

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jure DOBOVŠEK

**PROUČEVANJE RAZLIČNIH TEHNIK
MUTAGENEZE PRI GLIVI *Aspergillus terreus***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jure DOBOVŠEK

PROUČEVANJE RAZLIČNIH TEHNIK MUTAGENEZE PRI GLIVI
Aspergillus terreus

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

STUDY OF DIFFERENT TECHNICS OF MUTAGENESIS IN
FUNGUS *Aspergillus terreus*

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Službi za biotehnološki razvoj sektorja Biokemija v Krki d.d., Novo mesto.

Z mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, za somentorja doc. dr. Aleš Gasparič in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur-Bertok.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Somentor: doc. dr. Aleš Gasparič

Recenzentka: prof. dr. Darja Žgur-Bertok

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Aleš GASPARIČ
Krka d.d, Novo mesto, Sektor Biokemija, Služba za biotehnološki razvoj

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Jure DOBOVŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 582.28:579.22.083:579.66:543.544.52(043)=163.6
KG	glice/nitaste glice/ <i>Aspergillus terreus</i> /gojenje gliv/kalitev spor/submerzna rast/holesterol/HMG-CoA reduktaza/fermentacijski proces/sekundarni metaboliti/statini/lovastatin/mutageneza/UV mutageneza/kolhicin/benomil/katabolna represija/deregulacija/2-deoksi-D-glukoza/natrijev kloroacetat/analitične metode/TLC/HPLC/biološko testiranje
AV	DOBOVŠEK, Jure
SA	GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/GASPARIČ, Aleš (somentor)/ŽGUR-BERTOK Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2016
IN	PROUČEVANJE RAZLIČNIH TEHNIK MUTAGENEZE PRI GLIVI <i>Aspergillus terreus</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 79 str., 23 pregl., 18 sl., 178 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Lovastatin je inhibitor HMG-CoA reduktaze in se ga uporablja za zniževanje stopnje holesterola v krvi pri ljudeh. Raziskave njegove produkcije pri glivi <i>Aspergillus terreus var. aureus</i> so potekale v dveh sklopih. V prvem sklopu smo preučevali indukcijo kalitve spor v predfermentorski fazи s temperaturnim šokom, obdelavo s proteoliznimi encimi, mehansko obdelavo in inkubacijo v mešanici aminokislin. Preverjali smo vpliv teh dejavnikov na pospešitev in sinhronizacijo kalitve ter produkcijo lovastatina pri submerzni rasti. Ugotovili smo, da daljša izpostavljenost spor temperaturam nad 60 °C inhibira kalitev. HPLC analiza je pokazala rahlo povišano vsebnost lovastatina pri indukciji s temperaturnim šokom 100 °C v trajanju 5 sekund v primerjavi s kontrolo. Opazili smo korelacijo med filamentozno rastjo in povišano vsebnostjo lovastatina. V drugem sklopu smo proučevali mutagenezo z UV žarki, kolhicinom in benomilom. Za predselekcijo mutant smo uporabili 2-deoksi-D-glukozo, lovastatin pri različnih koncentracijah ter natrijev kloroacetat. Nadaljnje testiranje vzorcev smo izvedli s TLC, biološkim testiranjem na <i>Neurospora crassa</i> in HPLC. Pri mutagenezi z UV žarki in kolhicinom smo uspeli pridobiti 5 mutant z izboljšano produkcijo lovastatina. Pri najboljšem sevu smo izmerili skoraj 20 % boljši donos. Benomil v koncentraciji 2 mg/l je v celoti inhibiral rast.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDC 582.28:579.22.083:579.66:543.544.52(043)=163.6
CX fungus/filamentous fungus/*Aspergillus terreus*/fungus cultivation/spore germination/submerged growth/cholesterol/HMG-CoA reductase/fermentation process/secondary metabolites/statins/lovastatin/mutagenesis/UV mutagenesis/colchicine/benomyl/catabolite repression/deregulation/2-deoxy-D-glucose/sodium chloroacetate/analytical methods/TLC/HPLC/biological assay
AU DOBOVŠEK, Jure
AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/GASPARIČ, Aleš (co-supervisor)/ŽGUR-BERTOK Darja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2016
TI STUDY OF DIFFERENT TECHNICS OF MUTAGENESIS IN FUNGUS *Aspergillus terreus*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 79 p., 23 tab., 18 fig., 178 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Lovastatin is a HMG-CoA reductase inhibitor and is used for reducing the level of blood cholesterol in humans. Our research of its production by *Aspergillus terreus* var. *aureus* was carried out in two stages. In the first part we focused on the induction of spore germination in pre-fermentation phase with a heat shock, treatment with proteolytic enzymes, mechanical stress and incubation in a mixture of amino acids. We examined their impact on speeding up and synchronizing germination and consequently lovastatin production in submerged cultivation. We noticed that prolonged exposure of spores to temperatures above 60 °C inhibited germination. HPLC analysis showed a slightly elevated lovastatin level compared to the control, when heat shock induction with 100 °C for 5 seconds was performed. We also noticed that there is a correlation between the presence of filamentous growth and increased levels of lovastatin. In the second part we studied mutagenesis with UV rays, colchicine and benomyl. For the screening process, rationalized selection with 2-deoxy-D-glucose, lovastatin at various concentrations, and sodium chloroacetate was used. Further sample analysis was performed by TLC, biological testing with *Neurospora crassa* and HPLC. We isolated 5 mutants with improved lovastatin production after mutagenesis with UV rays and colchicine. The best isolate showed almost 20 % improvement. Benomyl at concentration of 2 mg/l completely inhibited growth.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN RAZISKAVE	1
1.2 GLAVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GLIVA <i>Aspergillus terreus</i>	3
2.2 SUBMERZNA RAST NITASTIH GLIV	4
2.2.1 Kalitev spor	4
2.2.2 Morfološke značilnosti	5
2.3 METABOLNA REGULACIJA FERMENTACIJSKIH PROCESOV	8
2.3.1 Regulatorni mehanizmi vključeni v biosintezo produktov fermentacije	8
2.3.1.1 Indukcija	8
2.3.1.2 Katabolna represija	8
2.3.1.3 Regulacija z dušikom in fosfatom	9
2.3.1.4 Regulacija s povratno zvezo	10
2.4 PRISTOPI ZA IZBOLJŠANJE PRODUKCIJE SEKUNDARNIH METABOLITOV	10
2.4.1 Klasičen pristop z naključno mutagenezo	11
2.4.1.1 UV mutageneza	12
2.4.1.2 Kolhicin in benomil	14
2.4.1.3 DNA popravljalni mehanizmi	15
2.4.2 Novejši pristopi	15
2.4.2.1 Rekombinacija s fuzijo protoplastov	15
2.4.2.2 Transpozicija	16
2.4.2.3 Metode rekombinantne DNA	16
2.4.2.3.1 Manipulacija struktturnih genov	16
2.4.2.3.2 Manipulacija regulatornih genov	17
2.4.2.3.3 Inženiring dobro okarakteriziranih metabolnih poti	17
2.4.2.4 Usmerjena evolucija	18
2.4.2.5 Genomika, metabolomika, transkriptomika, proteomika	19

2.4.3	Metode za selekcijo izboljšanih producentov	20
2.4.3.1	Naključno pregledovanje	20
2.4.3.1.1	Avtomatizirano pregledovanje	21
2.4.3.1.2	Analitične metode	21
2.4.3.1.3	Hitra detekcija	21
2.4.3.1.3.1	Biološko testiranje	21
2.4.3.2	Racionalizirana selekcija	22
2.4.3.2.1	Avksotrofni sevi	22
2.4.3.2.2	Deregulirane mutante	22
2.4.3.2.3	Mutante rezistentne na povratno inhibicijo	23
2.4.3.2.4	Mutante rezistentne na represijo	23
2.5	BIOSINTEZA HOLESTEROLA	23
2.5.1	HMG-CoA reduktaza	25
2.6	POLIKETIDI	26
2.6.1	Statini	27
2.6.1.1	Podobnosti v strukturi statinov	27
2.6.1.2	Razlike v strukturi statinov	28
2.6.1.3	Vezava statinov na HMG-CoA reduktazo	28
2.6.1.4	Lipofilnost statinov	30
2.6.1.5	Metabolizem statinov	30
2.6.1.6	Pregled glavnih statinov	30
3	MATERIAL IN METODE	34
3.1	MATERIAL	34
3.1.1	Mikroorganizmi	34
3.1.2	Kemikalije	34
3.1.3	Reagenti in raztopine	35
3.1.4	Gojišča	35
3.2	METODE	38
3.2.1	Vzdrževanje mikroorganizma	38
3.2.2	Indukcija kalitve spor pri <i>A. terreus var. aureus</i>	38
3.2.2.1	Priprava spor <i>A. terreus var. aureus</i>	38
3.2.2.2	Postopek indukcije	38
3.2.2.2.1	Indukcija s temperaturnim šokom	38
3.2.2.2.2	Indukcija z obdelavo s proteazo K	38
3.2.2.2.3	Indukcija z mehansko obdelavo (intenzivno mešanje)	39
3.2.2.2.4	Indukcija z mehansko obdelavo (Potterjev homogenizator)	39
3.2.2.2.5	Indukcija s predinkubacijo v mešanici aminokislin	39
3.2.2.3	Različni poskusi obdelave spor	39

3.2.2.4	Testiranje vzorcev	41
3.2.2.4.1	Mikroskopiranje	41
3.2.2.4.2	Določanje suhe biomase	42
3.2.2.4.3	Določanje pH, PMV in sedimentacije	42
3.2.2.4.4	Priprava vzorcev za HPLC analizo	42
3.2.3	Mutageneza <i>A. terreus var. aureus</i>	42
3.2.3.1	Priprava spor <i>A. terreus var. aureus</i>	42
3.2.3.2	Mutageneza z UV	43
3.2.3.2.1	Določanje koncentracije 2-deoksi-D-glukoze	43
3.2.3.2.2	Postopek mutiranja z UV	43
3.2.3.2.3	Pregledovanje in selekcija mutant	43
3.2.3.3	Mutageneza s kolhicinom in benomilom	44
3.2.3.3.1	Postopek mutiranja s kolhicinom in benomilom	44
3.2.3.3.2	Pregledovanje in selekcija po mutagenezi s kolhicinom	44
3.2.3.4	Preizkus vpliva koncentracije natrijevega kloroacetata na rast <i>A. terreus var. aureus</i>	45
4	REZULTATI	46
4.1	INDUKCIJA KALITVE SPOR <i>A. terreus var. aureus</i> IN OCENA PRODUKCIJE LOVASTATINA	46
4.1.1	1. poskus (testiranje vzorcev z mikroskopiranjem in določanjem suhe biomase)	46
4.1.2	2. poskus (testiranje vzorcev z mikroskopiranjem in določanjem suhe biomase)	47
4.1.3	3. poskus (testiranje vzorcev z določanjem suhe biomase)	48
4.1.4	4. poskus (testiranje vzorcev s HPLC analizo)	49
4.1.5	5. poskus (testiranje vzorcev s HPLC analizo)	50
4.1.6	6. poskus (testiranje vzorcev s HPLC analizo)	51
4.2	MUTIRANJE <i>A. terreus var. aureus</i> IN OCENA PRODUKCIJE LOVASTATINA	52
4.2.1	Mutiranje <i>A. terreus var. aureus</i> z UV žarki	52
4.2.1.1	Morfologija monospornih kolonij	52
4.2.1.2	Analiza s TLC in biološko testiranje lovastatina z <i>N. crassa</i>	52
4.2.1.3	HPLC analiza	54
4.2.2	Mutiranje <i>A. terreus var. aureus</i> s kolhicinom	54
4.2.2.1	Morfologija kolonij	54
4.2.2.2	Analiza s TLC in HPLC	56
4.2.2.3	Vpliv koncentracije natrijevega kloroacetata na rast <i>A. terreus var. aureus</i>	58

4.2.3	Mutiranje <i>A. terreus var. aureus</i> s kolhicinom in benomilom	59
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	60
5.1	RAZPRAVA	60
5.1.1	Indukcija kalitve spor in njen učinek na produkcijo lovastatina	60
5.1.2	UV mutageneza in selekcija mutant	61
5.1.3	Mutageneza s kolhicinom in benomilom ter selekcija mutant	63
5.2	SKLEPI	64
6	POVZETEK	65
7	VIRI	66
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Uporaba mutagenih dejavnikov pri izboljšavi sevov (Parekh in sod., 2000).	12
Preglednica 2:	Farmakološke lastnosti statinov (Sirtori, 2014).	33
Preglednica 3:	Mikroskopiranje vzorcev s fazno kontrastnim mikroskopom pri 1. poskusu 12 h po indukciji (1000x imerzijska povečava).	47
Preglednica 4:	Suha biomasa vzorcev pri 1. poskusu 24 h po indukciji.	47
Preglednica 5:	Mikroskopiranje vzorcev <i>A. terreus var. aureus</i> 223 s fazno kontrastnim mikroskopom pri 2. poskusu 10 h po indukciji (1000x imerzijska povečava).	48
Preglednica 6:	Suha biomasa vzorcev pri 2. poskusu 24 h po indukciji.	48
Preglednica 7:	Suha biomasa vzorcev pri 3. poskusu 72 h po indukciji.	49
Preglednica 8:	pH, PMV in sedimentacija vzorcev pri 4. poskusu 24 h po indukciji.	49
Preglednica 9:	Morfologija micelija <i>A. terreus var. aureus</i> 223 168 h po indukciji.	49
Preglednica 10:	Relativna vsebnost lovastatina vzorcev pri 4. poskusu glede na kontrolo po HPLC analizi.	50
Preglednica 11:	pH, PMV in sedimentacija vzorcev pri 5. poskusu 24 h po indukciji.	51
Preglednica 12:	Relativna vsebnost lovastatina vzorcev pri 5. poskusu glede na kontrolo po HPLC analizi.	51
Preglednica 13:	pH, PMV in sedimentacija vzorcev pri 6. poskusu 19 h po indukciji.	51
Preglednica 14:	Relativna vsebnost lovastatina vzorcev pri 6. poskusu glede na kontrolo po HPLC analizi.	51
Preglednica 15:	pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po inkubaciji v vegetativnem gojišču.	53
Preglednica 16:	pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po inkubaciji v fermentacijskem gojišču z glukozo in laktozo.	53
Preglednica 17:	Povprečen premer cone inhibicije pozitivnih TLC vzorcev po inkubaciji v fermentacijskem gojišču z glukozo in laktozo pri biološkem testiranju lovastatina z <i>N. crassa</i> v primerjavi s kontrolnimi vzorci.	53
Preglednica 18:	Relativna vsebnost lovastatina pri vzorcih 39 in 60 po inkubaciji v fermentacijskem gojišču z laktozo glede na standardno koncentracijo lovastatina (po internem vrednotenju Službe za	54

	biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).	
Preglednica 19:	pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po selekciji na lovastatinu ter inkubaciji v vegetativnem in fermentacijskem gojišču.	56
Preglednica 20:	pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po selekciji na natrijevem kloroacetatu ter inkubaciji v vegetativnem in fermentacijskem gojišču.	57
Preglednica 21:	Relativna vsebnost lovastatina pri vzorcih mutiranih s kolhicinom glede na standardno koncentracijo lovastatina (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).	57
Preglednica 22:	Relativna vsebnost lovastatina pri vzorcih mutiranih s kolhicinom glede na standardno koncentracijo lovastatina (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).	58
Preglednica 23:	Vpliv koncentracije natrijevega kloroacetata na rast <i>A. terreus</i> var. <i>aureus</i> 3073.	59

KAZALO SLIK

Slika 1:	<i>A. terreus</i> : A: Kolonije na gojišču MEA po enem tednu, B: Podrobnejši posnetek kolonije (povečava 44x), C in D: konidiofori (povečava 920x), E: konidiji (povečava 2330x) (Flannigan in sod., 2013).	3
Slika 2:	Nastanek najbolj toksične in mutagene DNA lezije z UV žarčenjem (Sinha in Häder, 2002).	13
Slika 3:	Nastanek 6-4 fotoproduktov zaradi UV žarčenja. 6-4FP lahko nastanejo na 5'-T-C-3', 5'-C-C-3' in 5'-T-T-3', ne pa tudi na 5'-C-T-3' mestih v DNA (Sinha in Häder, 2002).	13
Slika 4:	Diagram biosinteze holesterola z označenim mestom delovanja statinov na HMG-CoA reduktazo. Biosinteza holesterola je kompleksen proces, ki vključuje več kot 30 encimov (Tobert, 2003).	24
Slika 5:	Aktivno mesto človeške HMG-CoA reduktaze v kompleksu z HMG, CoA in NADP (Istvan in Deisenhofer, 2001).	25
Slika 6:	Strukturna podobnost med HMG-CoA (levo) in statinom (Roche, 2005).	27
Slika 7:	Strukture obročev pri statinah od leve proti desni: heksahidronaftilen, pirol, indol, pirimidin, piridin, kinolin (Roche, 2005).	28
Slika 8:	Strukturne formule nekaterih statinov od leve proti desni: kompaktin in simvastatin (oba tip 1) ter fluvastatin, cerivastatin, atorvastatin in rosuvastatin (vsi tip 2). HMG podobni del, ki je ohranjen pri vseh statinah je rdeče barve (Istvan in Deisenhofer, 2001).	28
Slika 9:	Vezava rosuvastatina na HMG-CoA reduktazo (Istvan in Deisenhofer, 2001).	29
Slika 10:	Pot biosinteze lovastatina. Koraki, ki vključujejo PKS so v okvirjih s prekinjeno črto (Campbell in Vederas, 2010).	31
Slika 11:	Simvastatin (levo) in pravastatin (desno) (Sirtori, 2014).	31
Slika 12:	Fluvastatin (zgoraj levo), atorvastatin (zgoraj desno), rosuvastatin (spodaj levo) in cerivastatin (spodaj desno) (Istvan in Deisenhofer, 2001).	32
Slika 13:	Pitavastatin (Sirtori, 2014).	32
Slika 14:	Sev <i>A. terreus</i> var. <i>aureus</i> 223 7,5 h po indukciji s temperaturnim šokom 5 min na 80 °C, 1000x imerzijska povečava.	46
Slika 15:	Sev <i>A. terreus</i> var. <i>aureus</i> 223 168 h po indukciji s temperaturnim šokom 5 min na 50 °C, 1000x imerzijska povečava.	50
Slika 16:	Morfološka raznolikost monospornih kolonij <i>A. terreus</i> var. <i>aureus</i> 2886 po UV mutagenezi, selekciji z 2-deoksi-D-glukozo ter 14 dnevni	52

inkubaciji na gojišču LVB z glukozo; vzorci 1, 7, 20, 21, 38 in 39 od leve proti desni in od zgoraj navzdol.

- Slika 17: Morfologija kolonij *A. terreus var. aureus* 3073 po mutagenezi s kolhicinom ter selekciji z lastnim metabolitom na gojiščih LVB z lovastatinom v končnih koncentracijah 0,5 g/l, 0,75 g/l, 1 g/l od leve proti desni (po 7 dnevni inkubaciji). 54
- Slika 18: Morfološka raznolikost monospornih kolonij *A. terreus var. aureus* 3073 po mutagenezi s kolhicinom ter selekciji z lastnim metabolitom po 14 dnevni inkubaciji na gojišču LVB z lovastatinom v končni koncentraciji 1 g/l. 55

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-dog ^R	mutanta rezistentna na 2-deoksiglukozo
6-4FP	6-4 fotoprodukti
7-ACA	7-aminocefalosporanska kislina
AK	aminokislina
AT	adenin-timin
BIC	n-butilizocianat
CHO	ovarij kitajskega hrčka (angl. Chinese hamster ovary)
CoA	koencim A (angl. coenzyme A)
CPD	ciklobutan-pirimidinski dimeri
CREA	gojišče s kreatinom, sukrozo in agarjem (angl. creatine sucrose agar)
CSL	koruzni sirup (angl. corn steep liquor)
DAOC	deacetoksicefalosporin
DH	dehidrataza
DOG	2-deoksiglukoza
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
FAS	maščobnokislinske sintaze (angl. fatty acid synthase)
FDA	Zvezni urad za živila in zdravila (angl. Food and Drug Administration)
FGSC	Fungal Genetics Stock Center
GC	gvanin-citozin
GTP	gvanozin trifosfat
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high-performance liquid chromatography)
IC ₅₀	molarna koncentracija statina, ki je potrebna za polovično inhibicijo encima
IPP	izopentil pirofosfat
KR	ketoreduktaza
KS	β-ketosintaza
LDL	lipoproteini z nizko gostoto (angl. low-density lipoprotein)
LVB	gojišče z laktozo, koruznim sirupom, kvasom protevit in sojino moko
MBC	metil 2-benzimidazol karbamate (angl. methyl benzimidazol-2-carbamate)
MCD	modificirano gojišče Czapek Dox
MEA	gojišče s sladnim ekstraktom in agarjem (angl. malt extract agar)
MT	metil transferaza
MYA2	gojišče s sladnim in kvasnim ekstraktom (angl. malt yeast extract agar)
NADP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (angl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NADPH	reduciran nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NRPS	neribosomske peptidne sintaze
OATP	membranski polipeptid, ki prenaša organske anione (angl. organic anion-transporting polypeptide)
ORF	odprt bralni okvir (angl. open reading frame)
PDA	gojišče s krompirjem, dekstrozo in agarjem (angl. potato dextrose agar)
PKS	poliketidne sintaze
PMV	delež skupnega volumena gojišča, ki ga zaseda micelij po centrifugaciji (angl. packed mycelial volume)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
SAM	S-adenozil-L-metionin
SDA	gojišče z dekstrozo, peptonom in agarjem (angl. Sabouraud dextrose agar)
sed	sedimentacija
SMURF	iskalnik genov za biosintezo sekundarnih metabolitov (angl. secondary metabolite unique regions finder)
t _{1/2β}	eliminacijski razpolovni čas (faza beta)
TLC	tankoplastna kromatografija (angl. thin-layer chromatography)
TLG	gojišče z laktozo, glicerolom in polietilen sorbitol estrom (angl. tween lactose glycerol)
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina
TWEEN 80	polietilen sorbitol ester
UV	ultravijolično

1 UVOD

Nitasta gliva *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) je najpomembnejši producent lovastatina, ki se v medicini uporablja kot zdravilo za zniževanje holesterola v krvi. Producija lovastatina poteka v fermentacijskem gojišču pri submerzni kultivaciji (Hoog in sod., 2000; Samson in sod., 2000). Morfološke značilnosti pri submerzni rasti vplivajo na reologijo fermentacijske brozge in se neposredno odražajo v produkciji sekundarnega metabolita (El-Enshasy, 1998).

Premer spor pri askomicetah ustreza logaritemsko normalni porazdelitvi (Otsuka in sod., 2014). Kalitev spor poteka neuskajeno, ker se klične hife najprej pojavijo pri večjih sporah. Sinhronizacija kalitve spor je dejavnik, ki lahko pozitivno vpliva na produkcijo lovastatina.

Klasičen pristop izboljšanja produkcije sekundarnih metabolitov pri gostiteljskih organizmih je še vedno močno prisoten v fermentacijski industriji. Metoda vključuje naključno mutagenezo producentskega seva ter selekcijo mutant s povečano produkcijo želenega sekundarnega metabolita. UV žarčenje inducira mutacije kot sta dimerizacija pirimidinov in prečne povezave v DNA (fotoproduct 6-4) ter na DNA povzroči poškodbe v obliki transverzij, delecij, premika bralnega okvirja in tranzicije GC v AT (Parekh in sod., 2000). Kolhicin inducira poliploidijo in spremembe v strukturi kromosomov kot so delecije, prelomi, fragmentacija (Arni in Hertner, 1997). Benomil povzroča aneuploidijo, genske mutacije in strukturne spremembe kromosomov (McCarroll in sod., 2002).

Za selekcijo mutant lahko uporabimo različne načine pregledovanja izolatov, od naključnega pregledovanja do predselekcije z izvajanjem seleksijskega pritiska. Za kvantitativno analizo vsebnosti lovastatina pri izbranih izolatih smo uporabili HPLC.

