino lahko izboljša donos spojine SBR0501 za 29 %.
- Odpornost izolatov na polimiksin B izboljša donos spojine SBR0501 tudi za 52 %, vendar donos ne narašča linearno z odpornostjo.
- Izolati, odporni na 2-DOG, imajo za 70 % večji donos spojine SBR0501.

## 6 POVZETEK

Sekundarni metaboliti so spojine, ki za organizme niso nujno potrebni v laboratorijskih pogojih. Njihova vloga še ni povsem natančno določena, zaradi njihovih lastnosti in potencialne uporabne v medicini, pa so predmet številnih raziskav. Med najbolj znane proizvajalce sekundarnih metabolitov se uvrščajo bakterije reda *Actinomycetales*. Znotraj tega reda pa so bakterije rodu *Streptomyces* najbolj pogosti proizvajalci sekundarnih metabolitov. Med drugim *Streptomyces* sp. K343-1 proizvaja sekundarni metabolit, inhibitor esteraz SBR0501, prekursorji zanj pa so maščobne kisline, še posebej linolna kislina. Donos sekundarnih metabolitov pri naravnih sevih je navadno nizek. Na proizvodnjo sekundarnih metabolitov vpliva več različnih dejavnikov, kot so npr. pomanjkanje hranil, katabolična represija z ogljikom in dušikom in regulacija s fosforjem. Za ekonomsko upravičeno proizvodnjo sekundarnih metabolitov potrebujemo seve, ki omogočajo večje donose teh spojin. Obstajajo različni pristopi, kako lahko dvigujemo donose, kot so optimizacija gojišč, selekcija sevov in uporaba genskega inženiringa. V diplomskem delu smo izbrali pristop s selekcijo. Izolirali smo seve, ki so bili odporni na povečane koncentracije linolne kisline, saj naj bi večje količine linolne kisline zagotovile več prekursorskih molekul za SBR0501. Prav tako naj bi celice odporne na povečane koncentracije polimiksina B imele spremenjene lastnosti celične membrane in bi omogočale večji vnos linolne kisline v celice. Izolati odporni na 2-bromoheksadekanojsko kislino naj bi imeli povečane koncentracije encima acil-CoA-sintetaze. Tako bi lahko hitreje metabolizirali maščobne kisline, ki so prekursorji ciljnega metabolita. Izolati, odporni na 2-deoksiglukozo, pa naj bi imeli katabolično derepresijo in bi lahko hitreje začeli uporabljati sekundarni vir ogljika – linolno kislino. Uporabljali smo dve vrsti produkcijskega gojišča in sicer z 1 % (v/v) linolne kisline in 3 % (v/v) sojinega olja ter drugo s 3 % (v/v) linolne kisline in 1 % (v/v) sojinega olja. Naši izsledki kažejo, da dodatek večjih koncentracij linolne kisline v produkcijsko gojišče pozitivno vpliva na donos spojine SBR0501, razen pri izolatih, odpornimi na linolno kislino. Pri teh izolatih smo opazili, da večje koncentracije linolne kisline v produkcijskem gojišču negativno vplivajo na končni donos spojine SBR0501. Največje donose, za 15 % večje od kontrol, smo dobili pri izolatih v produkcijskem gojišču s 3 % (v/v) sojinega olja in 1 % (v/v) linolne kisline, izolirani pa so bili iz sporulacijskega gojišča s 1 % (v/v) linolno kislino. Tekom testiranja so bili torej izpostavljeni najmanjšim koncentracijam linolne kisline. Odpornost na 2-bromoheksadekanojsko kislino je povečala donos v primeru odpornosti na 5 in 8  $\mu$ M 2-BrP in sicer za 30 % v produkcijskem gojišču s 3 % (v/v) sojinim oljem in 1 % (v/v) linolno kislino. V ostalih primerih je bil donos enak ali manjši od kontrol. Odpornost na polimiksin B pozitivno vpliva na donos spojine SBR0501, vendar donos ne narašča linearno z odpornostjo. Odpornost na 10  $\mu$ g/ml polimiksina B zveča donos za 52 %, na 20  $\mu$ g/ml za 42 % in na 30  $\mu$ g/ml za 23 % v primerjavi s kontrolami. Odpornost na 2-deoksiglukozo se je izkazala kot pozitiven vpliv na donos spojine SBR0501, saj se je donos SBR0501 zvečal za 70 % v primerjavi s kontrolnimi sevi. Izolati naj bi imeli katabolično derepresijo, ali pa niso imeli transportnega sistema za DOG (Hodgson, 1982). Če je prišlo do katabolične derepresije je prav hitrejši vnos linolne kisline v celice verjetno vzrok boljšega donosa. Na podlagi rezultatov lahko potrdimo delovno hipotezo, da smo uspeli izolirati seve *Streptomyces* sp. K343-1, ki so imeli povečan donos spojine SBR0501.