1.1 NAMEN RAZISKAVE

S selekcijo mutiranih mikrobnih izolatov pridobivamo seve z izraženimi želenimi lastnostmi, kot so na primer: avksotrofija, odpornost ali občutljivost na nekatere substance, boljša proizvodnja sekundarnih metabolitov, spremembe v strukturi kolonij ter peletne rasti v tekočih gojiščih. Pri raziskavi smo preučevali vpliv različnih tehnik mutageneze na morfologijo glive *A. terreus var. aureus* in njeno produkcijo lovastatina. Uporabili smo mutagenezo z obsevanjem z UV žarki ter obdelavo s klastogenimi in aneugenimi substancami. Pri selekciji kolonij mutirane celične populacije smo se osredotočili na njihove morfološke in fiziološke lastnosti, čemur je sledil izbor s pomočjo seleksijskega pritiska (analogi virov ogljika, lasten metabolit, toksične snovi) ter ocena vsebnosti lovastatina s pomočjo TLC, HPLC in biološkega testiranja.

Preučevali smo tudi sinhronizacijo kalitve spor pri glivi *A. terreus var. aureus* ter njen učinek na produkcijo lovastatina. Za obdelavo spor v predfermentorski fazni smo uporabili različne postopke: temperaturni šok, obdelava s proteolizni encimi, mehanska obdelava in inkubacija v mešanici aminokislin.

1.2 GLAVNE HIPOTEZE

Raziskava temelji na sledečih hipotezah:

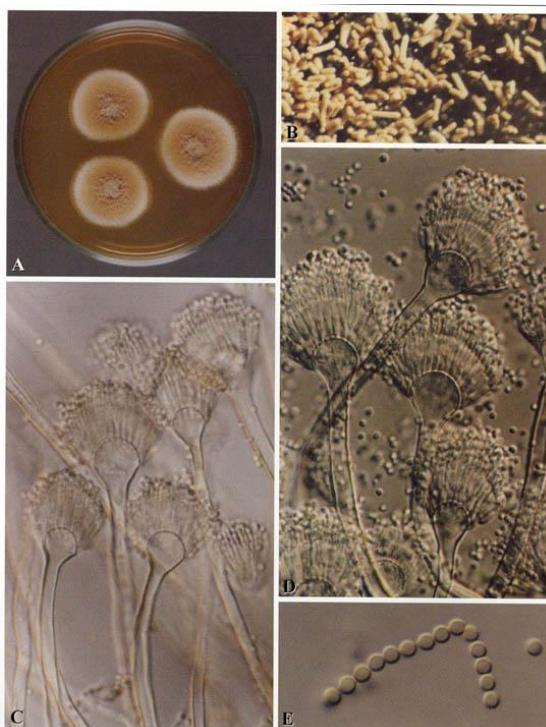
- Različni postopki obdelave glivnih spor lahko vzpodbudijo razgradnjo hidrofobnega ovoja spor, kar lahko posledično pospeši in sinhronizira kalitev spor ter vpliva na produkциjo lovastatina.
- UV žarki, kolhicin in benomil povzročajo genske mutacije pri glivah in tudi pri *A. terreus var. aureus*. Ena od posledic je lahko deregulacija metabolizma in rezistanca na katabolno represijo ter posledično povečana produkacija lovastatina.
- Mutante glive *A. terreus var. aureus* s pridobljeno rezistenco na lasten metabolit in natrijev kloroacetat bodo posledično morda izkazovale tudi povečano produkcijsko lovastatin.
- Kolhicin pri glivah in tudi pri *A. terreus var. aureus* povzroča avtopoliploidijo, benomil pa delecijo kromosomov in gensko rekombinacijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVA *Aspergillus terreus*

A. terreus taksonomsko uvrščamo med askomicete: Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotales; Aspergillaceae; *Aspergillus*; sekcija Terrei. Rod *Aspergillus* smo uvrščali v družino Trichocomaceae, dokler Houbraken in Samson (2011) nista predlagala razdelitve Trichocomaceae v tri ločene družine: Trichocomaceae, Thermoascaceae in Aspergillaceae, kamor spada tudi *Aspergillus*.

A. terreus je nitasta gliva, ki raste na agarskem gojišču Czapek v obliki rumeno rjave do cimetno rjave kolonije z gosto plastjo konidioforjev, ki temnijo s starostjo. Konidijske glavice so kompaktne, stebričaste, velike 150-500 µm x 30-50 µm s podolgovatimi vezikli premera 10-20 µm. Konidijske celice so biseriatne z metulami velikosti 5-7 µm x 2,0-2,5 µm in fialidami velikosti 5-7 µm x 1,5-2,0 µm. Konidiji imajo gladke stene, so kroglasti do elipsoidni, brezbarvni do rahlo rumenkasti s premerom 1,5-2,5 µm (Hoog in sod., 2000; Samson in sod., 2000). Vse vrste znotraj sekcije Terrei so bile prvotno obravnavane kot strogo anamorfne. Arabatzis in Velegaki (2013) sta leta 2013 prvič objavila primer spolnega cikla pri *A. terreus*.



Slika 1: *A. terreus*: A: Kolonije na gojišču MEA po enem tednu, B: Podrobnejši posnetek kolonije (povečava 44x), C in D: konidiofori (povečava 920x), E: konidiji (povečava 2330x) (Flannigan in sod., 2013).

Kolonije na agarskem gojišču Czapek zrastejo pri 25 °C do premera 3,5-5,0 cm v sedmih dneh. Na gojišču MEA rastejo podobno, vendar hitreje z gostejšo sporulacijo, medtem ko na gojišču CREA rastejo slabo (Hoog in sod., 2000; Samson in sod., 2000).

A. terreus je v fermentacijski industriji pomemben producent lovastatina, ki se ga v medicini uporablja za zniževanje holesterola v krvi. Poleg lovastatina proizvaja *A. terreus* še nekatere druge metabolite: terrein, patulin, citrinin, citreoviridin. *A. terreus* najpogosteje najdemo v zemlji, pogost pa je tudi v začimbah in krmi (Hoog in sod., 2000; Samson in sod., 2000).

2.2 SUBMERZNA RAST NITASTIH GLIV

2.2.1 Kalitev spor

Življenjski ciklus pri nespolnem razmnoževanju askomicet lahko razdelimo v tri faze: kalitev spor, vegetativna rast in konidiogeneza. Kalitev spor vodi v nastanek hitro rastoče hife (Mahadevan in Tatum, 1967). V vegetativni faziji se hife podaljšujejo z apikalno rastjo. Aktivni so procesi: podvojevanje DNA, ekspresija encimov za razgradnjo in sintezo celične stene ter transport podenot celične stene. Materinska in hčerinska celica se delita in septirata. Z naraščajočim številom rastočih apeksov prihaja do razvejanja hif, njihovega prepletanja in nastanka micelija. V tej faziji je značilna eksponentna rast celotne dolžine micelija. (Gradivo, 2014)

Konidiogeneza je proces nastanka negibljivih nespolnih spor (konidijev). Konidiji se tvorijo na konidiogenih celicah na konidioforju. Konidiji lahko nastanejo iz hife na dva načina:

1. Talična konidiogeneza: najprej zraste hifa, ki se predeli s prečnimi stenami in razpade v posamezne oglate enote (artrokonidiji).
2. Blastična konidiogeneza: na hifi se oblikuje konidiogena celica, na kateri v obliki brsta nastane nova spora oziroma konidij (blastokonidiji) (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Kalitev spor lahko razdelimo v tri faze:

1. Aktivacija: Okoljski dejavniki, ki sprožijo kalitev spor se lahko razlikujejo med različnimi vrstami in tudi med tipi spor znotraj vrste. Univerzalni dejavniki, ki aktivirajo kalitev so kisik, voda in ogljikov dioksid, dodatni faktorji vezani na določeno okolje pa so predvsem nutrienti z nizko molekulsko maso (sladkorji, aminokisline) in anorganske soli (Carlile in Watkinson, 1994; Griffin, 1994, cit. po D'Enfert, 1997).
2. Izotropna rast (nabrekanje): Prva morfološka spremembra, ki jo lahko opazimo pri kalitvi spor je vnos vode in rast celične stene (Griffin, 1994, cit. po D'Enfert, 1997). Sprožijo se številne metabolne aktivnosti vključno z dihanjem ter RNA in proteinsko sintezo. Premer celic v primerjavi z dormantnimi sporami se poveča za faktor dva in več (Van Etten in sod., 1983, cit. po D'Enfert, 1997).
3. Polarizirana rast: Na določeni stopnji kalitve pride do polariziranega prerazporejanja celične stene in nastanka klične hife. Za zaključek kalitve in začetek vegetativne rasti smatramo stanje, ko sta širina in dolžina klične hife enaki (D'Enfert, 1997). Procesi značilni za kalitev se lahko pojavijo tudi, ko je klična hifa že oblikovana (Schmit in Brody, 1976).

Kalitev se prične takoj, ko pride spora v stik z vodo. Hidratacija predvidoma ne potrebuje energije in povzroči izgubo zunanje hidrofobne plasti, razapljanje ekstracelularnih encimov ter vnos vode. Spremembe, ki potekajo znotraj celične stene potrebujejo notranji

ali zunanji vir energije (Schmit in Brody, 1976). Pojav klične hife zahteva zunanji vir ogljika in nekatere anorganske soli (Mirkes, 1974).

Kalitev spor ni sinhronizirana, zato se procesi prekrivajo. Določene spore imajo na primer že klično hifo medtem, ko so ostale še v fazi nabrekanja. Pri nitasti glivi *Neurospora crassa* (*N. crassa*) se hidratacija zgodi prej kot v 2 min po inokulaciji v tekoče gojišče. Kalitvena hifa se praviloma pojavi najprej pri največjih sporah po približno 2,5 h. Na oblikovanje kalitvene hife vplivajo: izbira seva, starost spor, sestava gojišča, temperatura, koncentracija spor. Po 5 h inkubacije na stresalniku v minimalnem gojišču z glukozo pri 22 °C ima večina spor klično hifo. Sinteza makromolekul se prične pred pojavom hife, na kar kaže 1,6-krat povečana suha biomasa po 2,5 h. Povprečna dolžina hife se povečuje eksponentno s približno enakim podvojitvenim časom kot teža suhe biomase. Biokemijske procese med kalitvijo lahko razdelimo v tri skupine glede na čas, ko se ti procesi odvijajo:

1. V prvih 20 min pride do izgube topotne odpornosti, razgradnje proste glutaminske kisline, nastanka asparaginske in γ -aminobutanojske kisline, redukcije NADP in oksidiranega glutationa, iniciacije RNA in proteinske sinteze.
2. V času nastanka klične hife pride do iniciacije DNA sinteze in delitve jeder, oksidativne fosforilacije v mitohondrijih, transporta encimov v mitihondrije, povišanega nivoja arginina in ornitina.
3. V končni fazni kalitvi pride do sinteze in akumulacije hitina ter polimerov z galaktozaminom v celični steni.

Nekateri od teh procesov so omejeni na fazo kalitve (hkratna razgradnja glutaminske kisline in nastanek asparaginske kisline, redukcija večine NADP v NADPH, redukcija oksidiranega glutationa in izguba topotne rezistence), ostali pa so prisotni tudi med vegetativno rastjo (Schmit in Brody, 1976).

Pri rasti *N. crassa* v minimalnem gojišču z glukozo je kalitev spor asinhrona. Klične hife se najprej pojavijo pri večjih sporah verjetno zaradi njihove večje zmožnosti za sintezo proteinov, RNA,... Hidratacija in drugi procesi vključeni v začetno fazo kalitve so predvidoma v veliki meri sinhronizirani. Sinhronizacijo kalitve so dosegli s predhodno inkubacijo spor, najprej v minimalnem gojišču z 3,22 M etilen glikolom za 49 h, nato pa še v gojišču z 10-kratno razredčenim etilen glikolom za 35 min. Po 25 do 35 min se je približno 70 % sporov pojavila klična hifa. Inkubacija spor pri visokih koncentracijah etilen glikola ali glicerola inhibira kalitev spor, ne pa tudi njihovega nabrekanja in nekaterih procesov iz zgodnje faze kalitve (Bates in Wilson, 1974). Prav tako pride do nabrekanja spor brez nastanka klične hife pri inkubaciji na minimalnem gojišču z glukozo in 1 mM cisteinom. Z odstranitvijo cisteina bi lahko sinhronizirali kalitev spor (Schmit in Brody, 1976). Poskusi sinhronizacije kalitve s temperaturnimi šoki so se izkazali za neuspešne (Bianchi in Turian, 1967).

2.2.2. Morfološke značilnosti

Morfološke značilnosti nitastih mikroorganizmov, ki imajo pomemben vpliv na reološke lastnosti fermentacijske brozge, se neposredno odražajo v produkciji in izločanju različnih mikrobnih metabolitov. Pri submerzni rasti lahko morfologija nitastih gliv variira od diskretnih kompaktnih peletov hif do homogeno razpršenega micelija. Morfološke razlike so tesno povezane z razlikami v kinetiki rasti in fiziologiji. Dispergirana rast (razpršen

micelij) je ekvivalentna enocelični, s homogeno porazdelitvijo biomase, substrata in produktov ter konstantno eksponentno rastjo, ko je substratov v prebitku (El-Enshasy, 1998).

Filamentozna oblika micelija lahko povzroči zapletanje hif, tako da postane gojišče zelo viskozno in nenewtonsko. V regijah z visoko strižno hitrostjo (v bližini rotorja) je nizka viskoznost, v regijah blizu stene pa zelo visoka. Visoka viskoznost in psevdoplastičnost suspenzije zmanjuje prenos mase, topote in otežuje mešanje. Le majhen del bioreaktorja (okrog rotorja) vzdržuje optimalno stanje. Povečano mešanje izboljša homogenost, vendar je energetsko potratno in pogosto poškoduje celice zaradi velikih strižnih sil (Van Suijdam in Metz, 1981; Braun in Vecht-Lifshitz, 1991). Makroskopske lastnosti peletne oblike rasti so bolj ugodne za gojenje nitastih gliv v tekočih gojiščih. Najpomembnejše prednosti so zmanjšanje viskoznosti, newtonske lastnosti gojišča z dobrim prenosom mase in topote ter lažje ločevanje tekočine od biomase (Van Suijdam in sod., 1980). Makroskopske lastnosti gojitvenega medija s peletno glivno rastjo kažejo homogenost v reoloških značilnostih. Na mikroskopskem nivoju pa peleti kažejo določeno heterogenost zaradi oblikovanja con z različno hifno gostoto znotraj peletov (Kobayashi in sod., 1973; König in Schügerl, 1982; Lawton in sod., 1989; Buschulte in sod., 1991; Pottel in Bellgardt, 1992, cit. po El-Enshasy, 1998). Dokler obstaja zadostna oskrba s kisikom v vseh peletnih celicah, se peletu povečuje gostota in velikost. Po določenem času, pade koncentracija kisika v središču peleta na skoraj nič, kar omeji celično rast na cono ob površini peleta. Omejitev oskrbe s kisikom in odstranjevanja metabolnih produktov lahko vodi do sprememb celičnega metabolizma in kinetike encimske ekskrecije (Hermersdörfer in sod., 1987). Studije proizvodnje penicilina z uporabo peletov glive *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*) kažejo visoko rezistenco na prenos znotraj velikih peletov, kar povzroči pomanjkanje kisika in avtolizo celic v središču peleta. Debelina sloja, ki vsebuje žive celice je konstantna, ne glede na velikost peleta (Schügerl in sod., 1983; Wittler in sod., 1986). Pri dovolj majhnih peletih (v premeru manjši od 400 µm) metabolno aktivna plast zajema celoten pelet in vse celice imajo na voljo dovolj kisika (El-Enshasy, 1998).

Morfologija samega peleta vpliva na mikrobnou rast, pri čemer ločimo dve skrajnosti. Prva je rast v peletih, ki sestojijo iz gosto pakiranih hif, kjer je rast omejena z difuzijo snovi iz tekoče faze do sredine peleta in je neomejena rast možna le pri hifah v zunanjji coni. Naraščanje biomase (M) v fermentorju določimo po naslednji formuli:

$$M^{1/3} = kt + M_0^{1/3} \quad \dots(1)$$

kjer M_0 predstavlja začetno biomaso, k konstanto, t pa čas. Če predpostavimo, da kultura vsebuje konstantno število n sferičnih peletov, z enakim polmerom r in gostoto ρ , z aktivno zunanjo cono debeline w ter specifično hitrostjo rasti hif μ , potem konstanto k določimo po naslednji formuli:

$$k = (4/3 \pi \rho n)^{1/3} \mu w \quad \dots(2)$$

Konstanta k predstavlja stopnjo, s katero se povečuje radij peleta zaradi rasti. Ko pelet preseže določeno velikost se predpostavlja, da je rast omejena na periferno cono debeline w , zaradi omejene stopnje penetracije rast omejujočih nutrientov. Druga skrajnost je

dispergirana rast, kjer je micelij manj kompakten, bolj odprt in bolj filamentozen. V tem primeru z mešanjem dosežemo, da nutrienti in kisik dospejo do vseh hif, kar omogoča eksponentno rast celotne biomase. Biomaso določimo po naslednji formuli:

$$M = e^{\mu t} M_0 \quad \dots(3)$$

Takšno rast je lažje kontrolirati, saj se izpostavljene hife takoj odzovejo na spremenjene pogoje pri manipulaciji gojišča. Slabost bolj filamentozne rasti je povečana viskoznost. Možnost kontrole glivne morfologije v tekočih gojiščih je pomembna pri producentih sekundarnih metabolitov, saj lahko sama morfologija močno vpliva na končni donos (El-Enshasy, 1998).

Glede na mehanizem nastanka, ločimo tri tipe peletov: koagulativne, nekoagulative in pelete, ki nastanejo preko aglomeratov. Koagulativen tip nastane z aglomeracijo spor v zgodnji fazi razvoja (med kalitvijo), kar privede do mreže prepletenih hif. Tipičen primer je gliva *Aspergillus niger*. Pri nekoagulativem tipu ena spora povzroči nastanek enega peleta, tako da je število peletov enako številu spor v inokulumu. V to skupino spadajo nekatere vrste bakterij *Streptomyces*. Pri tretjem tipu nastane pelet iz aglomerata hif. Predstavnik tretjega tipa je *P. chrysogenum* (Nielsen, 1996).

Na submerzno rast nitastih gliv vplivajo naslednji dejavniki:

1. Od seva odvisni dejavniki: vrsta seva, količina in tip inokuluma, tip agregacije, sestava celične stene, hitrost rasti.
2. Sestava gojišča: vrsta in koncentracija vira ogljika, vir dušika in fosfata, C/N razmerje, prisotnost trdnih delcev, dodatki kompleksnih organskih spojin, polimerov, surfaktantov, dvovalentnih kationov,...
3. Pogoji kultivacije: pH, temperatura, dostopnost kisika, raztopljeni CO₂, mehanske sile, oblika bioreaktorja, ... (Elmayergi in sod., 1973; Mitard in Riba, 1988; Hotop in sod., 1989; Smith in sod., 1990; Nielsen in sod., 1995).

Visoka koncentracija spor v inokulumu načeloma povzroči disperzno rast micelija. Prav tako disperzno rast običajno povzroči visoka koncentracija hranil. Pomanjanje enega od substratov (N, O₂) inducira peletno rast. CO₂ ima močan vpliv na morfologijo: bolj razvezjane, zadebeljene hife in celične stene (sinteza hitina). Pri mešanju zelo velike strižne sile vodijo v fragmentacijo hif, kar vpliva na metabolizem in reologijo gojišča. Nehomogenost fermentacijske brozge v bioreaktorjih in tudi v laboratorijskem merilu povzroči nastanek mirujočih predelov s pomanjkanjem hranil in diferenciacijo celic (Gradivo, 2014). Mnogi dejavniki vplivajo eden na drugega, tako da jih ne moremo obravnavati ločeno. Oblika bioreaktorja na primer vpliva na prenos kisika in mehanske sile (Elmayergi in sod., 1973; Mitard in Riba, 1988; Hotop in sod., 1989; Smith in sod., 1990; Nielsen in sod., 1995).

Način prezračevanja (zrak ali zrak obogaten s kisikom) in hitrost stresanja (300-800 rpm) imata velik vpliv na morfologijo, premer peletov in produkcijo lovastatina pri submerzni rasti *A. terreus*. Pri hitrosti stresanja nad 600 rpm pride do poškodb peletov ter zmanjšanja njihovega premera iz 1200 µm na 900 µm. Pri nizki hitrosti stresanja in prezračevanju z zrakom obogatenim s kisikom nastanejo peleti s premerom 2500 µm in visoko produkcijo

lovastatina. Majhni peleti imajo nizko produkcijo lovastatina ne glede na način prezračevanja. Peleti z manj kompaktno, bolj odprtto in filamentozno morfologijo so boljši producenti lovastatina v primerjavi z manjšimi, gostejšimi peleti (Casas Lopez in sod., 2005).

2.3 METABOLNA REGULACIJA FERMENTACIJSKIH PROCESOV

Producija sekundarnih metabolitov se prične ob koncu vegetativne rasti in praviloma poteka preko stacionarne faze (idiofaza). Za razliko od primarnih, sekundarni metaboliti niso nujno potrebni za rast in razmnoževanje. Pri sekundarnih metabolitih je možen nastanek njihove prekomerne produkcije (Madigan in Martinko, 2006). Regulatorni mehanizmi omejujejo prekomerno produkcijo in izločanje v okolje. Namen industrijske fermentacije pa je izolirati seve s prekomerno produkcijo, jih dodatno deregulirati in s tem omogočiti velike donose želenega produkta kot so metaboliti ali encimi. Deregulacijo producentskih organizmov dosežemo z manipulacijo hrani ter naključno ali usmerjeno mutagenezo regulatornih genov. Glavni mehanizmi, ki so vpletjeni v regulacijo fermentacijskih procesov so: indukcija, regulacija z viri ogljika, dušika in fosforja ter kontrola s povratno zvezo (Sanchez in Demain, 2002).

2.3.1 Regulatorni mehanizmi vključeni v biosintezo produktov fermentacije

2.3.1.1 Indukcija

Mikroorganizmi so v naravi izpostavljeni kemičnim in fizikalnim pogojem okolja, ki se stalno spreminjajo. Na določeno stanje v okolju se mikroorganizem lahko prilagodi s spremembami v koncentracijah strukturnih proteinov, transportnih proteinov, toksinov, encimov, ... Koncentracija encima ali metabolita v celici je pogosto odvisna od prisotnosti specifične spojine oziroma induktorja. Induktor sproži produkcijo encima ali metabolita le, ko je to potrebno. Induktor se veže z represorjem, ga s tem inaktivira in mu prepreči blokado operatorja, s čimer je RNA polimerazi omogočena transkripcija gena encima (Sanchez in Demain, 2002). Velikokrat je induktor tudi substrat za ta encim, na primer laktoza za β galaktozidazo (Kaempfer in Magasanik, 1967). S pridobivanjem konstitutivnih mutant, ki nimajo inducijske kontrole, lahko znatno zmanjšamo stroške fermentacije pri komercialni produkciji encimov (Demain, 1971; Parekh in sod., 2000).

Pri številnih biosintetskih poteh so aminokisline induktorji pri produkciji sekundarnih metabolitov, kot na primer glutamat pri nastanku penicilina G pri *P. chrysogenum* (Lara in sod., 1982).

2.3.1.2 Katabolna represija

Viri ogljika kot so škrob, glukoza ali melasa se pogosto uporabljajo kot substrati za rast pri produkciji encimov, antibiotikov in drugih sekundarnih metabolitov s fermentacijo. Katabolna represija je regulatorni mehanizem mikroorganizmov, ki omogoča organizirano in postopno porabo virov ogljika, kadar jih je v okolju prisotnih več. V tem primeru celica najprej katalizira vir ogljika, s katerim najhitreje pridobi ogljik in energijo za rast, na primer glukozo. Hkrati pride do represije sinteze različnih encimov, ki so potrebni pri

presnovi ostalih substratov, dokler ni vir glukoze do konca izčrpan. Pri bakterijah in glivah poznamo veliko encimov in sekundarnih metabolitov reguliranih s katabolno represijo (Sanchez in Demain, 2002). Producija α -amilaze pri glivi *Aspergillus oryzae* je represirana z glukozo in acetatom (Barbesgaard in sod., 1992). Biosinteza β -laktamskega antibiotika cefalosporina C pri glivi *Acremonium chrysogenum* (*A. chrysogenum*) je prav tako represirana z glukozo. V tem primeru pride do zmanjšane transkripcije biosintetskih genov *pcbC* in *cefEF*. Pri sevu s povečano produkcijo cefalosporina C pa do zmanjšanja koncentracije produkta *pcbC* ne pride, kar kaže na povezavo med deregulacijo katabolne represije in izboljšavo seva (Jekosch in Kück, 2000).

Gram-pozitivne bakterije *Streptomyces* so pri produkciji sekundarnih metabolitov občutljive na katabolno represijo z glukozo, zato se pri fermentaciji ponavadi kot vir ogljika uporablajo polisaharidi (škrob), oligosaharidi (laktoza) in maščobe (sojino olje). V gojiščih, ki vsebujejo mešanico hitro porabljajočih virov ogljika in počasi porabljajočih virov ogljika se prvi porabijo za namnožitev celic ob majhni produkciji sekundarnih metabolitov, drugi pa nato v sledeči idiofazi (Ozcengiz in sod., 1990).

Povečanje produkcije metabolitov reguliranih s katabolno represijo lahko dosežemo z znižanjem koncentracije represivnega vira ogljika, ki ga dodajamo pri fermentaciji. Šaržna kultura z dohranjevanjem se pri industrijski fermentaciji uporablja, ker lahko koncentracijo omejujočega substrata ohranjamo na nizkem nivoju s čimer se izognemo represivnemu učinku visoke koncentracije substrata - to velja za proizvodnjo tistih produktov, ki niso vezani na rastno fazo, kot je to primer s sekundarnimi metaboliti. Primer gojenja z dohranjevanjem je produkcija penicilina. Ključen dejavnik je primerna hitrost dohranjevanja. Med fazo aktivne rasti lahko presežek glukoze povzroči nastanek kislin in večjo potrebo po kisiku kot jo lahko zagotovi fermentor. Po drugi strani pa pomanjkanje glukoze lahko vodi v porabo organskih dušikovih spojin v mediju kot vir ogljika, s čimer se zviša pH in nastane neustrezna biomasa (Stanbury in sod., 1995).

2.3.1.3 Regulacija z dušikom in fosfatom

Tako kot pri katabolni represiji z viri ogljika, imajo mikroorganizmi senzorne in regulatorne mehanizme, ki jim omogočijo porabo najboljšega dostopnega vira dušika, hkrati pa represijo presnove ostalih virov dušika. Regulacija z dušikom vpliva na sintezo industrijsko pomembnih encimov, ki nastanejo s primarnim ali sekundarnim metabolizmom (Merrick in Edwards, 1995; Shapiro, 1989). Producija sekundarnih metabolitov je inhibirana z viri dušika, ki se uporabljajo za fazo rasti, na primer amonijeve soli. Pri fermentacijskih gojiščih se kot vir dušika zato uporabljajo proteini ali aminokisline (prolin) (Sanchez in Demain, 2002).

Anorganski fosfat je v naravnem okolju eden glavnih rast omejujoč nutrientov. Pri produkciji sekundarnih metabolitov deluje anorganski fosfat kot inhibitor ali represor fosfataz, ki so vključene v številne biosintetske poti (Mansouri in sod., 1989).

2.3.1.4 Regulacija s povratno zvezo

Regulacija s povratno zvezo je mehanizem samokontrolne metabolnih in biosintetskih poti. Mehanizem lahko regulira aktivnost obstoječih encimov (povratna inhibicija) ali pa ustavi njihovo sintezo (povratna represija). Vloga regulacije s povratno zvezo pri kontroli primarnega in sekundarnega metabolizma je dobro poznana. Industrijsko pomembni primarni metaboliti kot so aminokisline, nukleotidi in vitamini so regulirani na ta način. Mnogi sekundarni metaboliti inhibirajo ali so represorji lastne biosinteze. Kanamicin deluje kot represor acetiltransferaze vključene v njegov biosintetski proces, kloramfenikol je represor arilamin sintetaze (Sanchez in Demain, 2002), anhidrotetraciklin oksigenaza je inhibirana s strani tetraciklina (Behal in sod., 1983), gramicidin S inaktivira gramicidin S sintetazni kompleks,... (Stramondo in sod., 1981).

2.4 PRISTOPI ZA IZBOLJŠANJE PRODUKCIJE SEKUNDARNIH METABOLITOV

Komercialen uspeh fermentacijskega procesa je odvisen od profitabilnosti produkta na trgu. Pri tem so ključni stroški izdelave na enoto produkta (Parekh, 1999, cit. po Parekh in sod., 2000). Ena od poti, ki vodi k zmanjšanju stroškov fermentacije je izboljšanje samega delovanja fermentorja do njegovega optimuma Z ekonomskega vidika pa je še bolj zanimiva možnost izboljšave producentskega organizma. Izbera seva, ki proizvede več produkta iz iste količine surovine lahko zadovolji povečane zahteve po proizvodnji brez uporabe dodatnih fermentorjev ozziroma bioreaktorjev. Po drugi strani pa lahko na ta način sprostimo del kapacitet in sprožimo fermentacijo kakšnega drugega produkta. Prav tako lahko znatno znižajo stroške sevi, ki so sposobni izkoriščati cenejše snovi, na primer škrob (Parekh in sod., 2000).

Metabolne poti pri industrijski fermentaciji so večinoma zapletene, še posebej pri produkciji sekundarnih metabolitov. Ob pomanjkljivem znanju o fiziologiji in genetiki teh procesov, se je metoda naključne mutageneze s selekcijo izkazala kot učinkovit pristop k izboljšavi producentskega organizma (Parekh, 1999, cit. po Parekh in sod., 2000). Te metode se še danes uspešno uporabljajo, čeprav so v večini primerov zelo zamudne zaradi pregledovanja velikega števila mutant (Khetan, 1999). Klasičen način spremnjanja mikroorganizmov torej temelji na naključnem mutiranju ter kasnejši selekciji mutant in je bil v preteklosti že zelo uspešen. Znan je primer 4000-krat povečane produkcije penicilina glede na izhodni organizem (Peberdy, 1985, cit. po Parekh in sod., 2000). Novejši pristopi vključujejo metode kot so transpozicijska mutageneza, genska rekombinacija s fuzijo protoplastov, tehnike rekombinantne DNA, usmerjena evolucija (Demain in Adrio, 2008; Baltz, 2001), t. i. »omike« (genomika, metabolomika, transkriptomika, proteomika) (Kumar Chaudhary in sod., 2013; Zhou in sod., 2011; Karničar in sod., 2016) in druge. Današnje tehnike izboljšanja sevov združujejo tako klasične metode, kot tudi sodobna dognanja molekularne genetike in biokemijskega inženiringa.

Pri izboljšavi producentskih organizmov stremimo k sledečim ciljem: učinkovita asimilacija poceni surovin, sprememba razmerij v prid želenim produktom in eliminacija stranskih produktov, izboljšano izločanje produkta, večja toleranca do visokih koncentracij produktov, kratek čas fermentacije ter povečana produkcija lastnih ali tujih produktov po genski modifikaciji. (Parekh, 2000). Povečana produkcija metabolitov je lahko posledica:

- povišane koncentracije prekurzorjev,
- pomnoževanja, modifikacije ali delecije regulatornih genov,
- spremenjanja promotorjev, terminatorjev in regulatornih sekvenc,
- povečanja števila kopij genov za hitrost omejujoče encime,
- odstranitve nepotrebnih metabolnih poti (Strohl, 2001).

2.4.1 Klasičen pristop z naključno mutagenezo

Metabolizem mikroorganizmov je zelo učinkovito reguliran zato, da ne prihaja do nepotrebne izgube energije in akumulacije intermediatov ter encimov potrebnih za njihovo biosintezo. Z manjšimi spremembami v zaporedju DNA lahko razvijemo seve, ki pri biosintezi encimov, ključnih za produkcijo želenega metabolita, nimajo tako striktne regulacije (Parekh in sod., 2000).

Mutacija je trajna sprememba enega ali več nukleotidov na določenem mestu v verigi DNA. Organizem z mutacijo imenujemo mutanta, proces oziroma skupino procesov, ki privedejo do mutacije pa mutageneza. Mutacije lahko delimo po različnih ključih:

1. Glede na spremembo v številu in zaporedju baznih parov ločimo:
 - mutacije manjšega obsega kot so točkovne substitucije, delecije in insercije enega ali nekaj nukleotidov in
 - mutacije večjega obsega kot so pomnoževanje oziroma duplikacije, delecije, kromosomske prenestitve in kromosomske inverzije, ki vplivajo na večjo kromosomsko regijo.
2. Glede na učinek oziroma posledico, ki jo povzročijo ločimo:
 - drugačnosmiselne mutacije, kjer se kodon za neko aminokislino (AK) zamenja s kodonom za neko drugo AK,
 - nesmiselne mutacije, kjer se kodon za neko AK spremeni v stop kodon,
 - nevtralne mutacije, kjer se kodon za neko AK zamenja s kodonom za AK iz iste skupine in
 - tihe mutacije, kjer se kodon sicer spremeni, a kodira še vedno isto AK.
3. Glede na nastanek ločimo:
 - spontane mutacije, ki so posledica normalnega celičnega delovanja in interakcij z okoljem in
 - inducirane mutacije, ki so posledica mutagenih dejavnikov (Madigan in Martinko, 2006).

Spontane mutacije imajo zelo nizko frekvenco (10^{-5} - 10^{-10} /generacijo) in so v večini škodljive. Določene mutacije pa omogočijo organizmu boljšo adaptacijo na okolje in izboljšajo njegovo biokatalitično sposobnost. Z biotehnološkega vidika je izziv izolirati mutante, ki nosijo koristne mutacije (Parekh in sod., 2000).

Spremenjanje in izboljšanje sevov dosežemo z inducirano mutagenezo, kar pomeni, da genetski material izpostavimo različnim fizikalnim ali kemijskim mutagenim dejavnikom, ki poškodujejo DNA (preglednica 1). Nastale DNA lezije so lahko vzrok za pojav mutacij. Cilj mutageneze pri pridobivanju izboljšanih sevov je visoka frekvenca želenih mutacij v populaciji, hkrati pa čim manjša frekvenca neletalnih mutacij, ki lahko izničijo efekt želene mutacije. Večina mutacij, ki vplivajo na produkcijo ima negativen učinek, še posebej pri

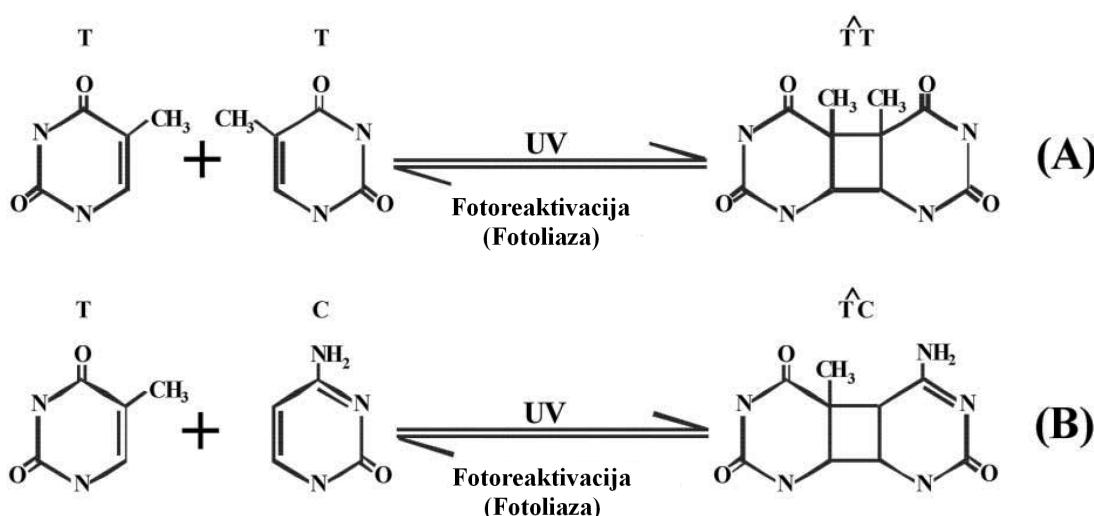
visoko razvitetih sevih. Strategija je torej dobiti visok odstotek preživelih, ki imajo v povprečju zgolj eno mutacijo na mesto, ki vpliva na produkcijo. Uspešnost naključne mutageneze in selekcije je odvisna od več dejavnikov: tipa kulture (na primer spore ali konidiji), doziranja in časa izpostavitve mutagenu, načina poškodbe DNA, števila obdelav z mutagenom, pogojev med in po obdelavi ter zaznavnosti obsega povečane produkcije (Vinci in Byng, 1998).

Preglednica 1: Uporaba mutagenih dejavnikov pri izboljšavi sevov (Parekh in sod., 2000).

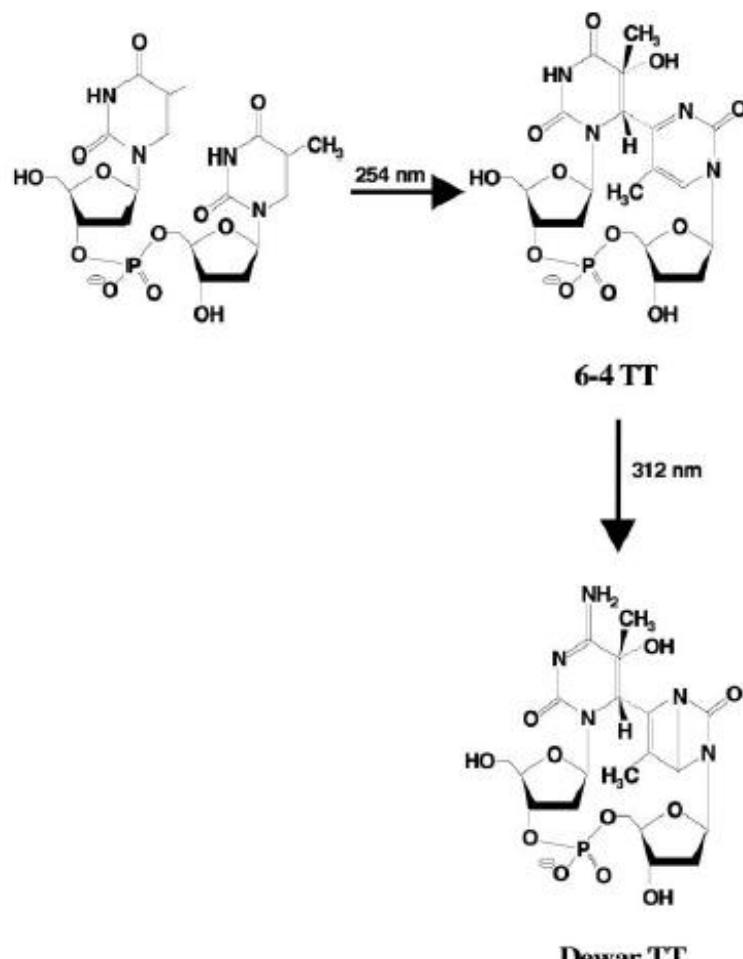
	Mutagen dejavnik	Indukcija mutacije	Vpliv na DNA	Relativni učinek
Žarčenje	X žarki, gama žarki (ionizirajoče žarčenje)	prekinitev ene ali obeh verig DNA	delecije, strukturne spremembe	velik
	UV žarki	dimerizacija pirimidinov, prečne povezave v DNA (fotoproduct 6-4)	transverzije, delecije, premik bralnega okvirja, tranzicija GC v AT	srednji
Analogi baz	5-klorouracil, 5-bromouracil	napačno parjenje baz	tranzicija GC v AT in AT v GC	majhen
	2-aminopurin	napake pri podvajjanju DNA		majhen
Alkilirajoči agenti	hidroksilamin (NH_2OH)	deaminacija citozina	tranzicija GC v AT dvosmerne translacije, delecije, tranzicija GC v AT in/ali AT v GC	majhen
	nitritna kislina (HNO_2)	deaminacija A, C in G		srednji
Interkalirajoči agenti	N-nitrosogvanidin etil metanosulfonat	alkilacija C in A	tranzicija GC v AT	velik
	di-(2-kloroethyl)-sulfid	alkilacija C in A	tranzicija GC v AT	velik
Biološki agenti	etidijev bromid, akridinska barvila	interkaliranje med dvema baznima paroma	premik bralnega okvirja, izguba plazmidov in mikrodelecijs	majhen
	fagi, plazmidi, DNA transpozicije	bazne zamenjave, prekinitev DNA	delecije, duplikacije, insercije	velik

2.4.1.1 UV mutageneza

UV žarčenje delimo glede na valovno dolžino v tri razrede: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) in UVC (200-280 nm). UVC najbolj učinkovito inducira poškodbe DNA. Večina laboratorijskih pri preučevanju UV mutageneze uporablja umetni vir UVC in sicer žarnice, ki emitirajo pri 254 nm. Dve najpogostejsi mutageni in citotoksični DNA leziji, ki jih inducira UV žarčenje sta ciklobutan-pirimidinski dimeri (CPD) in 6-4 fotoproducti (6-4FP) ter njihovi Dewarjevi izomeri. Dewarjevi izomeri nastanejo s fotoizomerizacijo 6-4FP pri valovnih dolžinah nad 290 nm. Poškodbe DNA nastanejo z direktno absorpcijo UV na dipirimidinskih mestih. CPD predstavljajo 70-80 %, 6-4FP pa 20-30 % poškodb povzročenih z UV (Clingen in sod., 1995; Yoon in sod., 2000). Obe vrsti omenjenih lezij deformirata DNA heliks in s tem onemogočita normalno delovanje DNA polimeraze.



Slika 2: Nastanek najbolj toksične in mutagene DNA lezije z UV žarčenjem (Sinha in Häder, 2002). Dimer nastane med dvema sosednjima pirimidinoma: timin-timin ciklobutan-pirimidinski dimer (A) in timin-citozin dimer (B). Fotoreaktivacija je reakcija pri kateri fotoliaz ob prisotnosti svetlobe (300-450 nm) katalizira cepitev pirimidinskih dimerov in vzpostavi prvotno stanje.



Slika 3: Nastanek 6-4 fotoproduktov zaradi UV žarčenja. 6-4FP lahko nastanejo na 5'-T-C-3', 5'-C-C-3' in 5'-T-T-3', ne pa tudi na 5'-C-T-3' mestih v DNA (Sinha in Häder, 2002).

2.4.1.2 Kolhicin in benomil

Kolhicin je heterocikličen alkaloid, ki se z veliko afiniteto veže na tubulin in s tem prepreči sintezo mikrotubulov (Mons in sod., 2000). Arni in Hertner (1997) sta s tretiranjem CHO (ovarij kitajskega hrčka) celic s kolhicinom preučevala njegov vpliv na indukcijo strukturnih sprememb kromosomov, poliploidizacijo celic in mitotični indeks. Pri nižjih koncentracijah je kolhicin induciral poliploidijo in povečanje mitotičnega indeksa, ni pa prišlo do strukturnih sprememb kromosomov. Pri višjih koncentracijah je kolhicin deloval kot klastogen, saj je prišlo pri diploidnih, predvsem pa pri tetraploidnih celicah, do številnih sprememb v strukturi kromosomov (delecije, prelomi, fragmentacija). Tinwell in Ashby (1991) sta postavila tezo, da kolhicin DNA ne poškoduje direktno, ampak so strukturne spremembe kromosomov posledica toksičnosti na delitveno vreteno in/ali kinetohore.

Umetno inducirana avtopoliploidija lahko kvantitativno in kvalitativno učinkuje na produkcijo sekundarnih metabolitov. Pri roži *Petunia 'Mitchell'* so proučevali učinek s kolhicinom inducirane poliploidije na produkcijo šestih flavonolov. Skupna koncentracija flavonolov je pri vseh citotipi (haploid, diploid, tetraploid) ostala nespremenjena, pri dveh od šestih flavonolov pa je prišlo do znatnih razlik v koncentraciji pri različnih citotipi (Griesbach in Kamo, 1996). Pri rastlinah je znanih še več primerov, kjer je prišlo do kvantitativnih razlik med citotipi po inducirani poliploidiji (Mears, 1980, cit. po Griesbach in Kamo, 1996). Tetraploid koruze *Zea mays* je na primer dosegel 5-krat večjo produkcijo karotenoidov na celico, to je 2,5-krat večjo na gen, v primerjavi s svojim diploidnim prednikom (Randolph in Hand, 1940).

Benomil je benzimidazolna spojina, katere metabolna produkta sta metil 2-benzimidazol karbamate (MBC), komercialno poznan kot karbendazim, in n-butilizocianat (BIC). Benomil in MBC v prokariotih nista aktivna, rezultati o genskih mutacijah pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) pa so si nasprotujoči. Benomil konsistentno inducira anevploidijo pri *S. cerevisiae* in glivi *Aspergillus nidulans* (*A. nidulans*). Pri rastlinah benomil povzroča genske mutacije pri ječmenu *Hordeum* sp., strukturne spremembe kromosomov pa so ugotovili pri *Hordeum*, stročnici *Vicia faba* in čebuli *Allium cepa*. Pri vinski mušici *Drosophila melanogaster* benomil in MBC nista kazala aktivnosti. Benomil in MBC se pri glivah vežeta na tubulin in inhibira polimerizacijo tubulina (verjetno s preprečitvijo vezave GTP). Zaradi poškodb delitvenega vretena pride do napak pri segregaciji kromosomov in anevploidije pri hčerinskih celicah (McCarroll in sod., 2002).

Pri poskusu pridobitve celuloznega hiperproducenta *Trichoderma reesei* so Toyama in sod. leta 2001 uporabili tehniko avtopoliploidizacije in haploidizacije. Kolhicin povzroči nastanek avtopoliploidnih jeder z zaustavitvijo mitoze, haploidizacijski reagent benomil pa povzroči gensko rekombinacijo pomnoženih genov pri glivi *Trichoderma* (Toyama in sod., 2002).

2.4.1.3 DNA popravljalni mehanizmi

Natančen prenos genske informacije celice na svoje hčerinske celice je ključen za preživetje organizmov. Takšen prenos zahteva izredno natančnost pri podvajjanju DNA in porazdelitvi kromosomov ter sposobnost preživetja spontanih in induciranih poškodb DNA s čim manjšim številom mutacij (Zhou in Elledge, 2000). Organizmi so razvili učinkovite DNA popravljalne mehanizme za odpravo DNA lezij. Specializirani popravljalni proteini stalno pregledujejo genom in sprožijo popravljanje DNA, ko naletijo na lezije kot so na primer neujemanje baz, apurinsko ali apirimidinsko mesto in strukturno spremenjene baze (Carell in Epple, 1998). Do mutacij ne pride, če so napake v DNA odpravljene pred delitvijo celice ali če so poškodbe letalne. Poznamo več mehanizmov, ki popravljajo DNA:

1. Mehanizmi, ki neposredno popravljajo poškodbe: fotoreaktivacija, mehanizem za odstranitev metilne skupine na O⁶ gvanina.
2. Mehanizmi, ki posredno popravljajo poškodbe: sistemi popravljanja z izrezovanjem baze, sistemi popravljanja z izrezovanjem nukleotidov.
3. Postreplikacijsko popravljanje: popravljanje na mestih nekomplementarnih baz, popravljanje z rekombinacijo.
4. Inducirano popravljanje: sistem SOS (Lehninger in sod., 1993).

V večini primerov popravljalni mehanizmi zagotavljajo popravljanje brez napak, kadar pa pride do težjih poškodb DNA, postane popravljanje podvrženo napakam. Sistem SOS je mehanizem, ki ga inducira večje poškodbe DNA (enovijačna DNA, produkti razgradnje DNA). Ta sistem omogoča podvajanje preko DNA lezij, ki blokirajo običajne DNA polimeraze. Ker je parjenje baz na mestih kjer so lezije velikokrat nepravilno, prihaja pri popravljanju do napak in povečanega števila mutacij (Lehninger in sod., 1993).