## 7 VIRI

Atlas R. M. 1993. Microbiological media. Boca Raton, CRC Press: 1079 str.

Baltz R. H. 1986a. Mutagenesis in *Streptomyces* spp. V: Manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain A. L., Solomon N. A. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 184-190

Baltz R. H. 1986b. Strain improvement: introduction. V: Manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain A. L., Solomon N. A. (ed.). Washington, American Society for Microbiology: 154-154

Baltz R. H., Hosted T. J. 1996. Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in *Actinomycetes*. Trends in Biotechnology, 14: 245-250

Banchio C., Gramajo H. C. 1997. Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by *Streptomyces coelicolor* A3(2): first characterization of a Gram-positive bacterial system. Microbiology, 143: 2439–2447

Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. Journal of Antibiotics, 58, 1: 1-26

Bergey, Holt J.G. (eds.). 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore, Williams & Wilkins: 787 str.

Birmingham W. 2006. Scientific serendipity: Penicilin. Winston-Salem, Wake Forest University

<http://users.wfu.edu/birmwr4/serendipity/serendipity.html> (1.3.2006): 1 str.

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

Calvo A. M., Wilson R. A., Bok J. W., Keller N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66, 3: 447–459

Carson D. D., Daneo-Moore L. 1980. Effects of fatty acids on lysis of *Streptococcus faecalis*. Journal of Bacteriology, 141, 3: 1122-1126

Challis G. L., Hopwood D. A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 100, suppl 2: 14555-14561

Clausell A., Pujol M., Alsina M. A. Cajal Y. 2003. Influence of polymyxins on the structural dynamics of *Escherichia coli* lipid membranes. Talanta, 60: 225-234

Crueger W., Crueger A. 1990. Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. Brock T. D. (ed.). Sunderland, Sinauer Associates: 357 str.

Davydov V. V., Dobaeva N. M., Bozhkov A. I. 2004. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. *Experimental Gerontology*, 39: 11–16

Döhren H., Gräfe U. 1997. General aspects of secondary metabolism. V: *Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise*. 2<sup>nd</sup> ed. Volume 7. Products of secondary metabolism. Rehm H.-J., Reed G. (eds.). Weinheim, VCH: 1-55

Firn R. D., Jones C. G., 2000. The evolution of secondary metabolism - a unifying model. *Molecular Microbiology*, 37, 5: 989-994

Fong J. C., Leu S.-J., Chai S.-P. 1997. Differential inhibition of lipolysis by 2-bromopalmitic acid and 4-bromocrotonic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1344: 65–73

Grillo M. P., Chiellini G., Tonelli M., Benet L. Z. 2001. Effect of  $\alpha$ -fluorination of valproic acid on valproyl-S-acyl-CoA formation in vivo in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 29: 1210–1215

Gutsmann T., Hagge S. O., David A., Roes S., Böhling A., Hammer M. U., Seydel U. 2005. Lipid-mediated resistance of Gram-negative bacteria against various pore-forming antimicrobial peptides. *Journal of Endotoxin Research*, 11, 3: 167-173

Heraï S., Hashimoto Y., Higashibata H, Maseda H., Ikeda H., Omura S., Kobayashi M. 2004. Hyper-inducible expression system for *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101, 39: 14031 - 14035

Hodgson D. A. 1982. Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-Deoxyglucose. *Journal of General Microbiology*, 128: 241-2430

Hodgson D.A. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 42: 47-238

Hu H., Ochi K. 2001. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4: 1885-1892

Hütter R. 1986. Overproduction of microbial metabolites. V: *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes*. Vol. 4: Microbial products II. Pape H., Rehm H.-J. (eds.). Weinheim, VCH: 3-17

Ingram C., Westpheling J. 1995. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* is not required for glucose repression of the *chi63* promoter. *Journal of Bacteriology*, 177, 12: 3587-3588

Kamionka A., Parche S., Nothaft H., Siepelmeyer J., Jahreis K., Titgemeyer F. 2002. The phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* IIA<sup>Cr</sup> exhibits properties that resemble transport and inducer exclusion function of enzyme IIA<sup>Glucose</sup> of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 269: 2143–2150

Kieser T., Bibb J., Buttner M. J., Chaiter K. F., Hopwood D. A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich, The John Innes Foundation: 613 str.

Kirn M. 2005. Vpliv fizioloških in morfoloških dejavnikov na biosintezo inhibitorja SBR0501 esteraze pri sevu *Streptomyces* sp. K343-1. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 75 str.

Kwakman J. H. J. M., Postma P. W. 1994. Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 176, 9: 2694-2698

Lewin B. 2004. *Genes VIII*. 8<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall: 1002 str.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10<sup>th</sup> ed. New Jersey, Prentice-Hall: 1019 str.

Martin J. F., Casqueiro J., Liras P. 2005. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 282–293

Matsushima P., Baltz R. H. 1986. Protoplast fusion. V: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Demain A. L., Solomon N. A. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 170-183

Mebis M. 2001. Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon*, 39: 87-96

Mitchell L. A., Moran J. H., Grant D. F. 2002. Linoleic acid, *cis*-epoxyoctadecenoic acids, and dihydroxyoctadecadienoic acids are toxic to *Sf*-21 cells in the absence of albumin. *Toxicology Letters*, 126: 187–196

Nielsen J. 1998. The role of metabolic engineering in the production of secondary metabolites. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 330-336

Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N. 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 338, 1: 668-676

O'Brien R. D. 1998. *Fats and oils – formulating and processing for applications*. Lancaster, Basel, Technicom Publishing Company: 649 str.

Oksman-Caldentey K., Inze D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9, 9: 433-440

Parekh S., Vinci V. A., Strobel R.J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 287-301

Prosser J. I. Tough A. J. 1991. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10, 4: 253-74

Queener S. W., Lively D. H. 1986. Screening and selection for strain improvement. V: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Demain A. L., Solomon N. A. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 155-169

Rahaman S. O., Mukherjee J., Chakrabarti A., Pal S. 1998. Decreased membrane permeability in a polymixin B-resistant *Escherichia coli* mutant exhibiting multiple resistance to  $\beta$ -lactams as well as aminoglycosides. *FEMS Microbiology Letters*, 161: 249-254

Saito A., Fujii T., Yoneyama T. Miyashita K. 1998. *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 180, 11: 2911-4

Savage P. B., Li C., Taotafa U., Ding B., Guan Q. 2002. Antibacterial properties of cationic steroid antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 217: 1-7

Spiteller G. 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122: 617-657

Spiteller P., Kern W., Reiner J., Spiteller G. 2001. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1531: 188-208

Stimers J. R., Dobretsov M., Hastings S. L., Jude A. J., Grant D. F. 1999. Effects of linoleic acid metabolites on electrical activity in adult rat ventricular myocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1438: 359-368

*Streptomyces*. 2006. Gambier, Kenyon College  
[http://biology.kenyon.edu/Microbial\\_Biorealm/bacteria/gram-positive/streptomyces/streptomyces.html#genome](http://biology.kenyon.edu/Microbial_Biorealm/bacteria/gram-positive/streptomyces/streptomyces.html#genome) (14.2.2006): 1 str.

Tamehiro N., Hosaka T., Xu J., Hu H., Otake N., Ochi K. 2003. Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 11: 6412-6417

Urukalo M. 2005. Razvoj metode in ovrednotenje inhibitorne aktivnosti esteraz izbranih streptomicet. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 48 str.

van Wezel G. 2002. Cell division and development of streptomycetes. Leiden, Leiden University  
<http://wwwchem.leidenuniv.nl/genexpress/ie/vanwezel/vanwezel.htm> (1.3.2006): 1 str.