2.4.2 Novejši pristopi

2.4.2.1 Rekombinacija s fuzijo protoplastov

Rekombinacija s fuzijo protoplastov je še posebej uporabna v kombinaciji s konvencionalnimi metodami mutageneze. Izboljšamo lahko mutante, pri katerih so se po več generacijah mutageneze nakopičile genetske okvare. Primer je fuzija protoplastov med sevoma glive *A. chrysogenum*, ki proizvajata cefalosporin C. Rekombinacija nizkoproduktivnega, hitro rastočega, sporogenega seva, ki potrebuje metionin ter visokoproduktivnega, počasi rastočega, asporogenega seva z rastjo na nizkocenovnem anorganskem sulfatu je proizvedla rekombinantno, ki je bila hitro rastoča, sporogena ter je proizvajala 40 % več antibiotika na anorganskem sulfatu (Hamlyn in Ball, 1979, cit. po Demain in Adrio, 2008). Homologna rekombinacija med sorodnima sevoma lahko izboljša produkcijo sekundarnega metabolita pri rekombinantni v primerjavi z divjim tipom. To lahko dosežemo z rekombinacijo med divjim tipom, ki ima nizko produkcijo želenega sekundarnega metabolita in že izboljšanim sevom, ki ima visoko produkcijo sorodnega metabolita (Baltz, 2001).

2.4.2.2 Transpozicija

Regulatorni elementi lahko vplivajo na proizvodnjo sekundarnih metabolitov pozitivno ali negativno (Bibb, 1996). Insercijska inaktivacija negativnih regulatornih genov povzroči povečan donos, inaktivacija pozitivnih regulatornih genov pa zmanjšan donos. Transpozone lahko uporabimo tudi za inaktivacijo konkurenčnih metabolnih poti, ki porablja ključne prekurzorje. Transpozone, ki imajo promotorsko aktivnost lahko izkoristimo za naključno vstavljanje promotorjev po kromosomu. Transpozicijska mutageneza pri *Streptomyces roseosporus* je pokazala, da lahko s transpozicijo Tn5099 povzročimo povečano proizvodnjo daptomicina (McHenney in Baltz, 1996). Fenotip mutante je lahko posledica prenosnega promotorja, inaktivacije negativnega regulatornega elementa ali inaktivacije konkurenčnega metabolnega procesa (Baltz, 2001).

2.4.2.3 Metode rekombinantne DNA

Tehnologija rekombinantne DNA vključuje izolacijo tarčnih genov, vezavo na vektorsko DNA s pomočjo ustreznih encimov ter prenos in izražanje teh genov v primerem gostiteljskem organizmu. Postopek imenujemo gensko kloniranje in poteka v sedmih korakih: 1. izbira gostitelja in vektorja, 2. priprava vektorske DNA, 3. priprava DNA za kloniranje, 4. oblikovanje rekombinantne DNA, 5. vnos rekombinantne DNA v gostitelja, 6. selekcija organizmov, ki vsebujejo rekombinantno DNA in 7. selekcija klonov, ki vsebujejo rekombinanto DNA s tarčnimi geni (imajo želene biološke lastnosti) (Watson in sod., 2007).

Tehnike genskega inženiringa uporabljamo za pridobivanje rekombinantnih proteinov in spremembo metabolnih vzorcev producentskih organizmov. Rekombinantni proteini so produkti transgenov, nekateri z lastno komercialno vrednostjo, na primer inzulin, interferoni, rastni hormoni. Metabolni inženiring je usmerjeno izboljšanje produkcije metabolitov ali celičnih lastnosti z modifikacijo specifičnih biokemijskih reakcij ali uvedbo novih reakcij z uporabo tehnologije rekombinantne DNA (Stephanopoulos, 1999; Nielsen, 2001).

2.4.2.3.1 Manipulacija strukturnih genov

Eden od pristopov metabolnega inženiringa je pomnoževanje celotne metabolne poti. Pri *Streptomyces lactamgens* so s kloniranjem celotne skupine genov odgovorne za biosintezo cefamicina 2- do 3-krat povečali donos antibiotika (Chen in sod., 1988). Bolj običajna praksa je pomnoževanje posameznih genov ali manjšega segmenta biosintetske poti, še posebno če ta segment vsebuje gen za hitrost omejujoč encim (Khetan, 1999).

Producenci antibiotikov imajo mehanizme rezistence za zaščito pred lastnim metabolitom. Ti mehanizmi so: inaktivacija produkta s kemično modifikacijo, mesto specifično modifikacijo ali vezavo ter zmanjšanje znotrajcelične koncentracije produkta s sistemom črpalk ali nizko permeabilnostjo za antibiotik (Cundliffe, 1989). Geni za rezistenco so običajno grupirani skupaj z geni za biosintezo antibiotika ter se izražajo soodvisno. *Streptomyces kanamyceticus* (*S. kanamyceticus*) je producent kanamicina, aminoglikozid 6'-N-acetyltransferaza pa z N-acetilacijo omogoča rezistenco proti temu antibiotiku.

Crameri in Davies (1986) sta klonirala gen za aminoglikozid 6'-N-acetyltransferazo in ga na visoko replikativnem plazmidnem vektorju pIJ702 vnesla v gostiteljski sev *S. kanamyceticus*. Transformiran sev je imel 3- do 4-krat večjo produkcijo kanamicina, prav tako pa je kazal povečano rezistenco proti temu antibiotiku.

Izločanje sekundarnega metabolita v fermentacijsko brozgo lahko poteka z aktivnim ali pasivnim transportom (olajšani transport). Brez aktivnega transporta so za ekskrecijo potrebne visoke znotrajcelične koncentracije produkta, ki lahko povzročijo fiziološke spremembe v citoplazi (na primer pH). Izboljšanje transportnega sistema z gensko manipulacijo lahko pripomore k večjemu donosu pri produkciji sekundarnih metabolitov (Khetan, 1999).

2.4.2.3.2 Manipulacija regulatornih genov

Regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov poteka na genskem in biokemijskem nivoju. Regulacija na biokemijskem nivoju je kontrola encimske aktivnosti, kar vključuje aktivacijo, inaktivacijo in povratno inhibicijo. Mikroorganizmi prav tako kontrolirajo tok prekurzorjev in kofaktorjev v sekundarne metabolite, da se ti ne porabljajo, ko so potrebni za celično rast. Tak tip kontrole se razlikuje od konvencionalne indukcije, represije in povratne inhibicije, ker nanjo vpliva celotna metabolna mreža, ne samo ena biosintetska pot (Khetan, 1999).

Večina regulatornih molekul, ki kontrolirajo produkcijo je znotrajceličnih, obstajajo pa tudi zunajcelične s hormonom podobnimi lastnostmi, ki na primer inducirajo produkcijo antibiotikov in sporulacijo sosednih celic (Beppu, 1995).

Pri metabolnem inženiringu se za manipulacijo regulatornih genov uporablja različni pristopi, ki vodijo k večji produktivnosti. Eden od pristopov je pomnoževanje števila kopij pozitivnih regulatornih genov. Ti geni kodirajo aktivatorske proteine, ki se vežejo na promotorje strukturnih genov za biosintezo sekundarnih metabolitov. Povečana koncentracija produktov pozitivnih regulatornih genov lahko vodi k povečani transkripciji biosintetskih genov ter posledično večji produkciji sekundarnih metabolitov. Drugi pristop je delecija negativnih regulatorjev (represorjev), kar povzroči konstitutivno ekspresijo biosintetskih genov (Khetan, 1999).

2.4.2.3.3 Inženiring dobro okarakteriziranih metabolnih poti

V kolikor so dobro poznani hitrost omejujoči encimi biosintetske poti lahko s pomnoževanjem njihovih genov dosežemo povečano produkcijo. Prav tako lahko z menjavo promotorja hitrost omejujočega encima povečamo nivo transkripcije in encimsko aktivnost. Oba pristopa sta učinkovita, če encim ni premočno reguliran s povratno inhibicijo. Pri *A. nidulans* se je z zamenjavo promotorja, močno povečala ekspresija ACV sintetaze. Sev z novim inducibilnim etanol dehidrogenaznim promotorjem je pri rasti z induktorjem ciklopentanonom proizvajal do 30-krat več penicilina kot divji tip (Kennedy in Turner, 1996).

Pri divergentno razvejanih metabolnih poteh ena od vej vodi do želenega produkta, med tem ko ostale poti zgolj porabljam vire. Intermediate biosintetske reakcije lahko kanaliziramo do končnega produkta z blokado nezaželenih poti ali povečanjem hitrosti reakcije v smeri končnega produkta. Gliva *Cephalosporium acremonium* (*C. acremonium*) je producent cefalosporina C. Pri njegovi biosintezi se v fermentacijski brozgi kopiči intermediat penicilin N. Ekskrecijo penicilina N lahko zmanjšamo s povečano ekspresijo encima deacetoksicefalosporina C (DAOC). Transformanti, ki so jim s plazmidnim vektorjem vnesli gen za DAOC sintazo kažejo 15 % boljšo produkcijo cefalosporina C brez znotrajcelične akumulacije penicilina N (Skatrud, 1992). Veje, ki vodijo do nastanka stranskih produktov, lahko blokiramo z inaktivacijo prvega encima ali pa z delecijo celotnih stranskih poti (Khetan, 1999). Pri *Streptomyces avermitilis* so uporabili tehnike naključne mutageneze, rekombinacijo s fuzijo protoplastov, inaktivacijo s transpozicijo in gensko kloniranje, da so odstranili osem stranskih produktov pri produkciji avermektina B2a (Ikeda in Omura, 1995).

Sekundarni metaboliti so pogosto dodatno procesirani z biotransformacijo ali kemično konverzijo, da bi pridobili želene lastnosti. Z vnosom genov za encime tujih organizmov v producentski organizem se lahko izognemo naknadnim procesom. Navadno se za gostitelja uporabi že visoko produktiven sev. 7-aminocefalosporanska kislina (7-ACA) predstavlja ogrodno strukturo delno sintetičnih cefalosporinov in je kemično ali encimsko pripravljena iz cefalosporinov z odstranitvijo D- α -aminoacidilne stranske verige. V *C. acremonium* so vnesli dva heterologna bakterijska gena za D-amino oksidazo in cefalosporin acilazo za produkcijo 7-ACA iz cefalosporina C. Za ekspresijo v glivnem sevu sta bila gena modifcirana z adicijo ekspresijskih signalov iz gena za alkalno proteazo pri *C. acremonium*. Končni rezultat je bil izboljšan sev z dodanim segmentom biosintetske poti za produkcijo 7-ACA (Isogai in sod., 1991). Pri številnih glivnih producentih se heterologna ekspresija uporablja za kompletno metabolno pot pri produkciji nenativnih antibiotikov (Smith in sod., 1990).

2.4.2.4 Usmerjena evolucija

Usmerjena evolucija (znana tudi kot uporabna molekulska evolucija ali usmerjena molekulska evolucija) je način za iskanje variant obstoječih encimov, ki so bolj učinkoviti od teh, ki se pojavljajo v naravi (Skandalis in sod., 1997; Kuchner in Arnold, 1997; Arnold, 1998). Metoda posnema cikel naravne evolucije v laboratorijskem okolju, kjer z vsakim cikлом pridobimo novo generacijo mutant med katerimi izberemo tiste, ki imajo želene lastnosti. Ta princip je bil uporabljen za izboljšanje lastnosti hitrost omejujočih encimov pri biosintezi naravnih produktov. Postopek vključuje naključno mutagenezo, gensko rekombinacijo in metode hitre selekcije (Arnold, 2001). Ključna omejitev tega pristopa pri izboljšavi producentskih organizmov je pojav nezaželenih mutacij v vsakem ciklu (Zhao in sod., 2002) Gen *lovD* pri *A. terreus* kodira encim, ki pri biosintezi lovastatina katalizira prenos 2-metilbutirata iz poliketidne sintaze LovF na monakolin J. Z metodo usmerjene evolucije so pridobili LovD mutanto z 29 točkovnimi mutacijami, ki je imela 1000-krat bolj učinkovito sintezo simvastatina v primerjavi z divjim tipom (Jimenez-Oses in sod., 2014).

2.4.2.5 Genomika, metabolomika, transkriptomika, proteomika

Tehnologije t. i. »omik« se ukvarjajo z globalno analizo vseh genov in njihovih produktov (RNA, proteini, metaboliti) pri določenem organizmu (Kumar Chaudhary in sod., 2013). Glavna prednost genomskega analiza producentskih organizmov je identifikacija vseh genov prisotnih pri metabolizmu sekundarnih metabolitov. Dostopnost genomskega sekvenčnega predvidevanja pri rekonstrukciji katabolnih in biosintetskih poti, transportnih mehanizmov, regulacije genov,... (Overbeek in sod., 1997; Overbeek in sod., 1999; Selkov in sod., 1997; Selkov in sod., 1998; Turner, 2010). Genomske analize vrst znotraj rodu *Aspergillus* so pokazale, da je število genov, ki kodirajo sekundarne metabolite, veliko večje od dejanskega števila odkritih sekundarnih metabolitov (Guo in Wang, 2014). Geni glivnih sekundarnih metabolitov so na kromosому zbrani v gručah in so med seboj pogosto ločeni z manj kot 2 kb (Keller in sod., 2005). Sev *A. terreus* NIH2624, izoliran iz pacienta, je sekvensirala skupina za glivno genomiko na inštitutu Broad. Analiza s programskim orodjem SMURF (iskalnik genov za biosintezo sekundarnih metabolitov) je pokazala, da ima *A. terreus* NIH2624 28 genov za poliketidne sintaze (PKS), 22 genov za neribosomalne peptidne sintaze (NRPS), 1 gen za hibrid PKS/NRPS, 2 PKS-podobna gena in 15 NRPS-podobnih genov (Khaldi in sod., 2010).

Metabolom zajema celoten nabor metabolitov pri določenem biološkem vzorcu, ki je lahko organel, celica, tkivo, organ ali celoten organizem. Metaboliti so vsi produkti metabolnih poti in njihovi intermediati (Nielsen in Jewett, 2007, cit. po Töpfer in sod., 2015). Metabolomske analize stremijo k identifikaciji in kvantifikaciji celotne zbirke metabolitov v biološkem vzorcu (Oliver in sod., 1998). Ker je spekter metabolitov, glede na njihove fizikalno-kemijske lastnosti in koncentracijo, izredno širok, ni enotne metodologije za simultano merjenje celotnega metaboloma (Nobeli in Thornton, 2006). Izraz metabolomika se tako nanaša na skupino analitičnih tehnologij za kvantitativno merjenje posameznih delov metaboloma (Redestig in sod., 2011, cit. po Töpfer in sod., 2015). *A. terreus* je najbolj znan kot producent lovastatina, vendar so pri njem odkrili še številne druge sekundarne metabolite: sulokrin, teretonin, asterikinon, butirolaktoni, dehidrokurvularin, asperfuranon, terein, tereična kislina, teritrem, acetilaranotin, aspulvinon, azonalenin, izoflavipucin (Guo in Wang, 2014), aspernolid B (Haritakun in sod., 2010), citrinin, (+)-geodin (Borata in Bizukojc, 2014). Wang in sod. (2011) so pri sevu *A. terreus* PT06-2, ki je rasel v pogojih s povišano slanostjo izolirali in identificirali tri nove sekundarne metabolite: teremid A, teremid B in terelakton.

Transkriptomika se ukvarja z globalno analizo izražanja RNA nekega organizma s tehnologijo mikromrež, ki omogočajo kvantifikacijo nivoja transkripcije (De Saizieu in sod., 1998; Tao in sod., 1999). Z asociacijsko analizo transkripcijskih in metabolnih profilov producentskih sevov lahko identificiramo gene, katerih ekspresija je najbolj tesno povezana s produkcijo metabolita. Tak pristop se uporablja kadar so genomske analize producentskih sevov nepopolne. Na osnovi integracije transkripcijskega in metabolnega profila 21 sevov *A. terreus*, ki proizvajajo različne ravni lovastatina in 19 sevov, ki proizvajajo (+)-geodin, so lahko Askenazi in sod. (2003), bolj učinkovito določili smernice nadaljnjega metabolnega inženiringa za izboljšanje proizvodnje lovastatina.

Proteomika analizira izražanje proteoma v določenem biološkem stanju (Kim in sod., 2007). Proteom je celoten nabor proteinov, ki se v danem trenutku in pod definiranimi pogoji izražajo pri določenem tipu celice ali organizma. Pri analizi proteoma se izvajajo kvalitativne in kvantitativne meritve velikega števila proteinov, ki neposredno vplivajo na celično biokemijo. Meritve nam omogočajo podrobnejšo analizo trenutnega stanja celice ali sistemskih sprememb v času rasti, razvoja in odziva na okoljske dejavnike (Bhaduria in sod., 2007). Citoplazmatska proteomika preučuje celoten celičen proteom, subproteomika pa se osredotoča le na njegov del, na primer proteine celične membrane, mitohondrija ali sekrecijske proteine (sekretom) (Kim in sod., 2007). Han in sod., (2010) so preučevali ekstracelularne proteine, ki jih izloča *A. terreus* pri rasti na glukozi, škrobu in sukrozi. Največ proteinov so izolirali pri rasti na sukrozi, najmanj pa pri glukozi. Sekretom so večinoma sestavljeni hidrolitični proteini, kot so: glikozidaze, amilaze, amidaze, proteaze, celulaze, glutaminaze, ...

Tehnologije »omik« pri izboljšavi sevov omogočajo:

1. Identifikacijo sekvenc in organizacije vseh genov:
 - struktura operonov in poti regulatornih elementov.
2. Identifikacijo genov vseh sekundarnih metabolitov:
 - strukturni geni,
 - regulatorni geni.
3. Identifikacijo konkurenčnih metabolnih poti.
4. Identifikacijo potencialnih virov za prekurzorje in kofaktorje.
5. Identifikacijo regulatornih genov nepovezanih z geni sekundarnih metabolitov:
 - sigma faktorji,
 - promotorji,
 - globalni regulatorni geni.
6. Identifikacijo manjkajočih genov.
7. Identifikacijo drugih genov / elementov za manipulacijo:
 - plazmidi, fagi, insercjske sekvene,
 - kandidatna nevtralna mesta,
 - restrikcija / modifikacija.
8. Olajšano izbira tarč za genski inženiring.
9. Olajšano kloniranje, prekinitev in duplikacijo tarčnih genov (Baltz, 2001).

2.4.3 Metode za selekcijo izboljšanih producentov

2.4.3.1 Naključno pregledovanje

Po mutagenezi preživele celice v populaciji naključno izberemo in testiramo njihovo zmožnost produkcie želenega metabolita. Pri pregledovanju večjega števila mutant ponavadi pridemo do identifikacije izboljšane mutantne (Parekh in sod., 2000). Bolj kot je kompleksna regulacija in biosinteza, več sevov je potrebno pregledati. Mutante z zelo visokimi donosi so praviloma bolj redke, od tistih z majhnimi. Metoda velja za delovno intenzivno, še posebej pri ročni obdelavi vzorcev. Glavni koraki v delovnem poteku so: izolacija posameznih mutiranih kultur, priprava in distribucija sterilnih gojišč, inokulacija mutant v vegetativna gojišča, prenos kulture v fermentacijsko gojišče in analiza vzorcev po fermentaciji (Queener in Lively, 1986).

2.4.3.1.1 Avtomatizirano pregledovanje

Za rast kultur pri ročnem pregledovanju uporabljamo standardne posode kot so erlenmajerice ali epruvete. Z zmanjšanjem materiala se lahko celoten procesa avtomatizira (Parekh in sod., 2000).

Za povečanje učinkovitosti naključnega pregledovanja potrebujemo metodo pri kateri čim večje število vzorcev pregledamo v čim krajšem času. To lahko dosežemo z avtomatizacijo pri rokovaju z gojišči in kulturami ter določenim ročnim delom pri prenosu in skladiščenju vzorcev. Pri takem industrijskem sistemu je sterilno gojišče robotsko razdeljeno v posebno oblikovane module s po sto epruvetami (Vinci in Byng, 1998).

Posamezni kloni so detektirani preko optičnega sistema in prenešeni iz agarskih gojišč v vegetativna tekoča gojišča. Robot je prav tako sposoben inokulirati fermentacijsko gojišče iz vegetativnega. Ekstrakcija iz fermentacijske brozge in analize s HPLC so prav tako avtomatizirani. Avtomatizacija olajša pridobivanje in prenos podatkov ter omogoča statistično analizo za nadaljnjo optimizacijo procesa. Za uspešnost avtomatiziranega programa je potrebna prisotnost izkušenega mikrobiologa ter stalno spremljanje in ocenjevanje metode. S tem zagotovimo, da vsi vidiki avtomatizacije delujejo učinkovito in brez prevelike variabilnosti. Glavna slabost robotiziranega sistema je visok strošek investicije in vzdrževanja opreme (Nolan, 1986).

2.4.3.1.2 Analitične metode

Za selekcijo izboljšanih sevov morajo analitične metode omogočati natančne in hitre meritve želenega produkta. Za ekonomično pregledovanje velikega števila vzorcev je potrebno poiskati ravnotežje med natančnostjo in hitrostjo. Pri analizi sekundarnih metabolitov sta se uveljavili metodi tankoplastne kromatografije (TLC) in HPLC. Obe metodi potrebujeta predhodno ekstrakcijo sekundarnega metabolita iz fermentacijske brozge (Parekh in sod., 2000).

2.4.3.1.3 Hitra detekcija

Pri metodi s hitro detekcijo pregledujemo mutirane seve vizualno, glede na prisotnost ali odsotnost specifične encimske aktivnosti. Selekcija poteka na ploščah z gojiščem, ki vsebuje selektivni reagent, barvni indikator ali indikatorski organizem (biološko testiranje) (Parekh in sod., 2000).

2.4.3.1.3.1 Biološko testiranje

Biološko testiranje je na splošno katerakoli kvantitativna metoda, pri kateri uporabljamo indikatorski organizem z namenom testiranja in analize. Najpogosteje se uporablja za meritev snovi, ki se v vzorcu pojavljajo v sledovih. Uporabi se organizem, za katerega proučevana snov (na primer esencialni rastni faktor) določa celokupni obseg rasti tega organizma. Po inkubaciji pod standardnimi pogoji merimo obseg rasti, ki je sorazmeren količini preučevane snovi v gojišču oziroma vzorcu. Postopek ponavljamo z različnimi koncentracijami proučevane snovi, iz dobljenih podatkov pa lahko narišemo standardno

krivuljo (graf odvisnosti obsega rasti v primerjavi s koncentracijo proučevane snovi). Tako določimo koncentracijo snovi neznanega vzorca (Gorenc, 2002).

Biološko testiranje se pogosto uporablja tudi za merjenje koncentracij protimikrobnih snovi. Izolacija in pregledovanje producenta protimikrobne snovi poteka z gojenjem na ustreznu mediju ob uporabi indikatorskega organizma. Producenta razmažemo po površini trdnega gojišča in inkubiramo do primerne velikosti kolonij, nato plošče prelijemo z indikatorskim organizmom in nadaljujemo z inkubacijo. Pojav con inhibicije oziroma nesposobnost indikatorskega organizma, da raste v bližini množične rasti (kolonija, preplet hif ipd.) producenta kaže, da ta kolonija proizvaja protimikrobnou snov, na katero je indikatorski organizem občutljiv (Gorenc, 2002).

Kumar in sod. (2000) so med rutinskim pregledom protiglivnih snovi opazili, da je sev *N. crassa* občutljiv na β-hidroksi kislino lovastatina. Gorenc (2002) je to lastnost uporabil pri razvoju metode biološkega testiranja z *N. crassa* za hitro pregledovanje sevov *A. terreus*, ki proizvajajo lovastatin.

2.4.3.2 Racionalizirana selekcija

Uporaba predselekcije in racionalizirane selekcije omogoča izboljšanje učinkovitosti celotnega procesa pregledovanja mutant. Ker je v populaciji celic, ki so bile podvržene mutagenom dejavnikom, tudi veliko število nemutiranih starševskih celic, je možno s predselekcijo izločiti precej večje število pravih mutant, tudi tistih, z želenim fenotipom. Tako lahko z enakim številom pregledanih izolatov kot pri naključnem pregledovanju dobimo boljše rezultate z manj dela (Queener in Lively, 1986). Racionaliziran pristop pri pregledovanju sevov zahteva določeno znanje o biosintezi produkta in regulaciji biosintetske poti (Queener in sod., 1978). V veliko primerih dodajamo gojiščem toksične snovi, ki ustavijo rast občutljivih starševskih sevov, rezistentne mutante pa se lahko razmnožujejo (Vezina in sod., 1979).

2.4.3.2.1 Avksotrofni sevi

Avksotrofi so mutante, ki so izgubile določen encim v biosintetski poti in za rast potrebujejo določen nutrient (Madigan in Martinko, 2006). Izolacija mutant blokiranih po eni poti lahko vodi k akumulaciji enostavnih produktov kot so aminokisline, nukleotidi in vitamini, ki so sintetizirani po drugih poteh. Večina avksotrofnih sevov ima slab donos antibiotikov, vendar nekateri prototrofni revertanti kažejo povečano produkcijo antibiotikov kot je na primer tetraciklin (Queener in sod., 1978).

2.4.3.2.2 Deregulirane mutante

Izolacijo mutant z dereguliranim metabolizmom dosežemo s selekcijo sevov neobčutljivih na določen metabolni analog. Slabost te metode je, da je potrebno testirati veliko analogov primarnih metabolitov, pri čemer nekateri od njih sploh ne inhibirjo rasti ali pa jo inhibirajo pri visokih koncentracijah (Parekh in sod., 2000).

2.4.3.2.3 Mutante rezistente na povratno inhibicijo

Pri mnogih mikroorganizmih končni produkti, ki se akumulirajo v celici, inhibirajo encimsko aktivnost določene metabolne poti. Končni produkt lahko povzroči konformacijske spremembe z vezavo na specifično (alosterično) mesto na encimu, s čimer ga inhibira. Mutacija v strukturnem genu spremeni vezavno mesto encima in tako prepreči inhibicijo. S takim postopkom so razvili mutant, ki je imela povečano produkcijo kitasamicina (Vezina in sod., 1979). Na enak način so izolirali seve bakterij *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* in *Corynebacterium* ter glice *Aspergillus*, ki imajo povečamo produkcijo aminokislin, nukleotidov in vitaminov (Wang in sod., 1979, cit. po Parekh in sod., 2000).

2.4.3.2.4 Mutante rezistente na represijo

Več mutant različnih sevov *Streptomyces* je bilo izoliranih na osnovi sposobnosti rasti na različnih virih ogljika v prisotnosti nerazgradljivega glukoznega analoga 2-deoksiglukoze (DOG). 2-dog^R mutante nimajo glukokinazne aktivnosti ali pa je ta močno zmanjšana. 2-dog^R genotip izraža pleiotropno neobčutljivost na katabolno represijo (Angell in sod., 1992; Hodgson, 1982; Segura in sod., 1996; Seno in Chater, 1983). Občutljivost na DOG, glukokinazna aktivnost in represija z glukozo so bile pri 2-dog^R mutantah povrnjene z insercijo 2,9 kb DNA fragmenta kloniranega iz divjega tipa *Streptomyces coelicolor* v mutiran sev (Ikeda in sod., 1984). Neobčutljivost 2-dog^R mutant (brez glukokinaze) na represijo velja tudi za druge represivne vire ogljika kot so galaktoza, arabinosa, glutamat in citrat. Te spojine niso metabolizirane s strani glukokinaze (Kwakman in Postma, 1994), vendar potrebujejo njeno prisotnost, da povzročijo represijo. Iz tega lahko sklepamo, da ima glukokinaza regulatorno vlogo pri katabolni represiji (Saito in sod., 1998).

Pri *Streptomyces* je produkcija ekstracelularnih encimov kot so agaraza (Servin-Gonzalez in sod., 1994) α -amilaza, proteaza, (Yang in Wang, 1999) celulaza, (Walter in Schremp, 1996) hitinaza, (Delic in sod., 1992; Gupta in sod., 1995) β -galaktozidaza (Segura in sod., 1996) regulirana z katabolno represijo. S selekcijo mutant rezistentnih na inhibicijo rasti z glukoznimi analogi lahko pridobimo deregulirane producente teh encimov, ki so rezistentni na katabolno represijo (Sanchez in Demain, 2002). Glukozni analogi se uporabljajo pri izolaciji mutant s povečano produkcijo tudi pri glivah, na primer *A. terreus* pri proizvodnji glukoamilaz (Ghosh in sod., 1991).

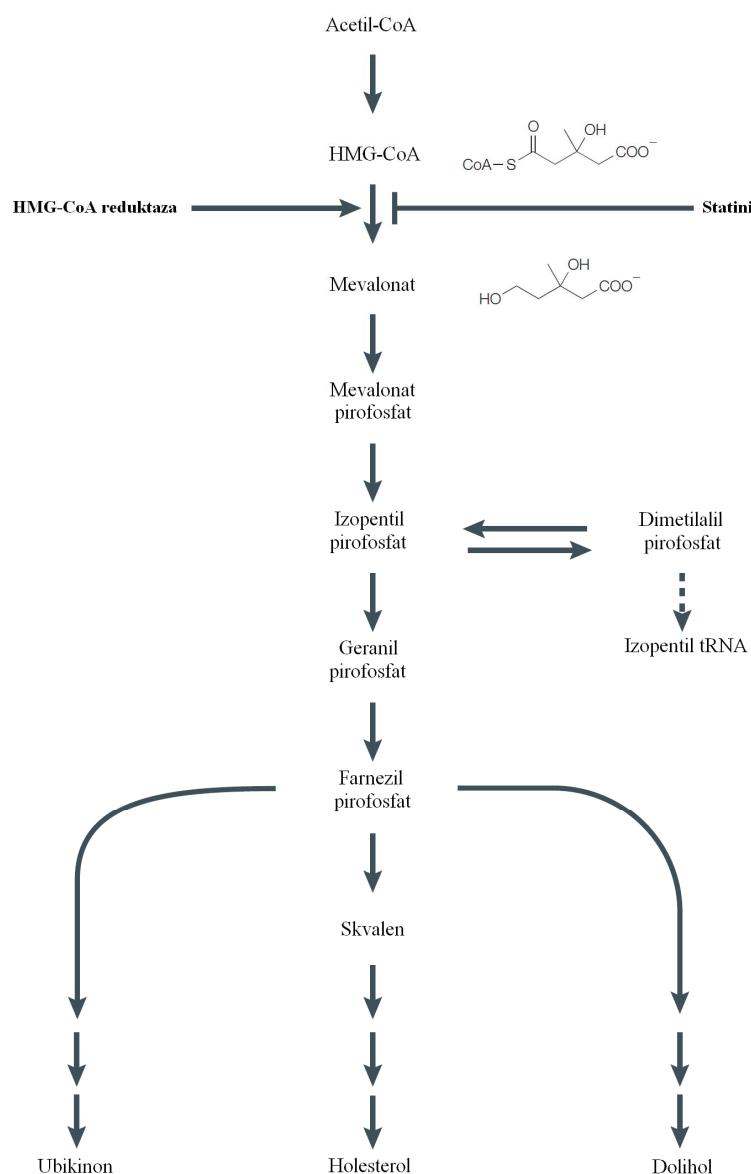
2.5 BIOSINTEZA HOLESTEROLA

Nekaj manj kot polovica vsega holesterola v telesu izhaja iz biosinteze *de novo*. Biosinteza v jetrih doprinese približno 10 %, v črevesju pa okoli 15 % k vsakodnevni produkciji holesterola. Encimi, ki so vključeni v biosintezo se nahajajo v citoplazmi, mikrosomih (endoplazmatski retikulum) in peroksisomih. Holesterol se po plazmi prenaša z lipoproteini pretežno v obliki holesterol estra. V jetrih sintetiziran holesterol in zaužiti holesterol, ki ga jetra ne porabijo, se transportira v serum z lipoproteinom LDL. Nalaganje holesterola in drugih maščob na stene arterij (proses znan kot arterioskleroz) zmanjšuje pretok krvi ter s tem dostop kisika do možganov, srca in drugih delov telesa. Zmanjšanje stopnje holesterola v krvi lahko prepreči razvoj bolezni koronarnih arterij.

Eden od načinov je dieta ter povečana telesna aktivnost, druga možnost pa je terapija z zdravili, ki inhibirajo biosintezo holesterola (statini). Ločimo pet glavnih stopenj biosinteze holesterola:

1. Dva acetil-CoA se pretvorita v 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA).
2. HMG-CoA se pretvori v mevalonat.
3. Mevalonat se pretvori v izopentil pirofosfat (IPP).
4. IPP se pretvori v skvalen.
5. Skvalen se pretvori v holesterol (King, 2016).

Pretvorbo HMG-CoA v mevalonat katalizira encim 3-hidroksi-3-metilglutaril koencim A reduktaza (HMG-CoA reduktaza), ki je ključni, hitrost omejujoči encim pri biosintezi holesterola (Alberts in sod., 1980; Alberts, 1990).



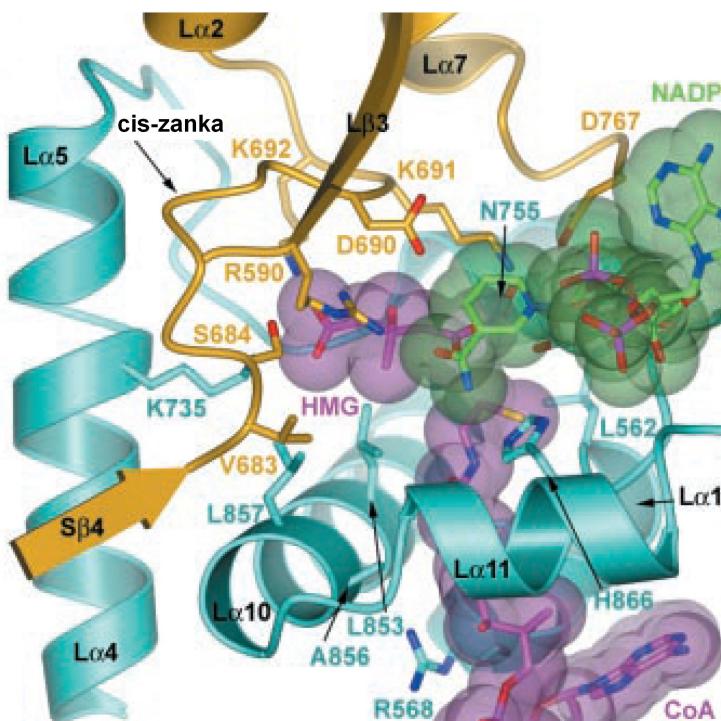
Slika 4: Diagram biosinteze holesterola z označenim mestom delovanja statinov na HMG-CoA reduktazo. Biosinteza holesterola je kompleksen proces, ki vključuje več kot 30 encimov (Tobert, 2003).

2.5.1 HMG-CoA reduktaza

HMG-CoA reduktaza pri evkariotih je vezana na endoplazmatski retikulum, pri prokariotih pa je topna in se nahaja v citoplazmi (Friesen in Rodwell, 2004).

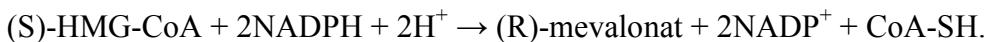
Na osnovi filogenetske analize s poravnavanjem aminokislinskih sekvenc katalitične domene ločimo dva razreda HMG-CoA reduktaz. V I razred spadajo HMG-CoA reduktaze evkariotov in nekaterih arhej, v II razred pa določenih bakterij in arhej (Bochar in sod., 1999). Pri evkariotih je katalitična domena zelo dobro ohranjena, domena membranskega sidra slabo, arheje in nekatere bakterije pa domene za membransko sidro sploh nimajo (Friesen in Rodwell, 2004).

HMG-CoA reduktaze različnih organizmov so multimeri od vrste specifičnega števila enakih monomerov (Istvan in sod., 2000; Istvan in Deisenhofer, 2001). Človeška HMG-CoA reduktaza kristalizira kot tetramer iz enakih monomer, za svojo reakcijo pa potrebuje koencim v obliki NADPH. Aktivno mesto HMG-CoA reduktaze je na vmesnem delu homodimera, to je med prvim monomerom, ki veže nikotinamid dinukleotid in drugim monomerom, ki veže HMG-CoA. Človeška HMG-CoA reduktaza ima cis-zanko, ki povezuje HMG-CoA vezavno mesto z NADPH vezavnim mestom (Istvan, 2001).

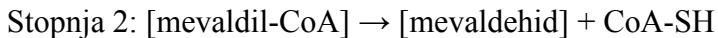
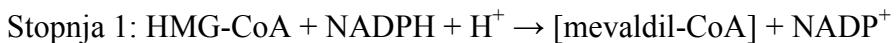


Slika 5: Aktivno mesto človeške HMG-CoA reduktaze v kompleksu z HMG, CoA in NADP (Istvan in Deisenhofer, 2001). Aktivno mesto se nahaja na vmesnem delu med dvema monomeroma. Prvi monomer je obarvan rumeno, drugi monomer pa je v modri barvi. Stranske verige aminokislinskih ostankov, ki so v kontaktu s substratoma so prikazane s skeletnim modelom (posamezne kratice označujejo aminokislinske ostanke kot sledi: A, alanin; C, cistein; D, aspartat; E, glutamat; F, fenilalanin; G, glicin; H, histidin; I, izolevcin; K, lizin; L, levcin; M, metionin; N, asparagin; P, prolin; Q, glutamin; R, arginin; S, serin; T, treonin; V, valin; W, triptofan; Y, tirozin). Sekundarne strukture so označene s črnimi oznakami. HMG in CoA sta obarvana vijolično, NADP pa zeleno. Za ponazoritev volumna substratov so uporabljene prosojne krogle s polmerom 1,6 Å preko skeletnegata modela.

Reakcija, ki jo katalizira človeška HMG-CoA reduktaza je:



Oznaki (S) in (R) se nanašata na stereokemijo substrata in produkta, ker je reakcija stereospecifična in (R)-HMG-CoA izomer ni substrat človeške HMG-CoA reduktaze. Reakcija poteka v treh stopnjah in vključuje dve redukcijski reakciji ter oblikovanje encimsko vezanih intermediatov mevaldil-CoA in mevaldehid:



Čeprav obstajajo mnogi končni produkti metabolizma mevalonata, ki svoje poti ne končajo v holesterolu, je delež mevalonata, ki se porabi za njihovo sintezo, majhen, večina pa se pretvori prav v holesterol (Gorenc, 2002). Mevalonat je prekurzor nekaterih pomembnih izoprenoidnih intermediatov kot so ubikinon, doliholi ter preniliranih proteinov in izopentilne tRNA (Goldstein in Brown, 1990). Inhibitorji HMG-CoA reduktaze (statini) učinkovito znižujejo stopnjo holesterola v krvi pri ljudeh s tem, ko zmanjšujejo njegovo produkcijo v jetrih (Alberts in sod., 1980; Alberts, 1990). Z blokado HMG-CoA reduktaze bi lahko statini zmanjšali koncentracijo ubikinona Co-Q-10 v krvi. Dokončnih dokazov, ki bi povezovali zmanjšan nivo Co-Q-10 v tkivu s statinsko terapijo pri ljudeh, še nimamo (Hargreaves in sod., 2005; Nawarskas, 2005). Nepravilno delovanje mevalonat kinaze, ne pa tudi encimov, ki ji sledijo pri biosintezi holesterola, je povezano s skeletno miopatijo (Baker, 2005). Posledično se razvoj novih zdravil za zniževanje holesterola osredotoča na učinkovine, ki bi pri metabolni poti mevalonata delovale po razcepnu farnezil pirofosfata (Korošec in sod., 2008).

2.6 POLIKETIDI

Poliketidi, ki jih sintetizirajo mnoge bakterije, glive in rastline, so zelo raznolika skupina sekundarnih metabolitov tako po strukturi kot po biološki aktivnosti. Med njimi najdemo klinično pomembne substance kot so antibiotiki (eritromicin), imunosupresanti (FK 506), učinkovine za zniževanje holesterola (lovastatin), proti glivne in proti zajedalske ter antitumorske učinkovine (Leadlay, 1997).

Njihova sinteza poteka podobno kot pri maščobnih kislinah s polimerizacijo enostavnih karboksilnih kislin, pri čemer imajo glavno vlogo poliketidne sintaze (PKS). PKS so tako kot maščobnokislinske sintaze (FAS) encimi, ki katalizirajo Claisenovo kondenzacijo. Pri tej reakciji najprej pride do aktivacije PKS z začetnim acil-CoA, nato pa še z acil-CoA, ki podaljšuje verigo. FAS običajno kot prvega porablja acetil-CoA kot drugega pa malonil-CoA, medtem ko PKS porablja za začetnik acetil- in propionil-CoA, za podaljševanje pa malonil-, metilmalonil- ter etilmalonil-CoA. Reakcija se nadaljuje s kondenzacijo obeh acilnih skupin, redukcijo keto skupine, dehidracijo in redukcijo dvojne vezi. Cikel se

ponavlja in PKS pri tem omogočajo veliko variabilnost. Ta se kaže s samim številom ciklov, raznolikostjo monomerov, z različnimi redukcijskimi reakcijami v vsakem ciklu, s specifičnim načinom ciklizacije končne verige in z oksidacijo, redukcijo, glikolizacijo in metilacijo končnega produkta (Leadlay, 1997).

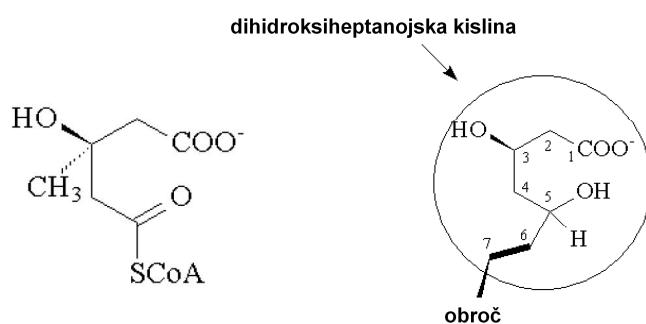
PKS razdelimo v tri večje skupine glede na strukturo njihovih genov (Hopwood, 1997; Shen, 2003). PKS tipa I so večfunkcionalni encimi, ki se pri glivah in bakterijah razlikujejo. Pri glivah so to ponavljajoči encimi, kjer prihaja do večkratne uporabe aktivnih mest na sintazi (na primer pri biosintezi aflatokksina in fumonizina) (Fujii in sod., 1998). Za razliko od gliv imajo bakterije modularne encime, kar pomeni, da ima sintaza več kopij aktivnih mest (modulov), vsako pa katalizira posamezen korak pri biosintezi (na primer pri biosintezi eritromicina in rapamicina). PKS tipa II so modularne enofunkcionalne sintaze, ki jih najdemo predvsem pri bakterijah (na primer aktinorodin PKS), medtem ko so PKS tipa III ponavljajoče homodimerne sintaze izolirane iz rastlin in bakterij (Moore in Hopke, 2001; Shen, 2003).

Glivne PKS imajo gene ponavadi razporejene skupaj z geni ostalih encimov, ki so pomembni pri biosintezi določenega sekundarnega metabolita. Tovrstno grupiranje genov najdemo pri genih polketidnih mikotoksinov kot so aflatoksin, sterigmatocistin, fumonizin ter pri genih ostalih sekundarnih metabolitov kot so lovastatin, kompaktin in melanin (Keller in Hohn, 1997). Ker gre za nekatere ekonomsko pomembne metabolite, se raziskave usmerjajo v identifikacijo novih PKS genov in gensko manipulacijo z njimi. Glivne PKS, med njimi tudi tiste iz rodu *Aspergillus* bi lahko bile primerna tarča za metabolni inženiring (Watanabe in Ebizuka, 2002). Do sedaj so že razvili oligonukleotidne začetnike za ketosintazo, ketoreduktazo in domeno za C-metilacijo (Bingle in sod., 1999; Lee in sod., 2001; Nicholson in sod., 2001).

2.6.1 Statini

2.6.1.1 Podobnosti v strukturi statinov

Glavni strukturni komponenti statinov sta dihidroksiheptanojska kislina (slika 6, desno) in sistem obročev z različnimi substituenti. Dihidroksiheptanojska kislina je bistvena za inhibitorno aktivnost statinov. Vsi statini imajo modificirano komponento hidroksiglutarinske kisline (HMG podobni del), ki je strukturno podobna endogenemu substratu HMG-CoA (slika 6, levo). HMG podobni del statina se veže na isto aktivno mesto kot HMG-CoA in inhibira HMG-CoA reduktazo (Roche, 2005).

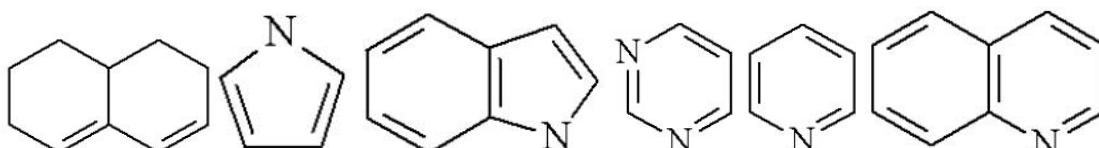


Slika 6: Strukturna podobnost med HMG-CoA (levo) in statinom (Roche, 2005).

2.6.1.2 Razlike v strukturi statinov

Statini se med seboj razlikujejo po substituentih in strukturi obroča (slika 7). Te razlike v strukturi vplivajo na farmakološke lastnosti statinov, kot so:

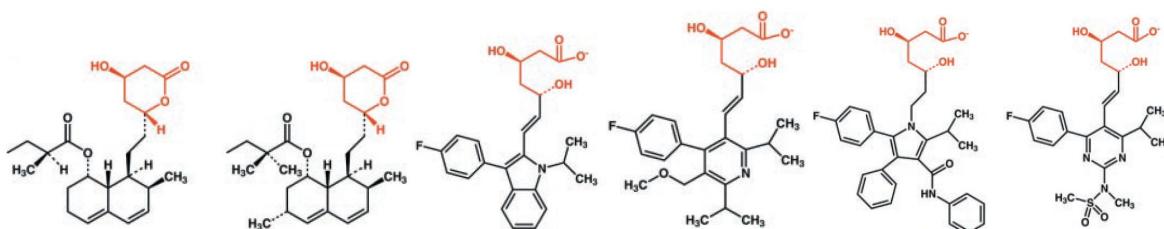
- afiniteta do aktivnega mesta HMG-CoA reduktaze,
- stopnja vstopa v jetrna in ne-jetrna tkiva,
- razpoložljivost za vstop v ne-jetrna tkiva iz obtoka,
- poti in načini metabolne presnove ter izločanja (McTaggart, 2003).



Slika 7: Strukture obročev pri statinah od leve proti desni: heksahidronaftilen, pirol, indol, pirimidin, piridin, kinolin (Roche, 2005)

Obroč se veže na HMG-CoA reduktazo v področju vezave koencima A. Gre za tesno interakcijo med inhibitorjem in encimom, ki močno zmanjša možnost vezave endogenega substrata HMG-CoA (Roche, 2005).

Glede na strukturo, lahko statine razdelimo v dve skupini. Statini tipa 1 imajo naravni izvor in imajo na HMG podobni del molekule vezan dekalinski obroč (heksahidronaftilen) z butirilno skupino. Pod tip 1 spadajo lovastatin, pravastatin in simvastatin. Simvastatin je sintetični derivat lovastatina, pravastatin pa mevastatina (znan tudi kot kompaktin). Statini tipa 2 so v celoti sintetični in imajo na HMG podobni del molekule vezane različne fluorofenilne skupine, ki se med seboj razlikujejo po hidrofobnosti (od zelo hidrofobne pri cerivastinu do delno hidrofobne pri rosuvastatinu). Pod tip 2 spadajo fluvastatin, cerivastatin, atorvastatin in rosuvastatin (Istvan in Deisenhofer, 2001).