Vining L. C. 1986. Secondary metabolism. V: Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes. Vol. 4: Microbial products II. Pape H., Rehm H.-J. (eds.). Weinheim, VCH: 19-38

Wallace R. J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of the Nutrition Society, 63: 621–629

Webb Y., Hermida-Matsumoto L., Resh M. D. 2000. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. Journal of Biological Chemistry, 275, 1: 261–270

Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry, 64: 3–19

Yazaki K. 2005. Transporters of secondary metabolites. Current Opinion in Plant Biology, 8: 301–307

Zähner H. 1979. What are secondary metabolites? Folia Microbiology, 24: 435-443  
citirano po: Hütter R. 1986. Overproduction of microbial metabolites. V: Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes. Vol. 4: Microbial products II. Pape H., Rehm H.-J. (eds.). Weinheim, VCH: 3-17

## ZAHVALA

Najprej bi se rad zahvalil somentorju doc. dr. Hrvoju Petkoviću in asistentu dr. Štefanu Fujsu za strokovno pomoč in vodenje pri diplomskem delu, ter za vso spodbudo med praktičnim delom.

Hvala tovarni zdravil Krka, d.d. za opravljene analize.

Urški Lešnik in Mateju Šerganu se zahvaljujem za tehnično pomoč in nasvete pri praktičnem delu v laboratoriju.

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Petru Rasporju, za strokovno pomoč in vse nasvete, ki jih nisem bil deležen le med delom diplome, ampak tudi na vseh njegovih predavanjih.

Prof. dr. Veroniki Abram gre zahvala za strokovno opravljeno recenzijo diplomskega dela.

Na koncu pa bi se rad zahvalil predvsem staršem, sestri Maruši, starim staršem in Alenki. Spremljali, vzpodbujali in podpirali ste me od začetka študija in mi vlivali vso potrebno energijo, da sem lahko prebrodil vse težave, na katere sem naletel v času študija.

## PRILOGE

Priloga A: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 3 % sojinenga olja in 1 % linolne kisline (S:L=3:1)

Oznaka seva	Rast na NMMB z:	Rast na SP z:	SBR0501( $\mu\text{g/ml}$ ) v produkcijskem gojišču					sprememba donosa (%) glede na kontrolo
			Paralelke			povprečje	SD	
			A	B	C			
L31	1 mM linolna + 10 mM glicerol	2% linolne	142	179	196	172	28	7
L32	1 mM linolna + 10 mM glicerol	2% linolne	162	159	170	164	6	2
L33	1 mM linolna + 10 mM glicerol	1% linolne	169	200	209	193	21	20
L34	1 mM linolna + 10 mM glicerol	1% linolne	185	168	201	185	17	15
L41	1 mM linolna	2% linolne	156	172	173	167	10	4
L42	1 mM linolna	1% linolne	208	165	194	189	22	18
L43	1 mM linolna	1% linolne	202	210	170	194	21	21
L44	1 mM linolna	1% linolne	215	181	196	197	17	23
L52	2 mM linolna + 10 mM glicerol	2% linolne	174	223	175	191	28	19
L53	2 mM linolna + 10 mM glicerol	1% linolne	56	65	58	60	5	-63
L54	2 mM linolna + 10 mM glicerol	2% linolne	pmz	23	pmz	23		-86
L55	2 mM linolna + 10 mM glicerol	1% linolne	pmz	pmz	4	4		-98
L62	2 mM linolna	2% linolne	141	151	158	150	9	-7
L63	2 mM linolna	2% linolne	145	155	154	151	6	-6
L64	2 mM linolna	2% linolne	167	136	160	154	16	-4
K1	kontrola	kontrola	162	154	166	161	6	

Priloga B: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % sojinega olja in 3 % linolne kisline (S:L=1:3)