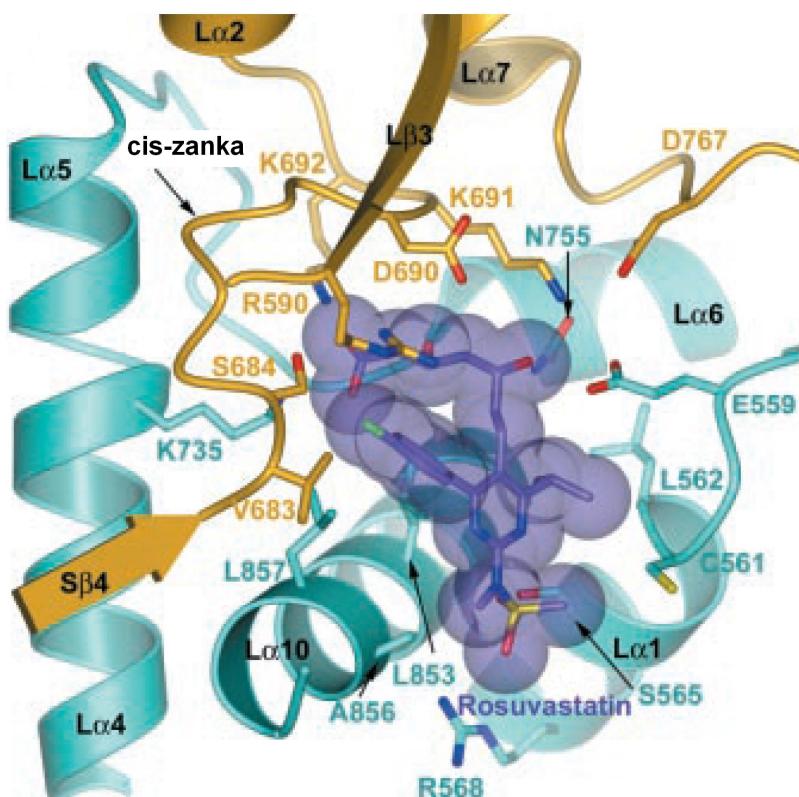


Slika 8: Strukturne formule nekaterih statinov od leve proti desni: kompaktin in simvastatin (oba tip 1) ter fluvastatin, cerivastatin, atorvastatin in rosuvastatin (vsi tip 2). HMG podobni del, ki je ohranjen pri vseh statinah je rdeče barve (Istvan in Deisenhofer, 2001).

2.6.1.3 Vezava statinov na HMG-CoA reduktazo

Statini se reverzibilno vežejo na HMG-CoA reduktazo z afiniteto v nanomolarnem območju, medtem ko je afiniteta naravnih substratov je v mikromolarnem območju (Moghadasian, 1999). Statini izkoristijo konformacijsko fleksibilnost HMG-CoA reduktaze, da ustvarijo hidrofobni vezavni žep blizu aktivnega mesta (Istvan, 2002). Na vezavo NADPH statini ne vplivajo (Istvan in Deisenhofer, 2001). Kot primer interakcije

statina z HMG-CoA reduktazo je na sliki 9 prikazana vezava rosuvastatina. Med HMG podobnim delom in aminokislinskimi ostanki S684, D690, K691 in K692 v cis zanki se tvorijo polarne interakcije. K691 skupaj z E559 in D767 sodeluje tudi pri nastanku vodikovih vezi z O5 hidroksilno skupino statina. Terminalni karboksilat HMG podobnega dela tvori solni mostiček s K735. Hidrofobne stranske verige encima, vključujuč aminokislinske ostanke L562, V683, L853, A856 in L857, sodelujejo pri nastanku van der Waalsovih vezi s statinom (Istvan in Deisenhofer, 2001). Statini tipa 2 tvorijo polarno interakcijo med atomom fluora na fluorofenilni skupini in gvanidinsko skupino R590 (Istvan, 2002). Poleg teh interakcij imata atorvastatin in rosuvastatin dodatne vodikove vezi med S565 in bodisi kisikom karbonilne skupine (atorvastatin) ali kisikom sulfonske skupine (rosuvastatin). Zaradi edinstvene polarne interakcije med R568 na stranski verigi in elektronegativno sulfonsko skupino ima rosuvastatin največje število vezi s HMG-CoA reduktazo (Istvan in Deisenhofer, 2001).



Slika 9: Vezava rosuvastatina na HMG-CoA reduktazo (Istvan in Deisenhofer, 2001). Rosuvastatin je obarvan z vijolično. Ostale oznake so enake sliki 5.

Vsi statini imajo enak HMG podobni del, tako da so razlike v njihovem farmakološkem učinku večinoma posledica substituent. Aktivnost vsakega statina je odvisna od afinitete do vezavnega mesta in časa vezave (White, 2002). Statini tipa 2 se zaradi fluorofenilne skupine močneje vežejo na encim kot statini tipa 1. Rosuvastatin ima polarno sulfonsko skupino, ki je hidrofilna in daje nizko lipofilnost. Sulfonska skupina tvori edinstveno polarno interakcijo z encimom, tako da ima rosuvastatin odlično afiniteto do HMG-CoA reduktaze ter posledično večjo učinkovitost pri zniževanju LDL-cholesterola (Istvan in Deisenhofer, 2001; Olsson in sod., 2001).

2.6.1.4 Lipofilnost statinov

Bolj lipofilni statini imajo običajno višjo raven izpostavljenosti v ne-jetrnih tkivih, ker pasivno in neselektivno difundirajo, tako v jetrne kot tudi v ne-jetrne celice. Hidrofilni statini se v hepatocite prenašajo predvsem z aktivnim transportom. Za transport hidrofilnih statinov kot sta rosuvastatin in pravastatin je odgovoren membranski polipeptid, ki prenaša organske anione (OATP) (Pfefferkorn in sod., 2007). OATP-C je izražen na bazolaterali membrani hepatocitov in je potencialni dejavnik za nizko vrednost IC_{50} (molarna koncentracija statina, ki je potrebna za polovično inhibicijo encima) rosuvastatina v hepatocitih. Cerivastatin je med statini najbolj lipofilen in povzroči tudi največ resnih neželenih učinkov (White, 2002). Večjo selektivnost statina na hepatocite so opazili pri manj lipofilnih statinah kot je pravastatin. Visoka selektivnost statina na hepatocite pomeni minimalno vmešavanje v presnovo holesterola v ne-jetrnih tkivih in manjše tveganje za škodljive učinke (Hamelin in Turgeon, 1998). Lovastatin in simvastatin se jemljeta v laktinski obliki, ki je bolj hidrofilna kot njuna hidroksi kislinska oblika ter se *in vivo* aktivirata s hidrolizo. Vsi ostali statini so že v aktivni hidroksi kislinski obliki (Corsini in sod., 1995).

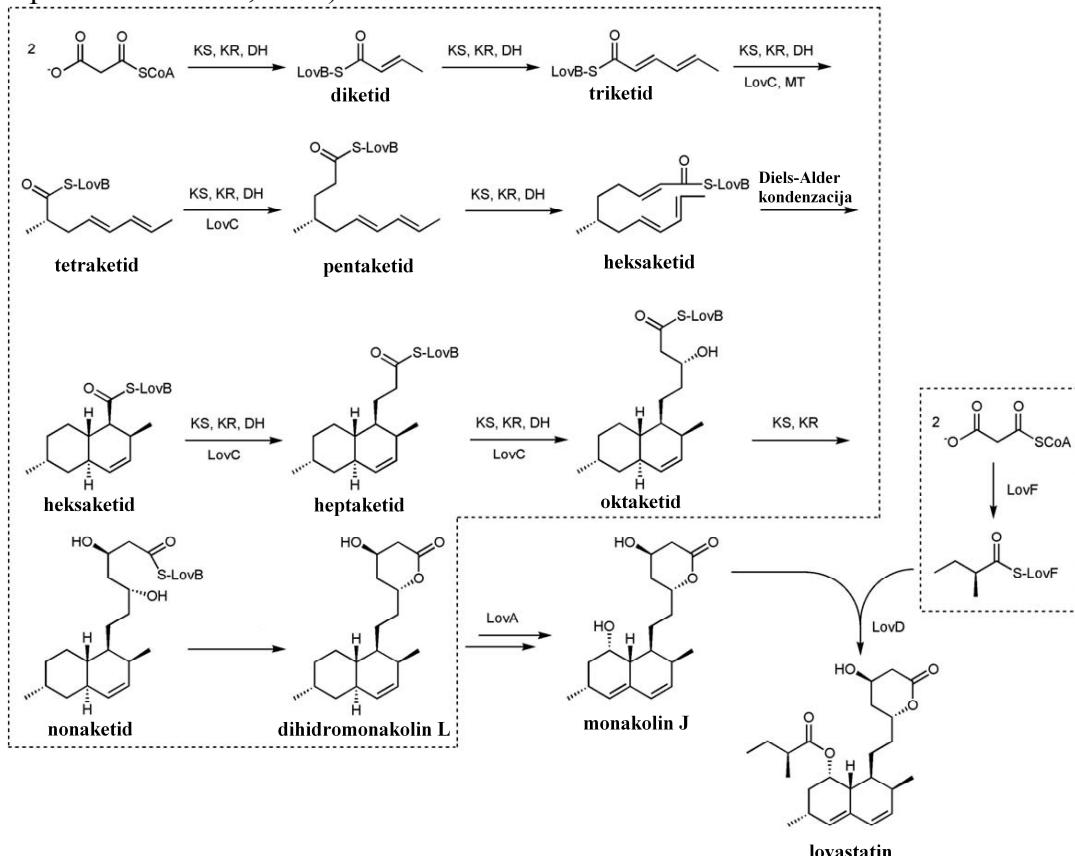
2.6.1.5 Metabolizem statinov

Po absorbciji, jetra biotransformirajo vse statine, kar povzroča njihovo nizko sistemsko biorazpoložljivost (Corsini in sod., 1999). Pri oksidativnem metabolizmu statinov sodelujejo različni CYP izoencimi (citokrom P450). CYP3A4 je najbolj prevladujoča izoforma, ki sodeluje pri presnovi lovastatina, simvastatina, atorvastatina in cerivastatina. Pravastatin se ne presnavlja s CYP izoencimi. Pri statinah, ki se lahko presnavljajo z več CYP izoencimi se lahko izognemo kopiranju zdravila, kadar je ena izmed poti inhibirana (Roche, 2005).

2.6.1.6 Pregled glavnih statinov

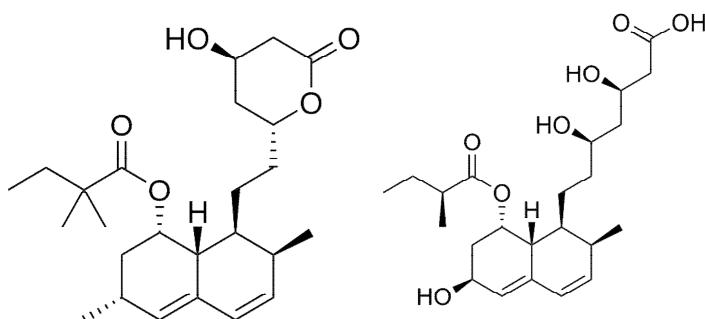
Lovastatin (znan tudi kot mevinolin, Mevacor ter monakolin K) je inhibitor HMG-CoA reduktaze in se ga uporablja za zniževanje stopnje holesterola v krvi pri ljudeh. Leta 1978 so Alberts in sod. izolirali tak inhibitor iz fermentacijskega gojišča *A. terreus* ter ga poimenovali mevinolin (Alberts in sod., 1980). Endo s sod. je leta 1979 iz glive *Monascus ruber* izoliral hipoholesterolemčno spojino monakolin K. Kasneje postane lovastatin uradno ime, *A. terreus* pa glavni producent tega sekundarnega metabolita. Aprila leta 1980 pričnejo lovastatin uporabljati pri kliničnih poskusih na zdravih ljudeh, avgusta 1987 pa FDA (Zvezni urad za živila in zdravila) izda uradno odobritev zdravila (Tobert, 2003). Lovastatin biosintetsko nastane z združitvijo dveh poliketidnih verig preko estrske vezi (Moore in sod., 1985). Ena veriga je diketid 2-metilbutirat, druga pa nonaketid, ki vsebuje značilen konjugiran heksahidronaftilenski sistem obročev. Sintezo diketidnega in nonaketidnega dela lovastatina ločeno katalizirata diketidna sintaza (LovF) in nonaketidna sintaza (LovB). Oba encima svoj poliketid sintetizirata z dodajanjem malonilne skupine na začetno acetilno enoto in dodajanjem metilne skupine iz S-adenozil-L-metionina (SAM). Ciklizacija poteka preko Diels-Alder kondenzacije (Hendrikson in sod., 1999). LovF in LovB spadata med PKS tipa I in vsebujeta več funkcionalnih domen: β -ketosintaza (KS), ketoreduktaza (KR), dehidrataza (DH), metil transferaza (MT),... V biosintezo

nonaketidnega dela je vključen tudi LovC, ki je enoil reduktaza. LovB in LovC katalizirata 35 reakcij za nastanek dihidromonakolina L, za kar je potrebno 9 molekul malonil-CoA, NADPH in SAM. LovA je citokrom P450 oksidaza, ki oksidira dihidromonakolin L v monakolin J, LovD pa transesteraza, ki kovalentno poveže diketid z monakolinom J (Campbell in Vederas, 2010).



Slika 10: Pot biosinteze lovastatina. Koraki, ki vključujejo PKS so v okvirjih s prekinjeno črto (Campbell in Vederas, 2010).

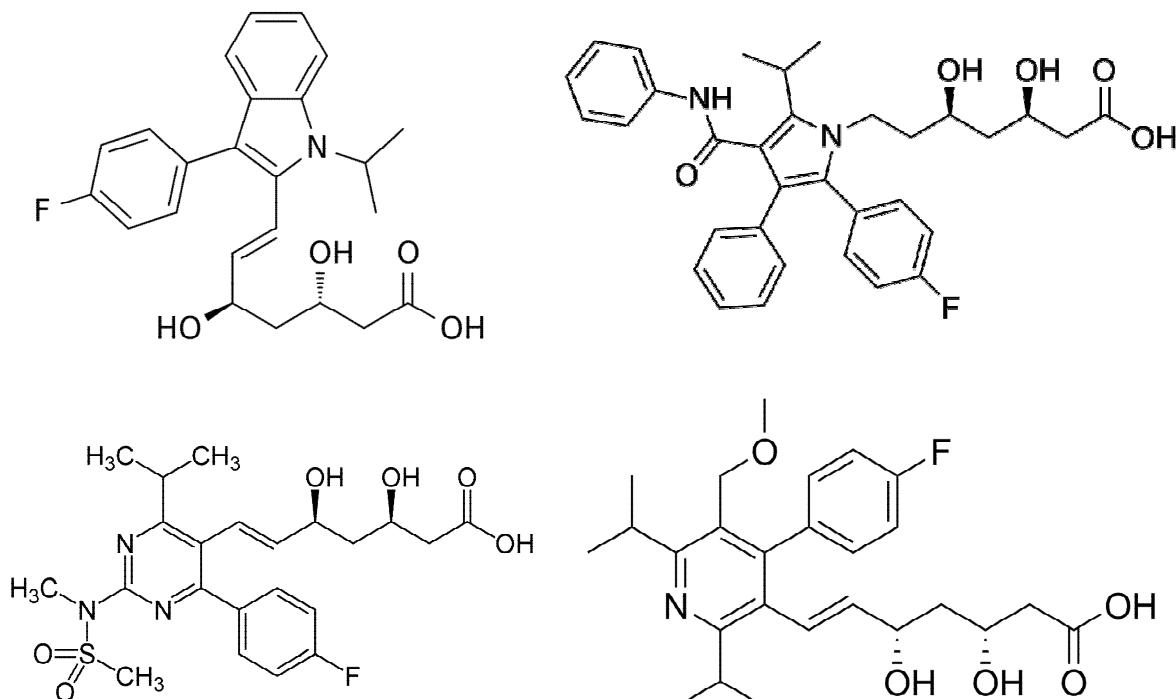
Simvastatin in pravastatin sta strukturno zelo podobna lovastatinu. Pri vseh treh gre za delno reducirane strukture naftilenskih obročev. Simvastatin in lovastatin sta v laktonski obliki neaktivna in morata biti za inhibicijo HMG-CoA reduktaze metabolizirana do aktivne hidroksi kislinske oblike (Hamelin in Turgeon, 1998).



Slika 11: Simvastatin (levo) in pravastatin (desno) (Sirtori, 2014).

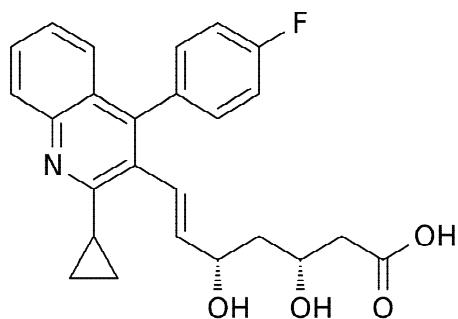
Razvoj simvastatina je bil tesno povezan z lovastatinom. Pri raziskavah na lovastatinu je farmacevtska družba Merck iz fermentacijskih produktov vrste *A. terreus* razvila sintetični derivat MK-733 (kasneje imenovan simvastin), ki je bolj učinkovit inhibitor HMG-CoA reduktaze. Pravastatin je derivat mevastatina, ki ga je v 1970-ih iz glive *Penicillium citrinum* izoliral Akira Endo (Tobert, 2003).

Statini tipa 2 so vsi v aktivni hidroksi kislinski obliki. Fluvastatin ima strukturo indolnega obroča, struktura atorvastatina temelji na pirolnem obroču, rosuvastatina pa na pirimidinskem. Cerivastatin je lipofilén in njegova struktura temelji na piridinskem obroču.



Slika 12: Fluvastatin (zgoraj levo), atorvastatin (zgoraj desno), rosuvastatin (spodaj levo) in cerivastatin (spodaj desno) (Istvan in Deisenhofer, 2001).

Eden novejših statinov, ki se je na trgu pojavil leta 2009 je pitavastatin s kinolinsko strukturo obroča. Pitavastatin je najmočnejši inhibitor HMG-CoA reduktaze z vrednostjo $IC_{50} = 0,1 \text{ nM}$.



Slika 13: Pitavastatin (Sirtori, 2014).

Nekatere farmakološke lastnosti po katerih se statini med seboj razlikujejo so navedene v preglednici 2.

Preglednica 2: Farmakološke lastnosti statinov (Sirtori, 2014).

	IC ₅₀ HMG-CoA reduktaza (nM)	Oralna absorpcija (%)	Biorazpoložljivost (%)	Jetrna ekstrakcija (%)	Proteinska vezava (%)	t _{1/2β} (h)	Standardna dnevna doza (mg)
Pravastatin	4	35	18	45	50	1-3	10-40
Lovastatin	2-4	30	5	≥70	>98	2-5	10-40
Simvastatin	1-2	60-85	<5	≥80	>95	2-5	10-40
Fluvastatin	3-10	98	30	≥70	>98	1-3	80
Atorvastatin	1,16	30	12	70	>98	7-20	10-80
Rosuvastatin	0,16	50	20	63	90	20	5-40
Pitavastatin	0,1	80	60		96	10-13	1-4

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Mikroorganizmi

Uporabljali smo seve *Aspergillus terreus var. aureus* (*A. terreus var. aureus*) 223, 352, 362, 2886 in 3073 ter *Neurospora crassa* (*N. crassa*) FGSC 4200. Sevi *A. terreus var. aureus* izvirajo iz mikrobiološke zbirke Službe za biotehnološki razvoj, sektor Biokemija, Krke d.d., Novo mesto. *N. crassa* FGSC 4200 izvira iz zbirke Fungal Genetics Stock Center (FGSC) - Medicinski center Univerze Kansas, Oddelek za mikrobiologijo, Kansas City, ZDA.

3.1.2 Kemikalije

Uporabljali smo naslednje kemikalije:

Difco, Detroit, Michigan, ZDA
kvasni ekstrakt
kazein-hidrolizat

Sigma, St. Louis, Missouri, ZDA
proteaza K
pufer MES
pepton
 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
N, N dimetilformamid
manitol

Kemika, Zagreb, Hrvaška
 KH_2PO_4

Merck, Darmstadt, Nemčija
sladni ekstrakt
agar
laktoza
glicerol

Carlo Erba, Milano, Italija
glukoza
natrijev kloroacetat

Braun, Rottweil, Nemčija
TWEEN 80
metanol
PDA
SDA

metilen klorid
lovastatin
fiziološka raztopina (0,9 % NaCl)
etanol

J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, ZDA
ocetna kislina
NaOH

3.1.3 Reagenti in raztopine

Proteinaza K

Pripravili smo raztopine proteinaze K v koncentracijah (standardna: 50 µg/ml, 10x in 100x nižja od standardne). Raztopino proteinaze K smo sterilizirali s filtracijo preko filtra s porami 0,22 µm in nato z redčenjem s sterilno vodo dosegli želene koncentracije.

Fiziološka raztopina

Pripravili smo 0,9 % raztopino NaCl in jo avtoklavirali 30 minut pri 121 °C.

Mešanica aminokislin

Pripravili smo 2 % raztopino kazein-hidrolizata in jo avtoklavirali 30 minut pri 121 °C.

Natrijev kloroacetat

Pripravili smo 33 % raztopino natrijevega kloroacetata in jo sterilizirali s filtracijo preko filtra s porami 0,22 µm.

2-deoksi-D-glukoza

Pripravili smo 33 % raztopino 2-deoksi-D-glukoze in jo sterilizirali s filtracijo preko filtra s porami 0,22 µm.

3.1.4 Gojišča

MYA2 (MALT 2 % YEAST EXTRACT AGAR):

Uporabljali smo tekoče in trdno gojišče MYA2.

Tekoče gojišče MYA2 smo pripravili iz sestavin:

sladni ekstrakt 20 g
kvasni ekstrakt 1 g
deionizirana voda do 1000 ml.

Za trdno gojišče smo dodali še agar v koncentraciji 20 g/l. Gojišči smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in $101,3 \cdot 10^3$ Pa nadtlaka.

Pri poskusu, s katerim smo inducirali mutagenezo s kolhicinom, smo pripravili trdno gojišče MYA2 z dodanim kolhicinom v končni koncentraciji 0,1 %.

LVB:

Uporabljali smo vegetativno in fermentacijsko gojišče LVB.

Vegetativno gojišče LVB smo pripravili iz sestavin:

sladna moka 15 g
pepton 10 g
CSL 5 g
pivski kvas 1, 2 g
 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3 ml
deionizirana voda do 1000 ml.

Fermentacijsko gojišče LVB smo pripravili iz sestavin:

laktoza 60 g
CSL 3,9 g
kvas protevit 4,1 g
sojina moka 7 g
 KH_2PO_4 0,8 g
deionizirana voda do 1000 ml.

Obe gojišči smo ob mešanju kuhalili do 85 °C ter nato uravnali pH na 6,4. Gojišči smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in $101,3 \cdot 10^3$ Pa nadtlaka.

Za selekcijo mutant rezistentnih na katabolno represijo smo pripravili trdno in tekoče fermentacijsko gojišče LVB z glukozo v končni koncentraciji 60 g/l namesto laktoze. Za trdno gojišče smo dodali še agar v končni koncentraciji 15 g/l.

Za selekcijo mutant rezistentnih na natrijev kloracetat smo pripravili trdno fermentacijsko gojišče LVB z dodanim natrijevim kloracetatom v končnih koncentracijah: 0,3 %, 0,7 %, 1 %, 1,2 %, 1,5 %.

Za selekcijo mutant rezistentnih na lasten metabolit lovastatin smo pripravili trdno fermentacijsko gojišče LVB z dodanim lovastatinom v končnih koncentracijah: 0,5 g/l, 0,75 g/l, 1 g/l, 1,2 g/l, 1,4 g/l, 1,6 g/l, 1,8 g/l.

MCD (modificiran Czapek Dox):

Uporabljali smo tekoče in trdno gojišče MCD.

Osnovno gojišče MCD smo pripravili iz sestavin:

glicerol 30 g
 NaNO_3 3 g
 K_2HPO_4 1 g
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g

KCl 0,5 g
FeSO₄ x 7H₂O 0,1 g
sladni ekstrakt 20 g
deionizirana voda do 1000 ml.

Za trdno gojišče smo dodali še agar v koncentraciji 20 g/l. Gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in 101,3·10³ Pa nadtlaka.

Za selekcijo mutant rezistentnih na katabolno represijo smo pripravili trdno MCD gojišče z dodano 2-deoksi-D-glukozo v končni koncentraciji 0,3 %.

TLG (TWEEN LACTOSE GLYCEROL)

Za shranjevanje spor smo uporabljali gojišče TLG, ki smo ga pripravili iz sestavin:

laktoza 5 g
glicerol 100 ml
TWEEN 80 1 ml
deionizirana voda do 1000 ml.

Gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri 121 °C in 101,3·10³ Pa nadtlaka.