Oznaka seva	Rast na NMMB z:	Rast na SP z:	SBR0501( $\mu\text{g/ml}$ ) v produkcijskem gojišču					sprememba donosa (%) glede na kontrolo
			paralelke			povprečje	SD	
			A	B	C			
L31	1 mM linolna + 10 mM glicerol	2% linolne	96	122	70	96	26	-53
L32	1 mM linolna + 10 mM glicerol	2% linolne	104	85	78	89	13	-57
L33	1 mM linolna + 10 mM glicerol	1% linolne	81	97	76	85	11	-59
L34	1 mM linolna + 10 mM glicerol	1% linolne	183	134	176	164	27	-20
L41	1 mM linolna	2% linolne	118	98	139	118	21	-42
L42	1 mM linolna	1% linolne	106	109	89	101	11	-51
L43	1 mM linolna	1% linolne	120	137	134	130	9	-37
L44	1 mM linolna	1% linolne	155	149	113	139	23	-32
L52	2 mM linolna + 10 mM glicerol	2% linolne	157	175	166	166	9	-19
L53	2 mM linolna + 10 mM glicerol	1% linolne	6	14	pmz	10	6	-95
L54	2 mM linolna + 10 mM glicerol	2% linolne	pmz	pmz	8	8		-96
L55	2 mM linolna + 10 mM glicerol	1% linolne	4	2	pmz	3	1	-99
L63	2 mM linolna	2% linolne	86	65	81	77	11	-62
L64	2 mM linolna	2% linolne	86	95	79	87	8	-58
K1	Kontrola	kontrola	173	219	225	206	28	

Priloga C: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 3 % sojinega olja in 1 % linolne kisline (S:L=3:1)

Oznaka seva	Rast na NMMB z:	Rast na SP z:	SBR0501( $\mu\text{g/ml}$ ) v produkcijskem gojišču					sprememba donosa (%) glede na kontrolo
			paralelke			povprečje	SD	
			A	B	C			
B21	5 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	492	491	459	481	19	65
B24	5 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	262	352	256	290	54	-1
B25	5 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	354	442	399	398	44	36
B26	5 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	346	313	353	337	21	15
B31	6 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	219	337	321	292	64	0
B34	6 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	236	268	235	246	19	-16
B36	6 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	293	109	377	260	137	-11
B38	6 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	464	430	528	474	50	62
B42	7 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	347	462	432	414	60	42
B44	7 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	228	300	146	225	77	-23
B46	7 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	376	290	267	311	57	6
B48	7 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	252	268	281	267	14	-9
B51	8 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	432	421	390	414	22	42
B53	8 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	345	282	269	299	41	2
B54	8 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	486	481	376	448	62	53
K31	kontrola	kontrola	295	275	283	284	11	-3
K33	kontrola	kontrola	353	287	259	300	48	3
			povprečje kontrol			292		

Priloga D: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % sojinega olja in 3 % linolne kisline (S:L=1:3)

Oznaka seva	Rast na NMMB z:	Rast na SP z:	SBR0501( $\mu\text{g/ml}$ ) v produkcijskem gojišču					sprememba donosa (%) glede na kontrolo
			paralelke			povprečje	SD	
			A	B	C			
B21	5 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	377	274	336	329	52	-32
B24	5 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	440	572	532	515	68	6
B25	5 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	522	576	440	513	68	6
B26	5 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	518	510	466	498	28	3
B31	6 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	439	208	569	405	183	-16
B34	6 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	326	343	293	321	26	-34
B36	6 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	537	607	436	526	86	9
B38	6 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	443	359	363	388	47	-20
B42	7 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	635	468	542	549	84	13
B44	7 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	426	479	440	449	27	-7
B46	7 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	523	545	489	519	28	7
B48	7 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	557	522	446	508	57	5
B51	8 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	573	508	503	528	39	9
B53	8 $\mu\text{M}$ 2-BrP	25 $\mu\text{M}$ 2-BrP	417	406	471	432	35	-11
K31	kontrola	kontrola	495	463	451	470	23	-3
K33	kontrola	kontrola	387	558	548	498	96	3
			povprečje kontrol			484		

Priloga E: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 3 % sojinega olja in 1 % linolne kisline (S:L=3:1)

Oznaka seva	Rast na NMMB z:	Rast na SP z:	SBR0501( $\mu\text{g/ml}$ ) v produkcijskem gojišču					sprememba donosa (%) glede na kontrolo	
			paralelke			povprečje	SD		
			A	B	C				
P11	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	258	207	228	231	26	13	
P12	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	202	234	187	208	24	1	
P13	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	158	271	143	191	70	-7	
P14	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	154	174	163	164	10	-20	
P15	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	307	269	231	269	38	31	
P16	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	214	199	276	230	41	12	
P21	20 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	218	228	110	185	66	-10	
P22	20 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	211	166	121	166	45	-19	
P23	20 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	116	190	227	178	56	-13	
P24	20 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	31	69	166	89	70	-57	
P31	30 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	238	111	192	181	64	-12	
P32	30 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	92	109	103	101	9	-50	
P33	30 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	208	120	44	124	82	-40	
P34	30 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	149	213	339	234	97	14	
K21	kontrola	kontrola	224	81	191	165	75	-19	
K22	kontrola	kontrola	269	301	164	245	72	19	
			povprečje kontrol				205		

Priloga F: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % sojinega olja in 3 % linolne kisline (S:L=1:3)

Oznaka seva	Rast na NMMB z:	Rast na SP z:	SBR0501( $\mu\text{g/ml}$ ) v produkcijskem gojišču					sprememba donosa (%) glede na kontrolo
			paralelke			povprečje	SD	
			A	B	C			
P11	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	589	415	274	426	158	61
P12	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	486	502	530	506	22	91
P13	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	342	360	450	384	58	45
P14	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	0	0	10	3	6	-99
P15	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	242	496	222	320	153	21
P16	10 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	380	335	478	398	73	50
P21	20 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	362	383	418	388	29	47
P22	20 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	377	453	428	419	39	59
P23	20 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	429	459	512	466	42	76
P24	20 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	134	275	340	250	105	-6
P31	30 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	210	412	347	323	103	22
P32	30 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	318	283	358	320	38	21
P33	30 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	478	279	275	344	117	30
P34	30 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	100 $\mu\text{g/ml}$ polimiksina B	353	381	261	332	63	25
K21	kontrola	kontrola	453	185	208	282	149	7
K22	kontrola	kontrola	99	/	394	247	205	-7
			povprečje kontrol			264		



Priloga G: Končni donos spojine SBR0501 v produkcijskem gojišču, ki je vsebovalo 1 % sojinega olja in 3 % linolne kisline (S:L=1:3)

Oznaka seva	Rast na NMMB z:	SBR0501( $\mu\text{g/ml}$ ) v produkcijskem gojišču				sprememba donosa (%) glede na kontrolo	
		paralelke			povprečje		SD
K	Kontrola	173	219	225	206	28	
D1	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	396	416		406	14	97
D2	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	247	319		283	51	37
D3	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	418	403		411	11	99
D4	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	368	374		371	4	80
D5	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	299	292		296	5	43
D6	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	487	491		489	3	137
D7	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	431	464		448	23	117
D8	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	340	258		299	58	45
D9	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	396	344		370	37	80
D10	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	463	482		473	13	129
D11	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	346	220		283	89	37
D12	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	408	368		388	28	88
D13	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	18	0		9	13	-96
D14	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	295	227		261	48	27
D15	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	449	253		351	139	70
D16	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	200	283		242	59	17
D17	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	400	409		405	6	96
D18	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	504	376		440	91	114
D19	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	395	306		351	63	70
D20	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	455	444		450	8	118
D21	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	461	365		413	68	100
D22	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	405	347		376	41	83
D23	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	392	466		429	52	108
D24	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	22	13		18	6	-92
D25	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	390	287		339	73	64
D26	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	338	427		383	63	86
D27	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	447	389		418	41	103
D28	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	445	491		468	33	127
D29	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	337	399		368	44	79
D30	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	479	438		459	29	123
D31	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	466	386		426	57	107
D32	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	417			406	16	97
D33	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	395	363		301	88	46
D34	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	288	137		213	107	3
D35	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	11	8		10	2	-95
D36	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	426	307		367	84	78
D37	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	363	388		376	18	82
D38	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	444	466		455	16	121
D39	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	248	434		341	132	66

Priloga G : nadaljevanje						
D40	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	467	388	428	56	108
D41	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	480	469	475	8	130
D42	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	158	146	152	8	-26
D43	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	377	405	391	20	90
D44	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	384	380	382	3	85
D45	100 mM DOG + 10 mM etil linoleat	302	440	371	98	80

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Aleš ŠPES

**VPLIV MAŠČOBNIH KISLIN NA BIOSINTEZO  
INHIBITORJA ESTERAZE SBR0501 PRI SEVU  
*Streptomyces* sp. K343-1**

**DIPLOMSKO DELO**

Univerzitetni študij

LJUBLJANA, 2006