PDA (POTATO DEXTROSE AGAR):

Uporabljali smo trdno gojišče PDA. Osnovno trdno gojišče smo ob segrevanju v deionizirani vodi resuspendirali PDA v končni koncentraciji 39 g/l ter uravnali pH na 5,6. Gojišče smo avtoklavirali 30 minut pri 121 °C in 101,3·10³ Pa nadtlaka.

Pri poskusu, s katerim smo inducirali mutagenezo z benomilom, smo pripravili trdno gojišče PDA z dodanim benomilom v končnih koncentracijah 2 mg/l, 4 mg/l, 6 mg/l.

SDA (SABOURAUD DEXTROSE AGAR):

Uporabljali smo trdno gojišče SDA z dodanim manitolom. Trdno gojišče SDA smo pripravili iz sestavin:

dekstroza 40 g
pepton 10 g
agar 15 g
manitol 182,1 g
deionizirana voda do 1000 ml.

Sestavine smo resuspendirali v vodi ter uravnali pH na 5,6. Gojišče smo avtoklavirali 30 minut pri 121 °C in 101,3·10³ Pa nadtlaka.

3.2 METODE

3.2.1 Vzdrževanje mikroorganizma

A. terreus var. aureus smo shranjevali v obliki spor. Za dolgoročno hrambo so bile spore zamrznjene pri temperaturi -80 °C. V času naših poskusov smo spore sevov *A. terreus var. aureus* 223, 352, 362, 2886 in 3073 hraniли v fiziološki raztopini z 10 % glicerolom pri koncentraciji spor 10^7 spor/ml. Tako pripravljene spore, shranjene v Falcon epruvetah pri temperaturi 4 °C, ohranijo viabilnosti več mesecev.

N. crassa FGSC 4200 smo v času naših poskusov gojili na trdnem gojišču SDA v vlažni komori pri temperaturi 28 °C. Sev smo vsak mesec precepili na sveže gojišče.

3.2.2 Indukcija kalitve spor pri *A. terreus var. aureus*

3.2.2.1 Priprava spor *A. terreus var. aureus*

Iz suspenzije spor shranjenih v 10 % glicerolu smo odpipetirali začetni inkokulum 0,1 ml oziroma 0,5 ml v 1,5 ml-mikrocentrifugirko ter dodali tekoče gojišče MYA2 do skupnega volumna 1 ml. Suspenzijo spor smo centrifugirali 5 min pri 13000 obr./min in s tehnikami aseptičnega dela odstranili supernatant, nato pa spore resuspendirali v 1 ml tekočega gojišča MYA2. Postopek centrifugiranja in resuspendiranja smo ponovili dvakrat.

3.2.2.2 Postopek indukcije

Kalitev spor *A. terreus var. aureus* smo inducirali s temperaturnim šokom, z obdelavo s proteoliznim encimom (razgradimo hidrofobne proteine v ovoju spore), z mehansko obdelavo ter s predinkubacijo v mešanici aminokislin.

3.2.2.2.1 Indukcija s temperaturnim šokom

Pripravljene spore v 1,5 ml-mikrocentrifugirkah smo inkubirali v vodi segreti na temperature 50 °C, 60 °C, 70 °C in 80 °C v trajanju 5 min ter pri temperaturi 100 °C v trajanju 5 s in 10 s.

3.2.2.2.2 Indukcija z obdelavo s proteazo K

Pripravljene spore v 1,5 ml-mikrocentrifugirkah smo inkubirali s proteazo K v končnih koncentracijah 50 µg/ml, 5 µg/ml in 0,5 µg/ml v trajanju 10 min. Po 10 min smo suspenzijo spor centrifugirali 5 min pri 13000 obr./min in s tehnikami aseptičnega dela odstranili supernatant, nato pa spore resuspendirali v 1 ml tekočega gojišča MYA2. Postopek centrifugiranja in resuspendiranja smo ponovili dvakrat.

3.2.2.2.3 Indukcija z mehansko obdelavo (intenzivno mešanje)

Pripravljene spore v 1,5 ml-mikrocentrifugirkah smo s tehnikami aseptičnega dela prenesli v 30 ml tekočega gojišča MYA2 v 300 ml erlenmajericah in inkubirali na stresalniku pri 250 obr./min in temperaturi 30 °C v trajanju 12 h.

3.2.2.2.4 Indukcija z mehansko obdelavo (Potterjev homogenizator)

Pripravljene spore v 1,5 ml-mikrocentrifugirkah smo s tehnikami aseptičnega dela prenesli v Potterjev homogenizator. Suspenzijo spor smo stokrat pasirali skozi Potterjev homogenizator.

3.2.2.2.5 Indukcija s predinkubacijo v mešanici aminokislin

Pripravljene spore v 1,5 ml-mikrocentrifugirkah smo centrifugirali 5 min pri 13000 obr./min in s tehnikami aseptičnega dela odstranili supernatant, nato pa spore resuspendirali v 1 ml 2 % kazein-hidrolizata. Spore smo inkubirali pri sobni temperaturi v trajanju 1 h. Po 1 h smo suspenzijo spor centrifugirali 5 min pri 13000 obr./min in s tehnikami aseptičnega dela odstranili supernatant, nato pa spore resuspendirali v 1 ml tekočega gojišča MYA2. Postopek centrifugiranja in resuspendiranja smo ponovili dvakrat.

3.2.2.3 Različni poskusi obdelave spor

Opravili smo šest različnih poskusov indukcije kalitve spor z namenom izboljšati in pospešiti ter čim bolj sinhronizirati kalitev spor v predfermentorski fazi. Spore smo v posameznem poskusu obdelali z različnimi postopki, nato pa vzorce testirali, tako da smo jih primerjali s kontrolnim vzorcem.

a) 1. poskus

Uporabili smo tri različne seve *A. terreus var. aureus*: 223, 352, 362 z začetnim inokulom 0,1 ml suspenzije spor. Kalitev spor smo inducirali:

- s temperaturnim šokom (dvig temperature do 80 °C v trajanju 5 min),
- z obdelavo s proteazo K (končna koncentracija proteaze K 0,5 µg/ml v trajanju 10 min),
- z intenzivnim mešanjem (stresanje pri 250 obr./min v trajanju 12 h).

Po indukciji smo spore inkubirali v 300 ml erlenmajericah v 30 ml tekočega gojišča MYA2 na stresalniku pri 100 obr./min in temperaturi 30 °C. Pri istih pogojih smo inkubirali tudi kontrolni vzorec (brez indukcije). 7,5 h ter 12 h po indukciji smo vse vzorce mikroskopirali z namenom spremeljanja nabrekanja in kalitve spor. 24 h po indukciji smo ustavili inkubacijo in vsem vzorcem izmerili suho biomaso.

b) 2. poskus

Uporabili smo sev *A. terreus var. aureus* 223 z začetnim inokulom 0,5 ml suspenzije spor. Kalitev spor smo inducirali:

- s temperaturnim šokom (dvig temperature do 50 °C , 60 °C , 70 °C , 80 °C v trajanju 5 min ter do 100 °C v trajanju 5 s in 10 s),
- z obdelavo s proteazo K (končna koncentracija proteaze K 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml v trajanju 10 min).

2. poskus smo opravili v dveh serijah. Po indukciji smo spore inkubirali v 500 ml erlenmajericah v 60 ml tekočega gojišča MYA2 na stresalniku pri 100 obr./min in temperaturi 30 °C. Pri istih pogojih smo inkubirali tudi kontrolni vzorec (brez indukcije). 10 h po indukciji smo vse vzorce mikroskopirali z namenom spremljanja nabrekanja in kalitve spor. 24 h po indukciji smo ustavili inkubacijo in vsem vzorcem izmerili suho biomaso.

c) 3. poskus

Uporabili smo sev *A. terreus var. aureus* 223 z začetnim inokulom 0,5 ml suspenzije spor. Kalitev spor smo inducirali:

- z mehansko obdelavo (Potterjev homogenizator),
- z predinkubacijo v mešanici aminokislin (2 % kazein-hidrolizat v trajanju 1 h).

3. poskus smo opravili v dveh serijah. Po indukciji smo spore inkubirali v 500 ml erlenmajericah v 50 ml tekočega gojišča MYA2 na stresalniku pri 100 obr./min in temperaturi 30 °C. Pri istih pogojih smo inkubirali tudi kontrolni vzorec (brez indukcije). 72 h po indukciji smo ustavili inkubacijo in vsem vzorcem izmerili suho biomaso.

d) 4. poskus

Uporabili smo sev *A. terreus var. aureus* 223 z začetnim inokulom 0,5 ml suspenzije spor. Kalitev spor smo inducirali:

- s temperaturnim šokom (dvig temperature do 50 °C v trajanju 5 min ter do 100 °C v trajanju 5 s),
- z obdelavo s proteazo K (končna koncentracija proteaze K 0,5 µg/ml v trajanju 10 min).

4. poskus smo opravili v dveh serijah. Po indukciji smo spore inkubirali v 500 ml erlenmajericah v 60 ml tekočega vegetativnega gojišča LVB na stresalniku pri 220 obr./min, temperaturi 28 °C in 50 % relativni vlažnosti. Po 24 h smo iz obeh serij s tehnikami aseptičnega dela prenesli 1 ml suspenzije iz vegetativnega gojišča v 60 ml tekočega fermentacijskega gojišča LVB v 500 ml erlenmajericah z nadaljnjo inkubacijo pri 220 obr./min, temperaturi 28 °C in 50 % relativni vlažnosti v trajanju 144 h. Vsem vzorcem smo po 24 h inkubacije v vegetativnem gojišču izmerili pH, PMV in sedimentacijo. Po 144 h inkubacije v fermentacijskem gojišču smo vsem vzorcem izmerili vsebnost lovastatina. Kontrolne vzorce (brez indukcije) smo pripravili po istem postopku.

e) 5. poskus

Uporabili smo sev *A. terreus var. aureus* 223 z začetnim inokulom 0,5 ml suspenzije spor. Kalitev spor smo inducirali:

- s temperaturnim šokom (dvig temperature do 100 °C v trajanju 5 s).

Začetni inokulum smo pripravili iz 1,5 ml suspenzije spor, ki smo jo po čiščenju v 1,5 ml-mikrocentrifugirki s tehnikami aseptičnega dela razdelili v tri serije po 0,5 ml suspenzije spor. Po indukciji smo spore inkubirali v 300 ml erlenmajericah v 40 ml tekočega vegetativnega gojišča LVB na stresalniku pri 220 obr./min, temperaturi 28 °C in 50 % relativni vlažnosti. Po 24 h smo iz prvih dveh serij s tehnikami aseptičnega dela prenesli 1 ml suspenzije iz vegetativnega gojišča v 60 ml tekočega fermentacijskega gojišča LVB v 500 ml erlenmajericah. Inokulacijo iz vegetativnega v fermentacijsko gojišče smo pri vsaki seriji ponovili trikrat. Vsa inokulirana fermentacijska gojišča smo inkubirali na stresalniku pri 220 obr./min, temperaturi 28 °C in 50 % relativni vlažnosti v trajanju 120 h. Vsem vzorcem smo po 24 h inkubacije v vegetativnem gojišču izmerili pH, PMV in sedimentacijo. Po 120 h inkubacije v fermentacijskem gojišču smo vsem vzorcem izmerili vsebnost lovastatina. Kontrolne vzorce (brez indukcije) smo pripravili po istem postopku.

f) 6. poskus

Uporabili smo sev *A. terreus var. aureus* 223 z začetnim inokulom 0,5 ml suspenzije spor. Kalitev spor smo inducirali:

- s temperturnim šokom (dvig temperature do 100 °C v trajanju 5 s).

Začetni inokulum smo pripravili iz 1,5 ml suspenzije spor, ki smo jo po čiščenju v 1,5 ml-mikrocentrifugirki s tehnikami aseptičnega dela razdelili v tri serije po 0,5 ml suspenzije spor. Po indukciji smo spore inkubirali v 300 ml erlenmajericah v 40 ml tekočega vegetativnega gojišča LVB na stresalniku pri 220 obr./min, temperaturi 28 °C in 50 % relativni vlažnosti. Po 19 h smo iz vseh treh serij s tehnikami aseptičnega dela prenesli 1 ml suspenzije iz vegetativnega gojišča v 60 ml tekočega fermentacijskega gojišča LVB v 500 ml erlenmajericah. Inokulacijo iz vegetativnega v fermentacijsko gojišče smo pri vsaki seriji ponovili trikrat. Vsa inokulirana fermentacijska gojišča smo inkubirali na stresalniku pri 220 obr./min, temperaturi 28 °C in 50 % relativni vlažnosti v trajanju 125 h. Vsem vzorcem smo po 19 h inkubacije v vegetativnem gojišču izmerili pH, PMV in sedimentacijo. Po 125 h inkubacije v fermentacijskem gojišču smo vsem vzorcem izmerili vsebnost lovastatina. Kontrolne vzorce (brez indukcije) smo pripravili po istem postopku.

3.2.2.4 Testiranje vzorcev

Vzorce smo testirali z mikroskopiranjem, določanjem suhe biomase, določanjem pH, PMV in sedimentacije po inkubaciji v vegetativnem gojišču ter končno HPLC analizo. S testiranjem smo želeli seleкционirati postopek obdelave spor, s katerim bi povečali produkcijo lovastatina glede na kontrolni vzorec.

3.2.2.4.1 Mikroskopiranje

Vzorce smo mikroskopirali s fazno-kontrastnim mikroskopom, kjer lahko opazujemo prozorne strukture, ki se med seboj razlikujejo le v optični gostoti oziroma lomnem količniku in jih ni potrebnoobarvati. S tehnikami aseptičnega dela smo prenesli 100 µl suspenzije vzorca na objektno stekelce, jo pokrili s krovnim stekelcem in mikroskopirali z dodatkom imerzijskega olja pod imerzijsko povečavo (1000x povečava).

3.2.2.4.2 Določanje suhe biomase

Za določanje suhe biomase smo uporabili nučiranje, ki je filtrirna metoda, katero pospešimo z ustvarjanjem podtlaka s pomočjo vodnega toka. Tekoče gojišče z biomaso smo zlili v zbirno posodo nad filter papirjem. Filter papirje smo pred tem stehtali na 0,1 mg natančno. Z vodno črpalko smo presesali tekočino skozi filter v presesalno bučo, nato pa smo filtre z biomaso posušili pri temperaturi 60 °C. Maso suhe biomase smo dobili tako, da smo filter s suho snovjo stehtali in od rezultata odšteli težo samega filtra.

3.2.2.4.3 Določanje pH, PMV in sedimentacije

Po inokulaciji iz vegetativnega v fermentacijsko gojišče smo vzorcem v vegetativnih gojiščih izmerili pH, PMV in sedimentacijo. Vrednost pH smo merili z digitalnim pH metrom, tako da smo elektrodo potopili v vzorce vegetativnih gojišč. Rast *A. terreus var. aureus* v tekočem vegetativnem gojišču smo spremajali z merjenjem PMV (packed mycelial volume). PMV je tisti delež skupnega volumna gojišča, ki ga zaseda micelij po centrifugaciji. PMV smo določili tako, da smo 10 ml brozge centrifugirali pri 2500 obr./min v trajanju 10 min ter izmerili volumen supernatanta. PMV smo izračunali po naslednji formuli:

$$PMV (\%) = [(10ml - \text{volumen supernatanta v ml}) / (10ml)] \times 100 \quad \dots(4)$$

Sedimentacijo smo merili po istem postopku, le da vzorcev nismo centrifugirali, temveč smo jih pustili posedati 1 h. Sedimentacijo smo izračunali po naslednji formuli:

$$sed (\%) = [(10ml - \text{volumen supernatanta v ml}) / (10ml)] \times 100 \quad \dots(5)$$

3.2.2.4.4 Priprava vzorcev za HPLC analizo

Po končani inkubaciji v fermentacijskem gojišču smo vzorce pripravili za HPLC analizo za določitev vsebnosti lovastatina. Vzorce v 500 ml erlenmajericah smo najprej homogenizirali z dispergorjem Ultra turrax v trajanju 60 s. 20 ml homogeniziranega vzorca smo odpipetirali v 50 ml bučo ter dodajali NaOH (cca. 700 µl) dokler nismo dosegli pH vrednosti 10,5. Nato smo v bučo dodali metanol do skupnega volumna 50 ml ter z magnetnim mešalom mešali v trajanju 30 min. Po mešanju smo vzorce prefiltrirali s filter papirjem ter shranili v 10 ml epruvetah na temperaturi 4 °C. Tako pripravljene vzorce nam je analiziral Oddelek za analitiko – HPLC analitika Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto.

3.2.3 Mutageneza *A. terreus var. aureus*

3.2.3.1 Priprava spor *A. terreus var. aureus*

Iz suspenzije spor shranjenih v 10 % glicerolu smo odpipetirali začetni inokulum 0,1 ml v 1,5 ml-mikrocentrifugirko ter dodali tekoče gojišče MYA2 do skupnega volumna 1 ml. Suspenzijo spor smo centrifugirali 5 min pri 13000 obr./min in s tehnikami aseptičnega dela odstranili supernatant, nato pa spore resuspendirali v 1 ml tekočega gojišča MYA2.

Postopek centrifugiranja in resuspendiranja smo ponovili dvakrat. Uporabili smo seva *A. terreus var. aureus* 2886 in *A. terreus var. aureus* 3073.

3.2.3.2 Mutageneza z UV

3.2.3.2.1 Določanje koncentracije 2-deoksi-D-glukoze

5 g 2-deoksi-D-glukoze smo raztopili v 15 ml demineralizirane vode ter izvedli sterilizacijo s filtracijo preko filtra z velikostjo por 0,2 µm. Nato smo v epruvete s 5 ml tekočega gojišča MCD dodali raztopino 2-deoksi-D-glukoze do končnih koncentracij 0,02 %, 0,04 %, 0,06 %, 0,08 %, 0,10 %, 0,20 % in 0,30 %. Vsa gojišča smo s tehnikami aseptičnega dela inkubirali z 0,1 ml suspenzije spor *A. terreus var. aureus* 2886 in jih inkubirali pri temperaturi 28 °C. Med inkubacijo smo spremljali rast *A. terreus var. aureus* 2886 in vpliv koncentracije 2-deoksi-D-glukoze na inhibicijo rasti. Za selekcijo mutant rezistentnih na katabolno represijo smo izbrali največjo koncentracijo pri kateri rast ni v celoti inhibirana.

3.2.3.2.2 Postopek mutiranja z UV

0,1 ml suspenzije spor *A. terreus var. aureus* 2886 smo s tehnikami aseptičnega dela razmazali na trdno gojišče MCD z dodano 2-deoksi-D-glukozo v končni koncentraciji 0,3 %. Plošče z razmazom smo izpostavili UV žarčenju z energijo 500 erg/mm² v trajanju 5 s in na razdalji 30 cm. Plošče smo inkubirali pri temperaturi 28 °C.

3.2.3.2.3 Pregledovanje in selekcija mutant

Po približno sedem dnevni inkubaciji in pojavu različno velikih kolonij *A. terreus var. aureus* 2886 na gojišču MCD z dodano 2-deoksi-D-glukozo smo s tehnikami aseptičnega dela posamezne kolonije pikirali na trdno gojišče LVB z glukozo - zajeli smo celotno kolonijo in jo nanovo zasejali na gojišče. S tem postopkom smo pridobili večje število čistih, monospornih kolonij, ki smo jih inkubirali pri temperaturi 28 °C.

Po štirinajstih dneh smo iz vseh monospornih kolonij pripravili vzorce za oceno produkcije lovastatina s tankoplastno kromatografijo. S tehnikami aseptičnega dela smo iz kolonije odrezali agarski čepek ter ga stresali v 3 ml metanola v trajanju 30 min pri 220 obr./min. 15 µl ekstraktov in 1 µl standarda lovastatina v metanolu s koncentracijo 10 mg/ml smo nanesli na nosilne plošče 20 x 20 cm premazane s silikagelom 60 F₂₅₄ z debelino 0,2 mm. Plošče smo za 1 h namočili v mobilno fazo iz metilen klorida in acetne kisline v razmerju 17:3. Nato smo opazovali intenziteto rumene barve pod UV lučjo 254 nm pri vrednosti Rf kot ga doseže standard.

Vzorce, ki so kazali dobro intenziteto smo nacepili v vegetativno gojišče LVB. Najprej smo s tehnikami aseptičnega dela iz monospornih kolonij odrezali agarski čepek ter ga z vortex-om homogenizirali v 5 ml TWEEN-a v epruveti s kroglicami. Nato smo 0,1 ml suspenzije s tehnikami aseptičnega dela prenesli v 9 ml vegetativnega gojišča LVB v 50 ml Falcon epruvetah. Gojišča smo inkubirali na stresalniku pri 220 obr./min, temperaturi 28 °C in 50 % relativni vlažnosti v trajanju 18 h. Po inkubaciji smo s tehnikami

aseptičnega dela prenesli 1 ml suspenzije iz vegetativnega gojišča v 9 ml tekočega fermentacijskega gojišča LVB. Prav tako smo 1 ml suspenzije iz vegetativnega gojišča prenesli v 9 ml tekočega fermentacijskega gojišča LVB z glukozo namesto laktoze. Vsem vzorcem smo po 18 h inkubacije v vegetativnem gojišču izmerili pH in PMV. Inokulirana fermentacijska gojišča smo inkubirali na stresalniku pri 220 obr./min, temperaturi 28 °C in 50 % relativni vlažnosti v trajanju 120 h. Vzorcem smo po 120 h inkubacije v fermentacijskem gojišču izmerili pH in PMV.

Po 120 h inkubacije smo vzorce testirali z biološkim testiranjem lovastatina z *N. crassa*. Uporabili smo trdno gojišče SDA z manitolom, ki smo ga ohlajenega na 50 °C inokulirali z 2 ml suspenzije spor *N. crassa*. 250 ml inokuliranega gojišča smo enakomerno razlili na plošče velikosti 30 x 30 cm razdeljene na 60 razdelkov. V vsak razdelek smo nanesli posamezen flokul, pri čemer smo pazili, da je bilo med flokulami dovolj razmika, da ne bi prišlo do prekrivanja con inhibicije. Na isto ploščo smo nanesli več flokulov iz istih vzorcev, prav tako pa smo na vsako ploščo nanesli tudi več flokulov iz kontrolnega vzorca. Plošče smo inkubirali v vlažnostni komori pri temperaturi 28 °C do pojava con inhibicije (približno 18 h). Vzorcem in kontroli smo izmerili premer cone inhibicije. Kot kontrolne vzorce pri biološkem testiranju, smo uporabili seve, ki po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj, sektor Biokemija, Krke d.d., Novo mesto dosegajo standardni premer cone inhibicije.

Dva vzorca smo po inkubaciji v fermentacijskem gojišču z laktozo testirali tudi s HPLC. Vzorca smo pripravili po že znanem postopku (glej 3.2.3.2.3).

3.2.3.3 Mutageneza s kolhicinom in benomilom

3.2.3.3.1 Postopek mutiranja s kolhicinom in benomilom

0,1 ml suspenzije spor *A. terreus var. aureus* 3073 smo s tehnikami aseptičnega dela razmazali na trdno gojišče MYA2 z dodanim kolhicinom v končni koncentraciji 0,1 % ter inkubirali pri temperaturi 28 °C v trajanju deset dni. Za nadaljnjo mutagenezo z benomilom smo s tehnikami aseptičnega dela v Potterjevem homogenizatorju homogenizirali del preraščenega gojišča v 3 ml TWEEN-a ter 0,1 ml suspenzije razmazali na trdno gojišče PDA z benomilom v končnih koncentracijah 2 mg/l, 4 mg/l in 6 mg/l.

3.2.3.3.2 Pregledovanje in selekcija po mutagenezi s kolhicinom

Del preraščenega gojišča MYA2 s kolhicinom smo s tehnikami aseptičnega dela v Potterjevem homogenizatorju homogenizirali v 3 ml TWEEN-a ter 0,1 ml suspenzije razmazali na trdno gojišče LVB z dodanim lovastatinom v končnih koncentracijah: 0,5 g/l, 0,75 g/l, 1 g/l, 1,2 g/l, 1,4 g/l, 1,6 g/l, 1,8 g/l. Prav tako smo 0,1 ml suspenzije razmazali na trdno gojišče LVB z dodanim natrijevim kloracetatom v končni koncentraciji 0,3 %. Po približno sedem dnevni inkubaciji in pojavu različno velikih kolonij *A. terreus var. aureus* 3073 smo s tehnikami aseptičnega dela posamezne kolonije pikirali na trdno gojišče LVB z dodanim lovastatinom v končnih koncentracijah: 0,5 g/l, 0,75 g/l, 1 g/l, 1,2 g/l, 1,4 g/l, 1,6 g/l, 1,8 g/l ter na trdno gojišče LVB z dodanim natrijevim kloracetatom v končni koncentraciji 0,3 % tako, da smo pridobili monosporne kolonije.

Za nadaljnjo selekcijo mutant smo uporabili tankoplastno kromatografijo (glej 3.2.3.2.3) in enak postopek kultivacije kot pri UV mutantah (glej 3.2.3.2.3), le da smo tokrat kot fermentacijsko gojišče uporabili samo tekoče gojišče LVB z laktozo.

Po končani inkubaciji v fermentacijskem gojišču smo vzorce pripravili za HPLC analizo za določitev vsebnosti lovastatina (glej 3.2.2.4.4).

3.2.3.4 Preizkus vpliva koncentracije natrijevega kloroacetata na rast *A. terreus var. aureus*

Na trdna gojišča LVB z dodanim natrijevim kloroacetatom v končnih koncentracijah: 0,3 %, 0,7 %, 1 %, 1,2 %, 1,5 % smo razmazali 0,1 ml suspenzije spor *A. terreus var. aureus* 3073. Po trideset dnevni inkubaciji pri temperaturi 28 °C smo pregledali plošče in izmerili premer posameznih kolonij.

4 REZULTATI

4.1 INDUKCIJA KALITVE SPOR *A. terreus var. aureus* IN OCENA PRODUKCIJE LOVASTATINA

Opravili smo šest različnih poskusov indukcije kalitve spor. Rezultati testiranja vzorcev po indukciji so primerljivi s kontrolnim vzorcem pri posameznem poskusu.

4.1.1 1. poskus (testiranje vzorcev z mikroskopiranjem in določanjem suhe biomase)

V 1. poskusu smo pri sevih *A. terreus var. aureus* 223, 352 in 362 inducirali kalitev spor s temperaturnim šokom (dvig temperature do 80 °C v trajanju 5 min), z obdelavo s proteazo K (končna koncentracija proteaze K 0,5 µg/ml v trajanju 10 min) ter z intenzivnim mešanjem (stresanje pri 250 obr./min v trajanju 12 h). Z mikroskopiranjem vzorcev 12 h po indukciji smo ugotovili, da obdelava s temperaturnim šokom pri vseh sevih prepreči kalitev spor. Razvitost micelija po obdelavi s proteazo K in intenzivnem mešanju je pri vseh sevih podobna kontroli z izjemo seva 223 po obdelavi s proteazo K, ki je imel slabše razvit micelij. Seva 352 in 362 sta po stresanju pri 250 obr./min v trajanju 12 h že razvila manjše pelete. Na sliki 14 je razvidno, da pri sevu 223 7,5 h po indukciji s temperaturnim šokom 5 min na 80 °C ni prišlo do rasti hif ter do nabrekanja spor.



Slika 14: Sev *A. terreus var. aureus* 223 7,5 h po indukciji s temperaturnim šokom 5 min na 80 °C, 1000x imerzijska povečava.

Preglednica 3: Mikroskopiranje vzorcev s fazno kontrastnim mikroskopom pri 1. poskusu 12 h po indukciji (1000x imerzijska povečava).

Sev <i>A. terreus</i> var. <i>aureus</i>	Temperaturni šok (80 °C, 5 min)	Proteaza K (0,5 µg/ml, 10 min)	Stresanje (250 obr./min, 12 h)	Kontrola
223	spore ne kalijo	slabše razvit micelij	dobro razvit micelij	dobro razvit micelij
352	spore ne kalijo	dobro razvit micelij	dobro razvit micelij, pojav peletov	dobro razvit micelij
362	spore ne kalijo	dobro razvit micelij	dobro razvit micelij, pojav peletov	dobro razvit micelij

Tehtanje suhe biomase 24 h po indukciji s temperaturnim šokom ni bilo merljivo pri vseh treh sevih, kar potrjuje naša opažanja pri mikroskopiranju. V nasprotju z rezultatom mikroskopiranja smo izmerili povisano suho biomaso po obdelavi s proteazo K pri sevu 223 in manjšo suho biomaso po intenzivnem mešanju pri sevu 362 v primerjavi s kontrolo.

Preglednica 4: Suha biomasa vzorcev pri 1. poskusu 24 h po indukciji.

Sev <i>A. terreus</i> var. <i>aureus</i>	Postopek indukcije	Suha biomasa (mg)
223	temperaturni šok (80 °C, 5 min)	ni merljivo
	proteaza K (0,5 µg/ml, 10 min)	12,4
	stresanje (250 obr./min, 12 h)	9,2
	kontrola	8,9
352	temperaturni šok (80 °C, 5 min)	ni merljivo
	proteaza K (0,5 µg/ml, 10 min)	7,8
	stresanje (250 obr./min, 12 h)	18
	kontrola	11,8
362	temperaturni šok (80 °C, 5 min)	ni merljivo
	proteaza K (0,5 µg/ml, 10 min)	11,0
	stresanje (250 obr./min, 12 h)	11,6
	kontrola	15,0

4.1.2 2. poskus (testiranje vzorcev z mikroskopiranjem in določanjem suhe biomase)

V 2. poskusu smo pri sevu *A. terreus* var. *aureus* 223 inducirali kalitev spor s temperaturnim šokom (dvig temperature do 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C v trajanju 5 min ter do 100 °C v trajanju 5 s in 10 s) in z obdelavo s proteazo K (končna koncentracija proteaze K 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml v trajanju 10 min). Mikroskopiranje vzorcev 10 h po indukciji je pokazalo, da obdelava s temperaturnim šokom pri 60 °C, 70 °C, 80 °C v trajanju 5 min prepreči kalitev spor, kar potrjuje tudi tehtanje suhe biomase. Najbolj razvit micelij ter tudi povisano suho biomaso smo ugotovili po temperaturnem šoku 50 °C v trajanju 5 min in 100 °C v trajanju 5 s. Obdelava spor pri 100 °C v trajanju 10 s sicer ni v celoti preprečila kalitve, je pa povzročila znatno slabšo rast micelija (izmerili smo približno 60 % manj suhe biomase kot po indukciji pri 100 °C v trajanju 5 s). Nekoliko povisano suho biomaso smo izmerili tudi po obdelavi s proteazo K (končna koncentracija 0,5 µg/ml v trajanju 10 min). Pri ostalih vzorcih obdelanih s proteazo K smo izmerili manjšo suho biomaso kot pri kontroli.

Preglednica 5: Mikroskopiranje vzorcev *A. terreus var. aureus* 223 s fazno kontrastnim mikroskopom pri 2. poskusu 10 h po indukciji (1000x imerzijska povečava).

	Postopek indukcije	Opis vzorca
Temperaturni šok	50 °C, 5 min	polovični delež spor kali predvsem v agregatih
	60 °C, 5 min	spore ne kalijo
	70 °C, 5 min	spore ne kalijo
	80 °C, 5 min	spore ne kalijo
	100 °C, 5 s	polovični delež spor kali
	100 °C, 10 s	slabša kalitev kot pri kontroli
Proteaza K	50 µg/ml, 10 min	manjši agregati spor, slabša kalitev kot pri kontroli
	5 µg/ml, 10 min	redke spore kalijo v aggregatih
	0,5 µg/ml, 10 min	slabša kalitev kot pri kontroli
Kontrola		polovični delež spor kali

Preglednica 6: Suha biomasa vzorcev pri 2. poskusu 24 h po indukciji.

	Postopek indukcije	Serija	Suha biomasa (mg)
Temperaturni šok	50 °C, 5 min	1	46,2
		2	42,4
	60 °C, 5 min	1	ni merljivo
		2	ni merljivo
	70 °C, 5 min	1	ni merljivo
		2	ni merljivo
Proteaza K	80 °C, 5 min	1	ni merljivo
		2	ni merljivo
	100 °C, 5 s	1	47,3
		2	42,0
	100 °C, 10 s	1	28,4
		2	27,3
Kontrola	50 µg/ml	1	35,0
		2	22,2
	5 µg/ml	1	36,1
		2	32,7
	0,5 µg/ml	1	37,9
		2	38,0
		1	36,7
		2	33,4

4.1.3 3. poskus (testiranje vzorcev z določanjem suhe biomase)

V 3. poskusu smo pri sevu *A. terreus var. aureus* 223 inducirali kalitev spor z mehansko obdelavo (Potterjev homogenizator) ter s predinkubacijo v mešanici aminokislin (2 % kazein-hidrolizat v trajanju 1 h). Izmerili smo nekoliko povisano suho biomaso po obdelavi s Potterjevim homogenizatorjem. Pri vzorcu s predinkubacijo v mešanici aminokislin ni prišlo do povečanja suhe biomase v primerjavi s kontrolo.

Preglednica 7: Suha biomasa vzorcev pri 3. poskusu 72 h po indukciji.

Postopek indukcije	Serija	Suha biomasa (mg)
Potterjev homogenizator	1	351,0
	2	323,3
Predinkubacija v mešanici aminokislin, 1 h	1	338,4
	2	327,2
Kontrola	1	343,8
	2	311,9

4.1.4 4. poskus (testiranje vzorcev s HPLC analizo)

V 4. poskusu smo pri sevu *A. terreus var. aureus* 223 inducirali kalitev spor s temperaturnim šokom (dvig temperature do 50 °C v trajanju 5 min ter do 100 °C v trajanju 5 s) in z obdelavo s proteazo K (končna koncentracija proteaze 0,5 µg/ml v trajanju 10 min). Meritev pH 24 h po indukciji in inkubaciji v vegetativnem gojišču je primerljiva s kontrolo. Izmerili smo nekoliko povišan PMV pri vzorcih obdelanih s temperaturnim šokom. Pri vseh vzorcih je bila sedimentacija 100 %.

Preglednica 8: pH, PMV in sedimentacija vzorcev pri 4. poskusu 24 h po indukciji.

Postopek indukcije	Serija	pH	PMV (%)	Sedimentacija (%)
Temperaturni šok	1	5,82	16,0	100
	2	5,84	16,0	100
	1	5,77	14,0	100
	2	5,79	18,0	100
Proteaza K (0,5 µg/ml, 10 min)	1	5,71	15,0	100
	2	5,94	13,0	100
Kontrola	1	5,85	14,0	100
	2	5,87	15,0	100

168 h po indukciji in 144 h po inkubaciji v fermentativnem gojišču je bila morfologija micelija pri vseh vzorcih pretežno v peletni obliki, pri nekaterih vzorcih pa je bila vidna tudi filamentozna rast. Na sliki 15 je vidna rast hif in nastanek spor pri *A. terreus var. aureus* 223 168 h po indukciji s temperaturnim šokom 5 min na 50 °C.

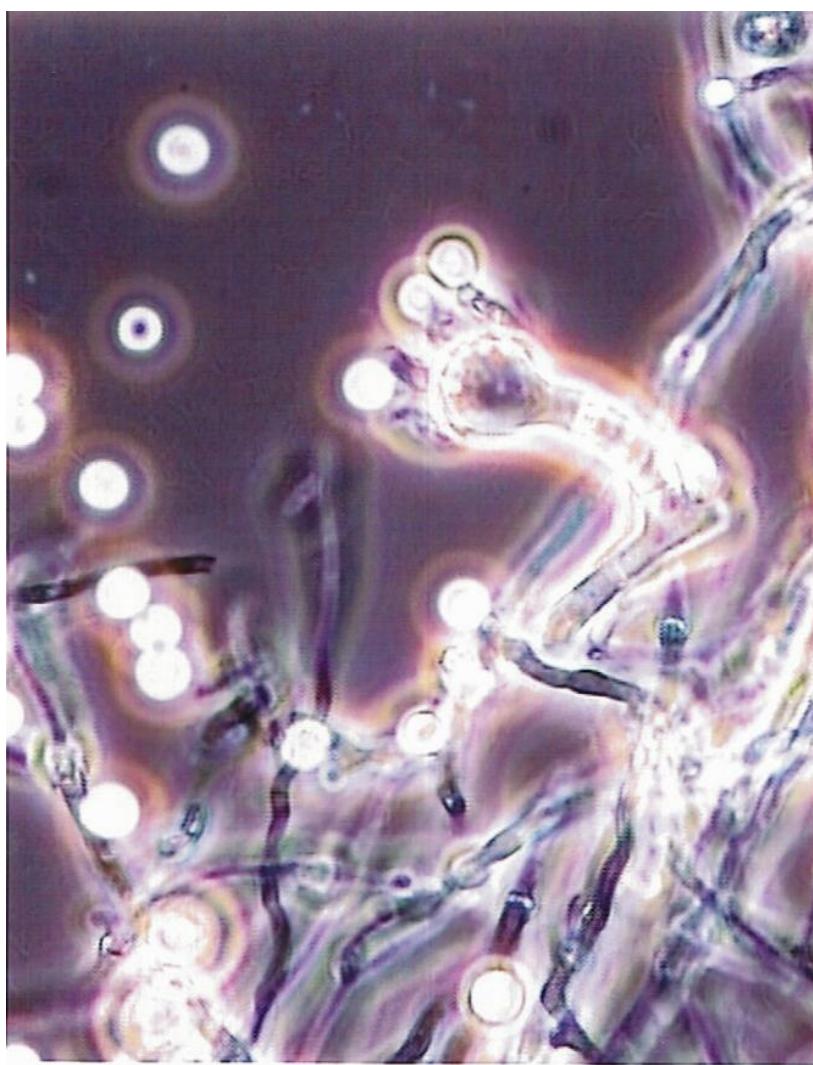
Preglednica 9: Morfologija micelija *A. terreus var. aureus* 223 168 h po indukciji.

Postopek indukcije	Serija	Morfologija
Temperaturni šok	1	svetlo rumeni, majhni peleti
	2	temno rumeni, srednje veliki peleti, vidna filamentozna rast
100 °C, 5 s	1	temno rumeni, majhni peleti, vidna filamentozna rast
	2	svetlo rumeni, majhni peleti, vidna filamentozna rast
Proteaza K (0,5 µg/ml, 10 min)	1	svetlo rumeni, majhni peleti
	2	temno rumeni, majhni peleti, vidna filamentozna rast
Kontrola	1	temno rumeni, srednje veliki peleti
	2	svetlo rumeni, majhni peleti, vidna filamentozna rast

HPLC analiza je pokazala rahlo povišano vrednost lovastatina pri vzorcih s temperaturnim šokom 100 °C v trajanju 5 s v primerjavi s kontrolo. Pri ostalih vzorcih smo izmerili nižjo relativno vsebnost lovastatina glede na kontrolo.

Preglednica 10: Relativna vsebnost lovastatina vzorcev pri 4. poskusu glede na kontrolo po HPLC analizi.

Postopek indukcije		Relativna vsebnost lovastatina v %
Temperaturni šok	50 °C, 5 min	87,2
	100 °C, 5 s	102,6
Proteaza K (0,5 µg/ml, 10 min)		84,6



Slika 15: Sev *A. terreus* var. *aureus* 223 168 h po indukciji s temperaturnim šokom 5 min na 50 °C, 1000x imerzijska povečava.

4.1.5 5. poskus (testiranje vzorcev s HPLC analizo)

V 5. poskusu smo pri sevu *A. terreus* var. *aureus* 223 inducirali kalitev spor s temperaturnim šokom (dvig temperature do 100 °C v trajanju 5 s). Ugotovili smo, da je prišlo do velikega odstopanja pri izmerjenem pH, PMV in sedimentaciji 24 h po indukciji

in inkubaciji v vegetativnem gojišču pri 3. seriji. HPLC analiza je po 120 h inkubacije v fermentativnem gojišču pokazala nižjo relativno vsebnost lovastatina glede na kontrolo.

Preglednica 11: pH, PMV in sedimentacija vzorcev pri 5. poskusu 24 h po indukciji.

Postopek indukcije	Serija	pH	PMV (%)	Sedimentacija (%)
Temperaturni šok (100 °C, 5 s)	1	6,03	13,0	100
	2	6,00	14,0	82
	3	5,29	6,0	24
Kontrola	1	5,96	18,0	100
	2	6,06	12,0	84
	3	6,33	3,0	5

Preglednica 12: Relativna vsebnost lovastatina vzorcev pri 5. poskusu glede na kontrolo po HPLC analizi.

Postopek indukcije	Relativna vsebnost lovastatina v %
Temperaturni šok (100 °C, 5 s)	74,8

4.1.6 6. poskus (testiranje vzorcev s HPLC analizo)

V 6. poskusu smo pri sevu *A. terreus var. aureus* 223 inducirali kalitev spor s temperaturnim šokom (dvig temperature do 100 °C v trajanju 5 s). Meritev pH, PMV in sedimentacije 19 h po indukciji in inkubaciji v vegetativnem gojišču je primerljiva s kontrolo. HPLC analiza je po 125 h inkubacije v fermentativnem gojišču pokazala enako relativno vsebnost lovastatina glede na kontrolo.

Preglednica 13: pH, PMV in sedimentacija vzorcev pri 6. poskusu 19 h po indukciji.

Postopek indukcije	Serija	pH	PMV (%)	Sedimentacija (%)
Temperaturni šok (100 °C, 5 s)	1	6,20	5,0	12
	2	6,22	5,5	12
	3	6,20	5,0	11
Kontrola	1	6,26	5,0	12
	2	6,20	5,5	13
	3	6,19	5,0	13

Preglednica 14: Relativna vsebnost lovastatina vzorcev pri 6. poskusu glede na kontrolo po HPLC analizi.

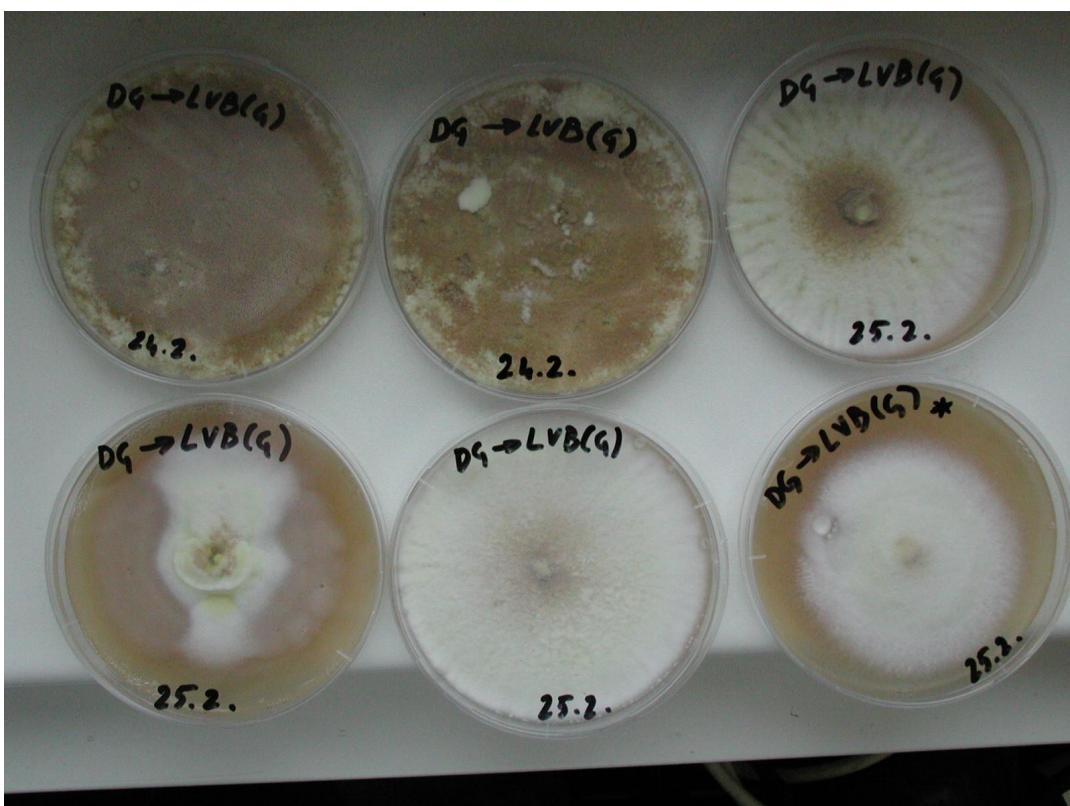
Postopek indukcije	Relativna vsebnost lovastatina v %
Temperaturni šok (100 °C, 5 s)	100,0

4.2 MUTIRANJE *A. terreus* var. *aureus* IN OCENA PRODUKCIJE LOVASTATINA

4.2.1 Mutiranje *A. terreus* var. *aureus* z UV žarki

4.2.1.1 Morfologija monospornih kolonij

Pri rasti monospornih kolonij *A. terreus* var. *aureus* 2886 na gojišču LVB z glukozo po UV mutagenezi smo opazili veliko morfološko raznolikost kolonij. Slika 16 prikazuje 6 tipičnih morfologij izbranih med 85 vzorci. Kolonije se med seboj razlikujejo po velikosti (3 cm - prerast), barvi (bela, rjava, rumenkasta), gostoti in enakomernosti rasti, velikosti kraterja (0-3 cm), barvi kraterja (bel, rjav, rumenkast) ter barvi reverza (rjav, rumen, svetlo oranžen).



Slika 16: Morfološka raznolikost monospornih kolonij *A. terreus* var. *aureus* 2886 po UV mutagenezi, selekciji z 2-deoksi-D-glukozo ter 14 dnevnih inkubacij na gojišču LVB z glukozo; vzorci 1, 7, 20, 21, 38 in 39 od leve proti desni in od zgornjih navzdol.

4.2.1.2 Analiza s TLC in biološko testiranje lovastatina z *N. crassa*

Izmed 85 vzorcev z oznakami od 1 do 85 smo s TLC izbrali vzorce: 3, 4, 17, 18, 20, 22, 39, 60, 65 in 77. Ti vzorci so pod UV lučjo (254 nm) kazali povečano intenziteto rumene barve (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).

18 h po inkubaciji v vegetativnem gojišču se je pH vzorcev gibal med 5,98 in 6,30, PMV pa med 10 % in 14 %. 120 h po inkubaciji v fermentativnem gojišču z glukozo se je pH vzorcev gibal med 5,20 in 5,35, v fermentativnem gojišču z laktozo pa med 5,62 in 5,98. Pri meritvi PMV smo ugotovili večja odstopanja med posameznimi vzorci. Pri gojišču z glukozo se je PMV gibal med 32 % in 56 %, pri gojišču z laktozo pa med 28 % in 70 %.

Preglednica 15: pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po inkubaciji v vegetativnem gojišču.

Oznaka vzorca	Inkubacija v vegetativnem gojišču (18 h)	
	ph	PMV (%)
3	6,30	10,0
4	6,07	12,5
17	6,01	12,0
18	6,05	12,5
20	6,21	11,0
22	6,05	12,5
39	6,01	14,0
60	6,01	11,0
65	6,00	13,0
77	5,98	11,0

Preglednica 16: pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po inkubaciji v fermentacijskem gojišču z glukozo in laktozo.

Oznaka vzorca	Inkubacija v fermentacijskem gojišču (120 h)			
	ph	Glukoza	Laktoza	PMV (%)
3	5,27	5,64	50,0	28,0
4	5,20	5,62	40,0	70,0
17	5,28	5,91	35,0	60,0
18	5,22	5,90	56,0	58,0
20	5,34	5,89	50,0	56,0
22	5,27	5,75	56,0	45,0
39	5,35	5,93	51,0	42,0
60	5,26	5,92	32,0	70,0
65	5,22	5,71	44,0	62,0
77	5,27	5,98	45,0	48,0

Pri biološkem testiranju z *N. crassa* smo ugotovili, da povprečna cona inhibicije pri nobenem vzorcu ni presegla kontrole. Cona inhibicije vzorcev, ki so rasli na laktozi je veliko večja kot pri vzorcih, ki so rasli na glukozi z izjemo vzorca 3, za katerega lahko sklepamo, da ima inhibirano biosintezo lovastatina.

Preglednica 17: Povprečen premer cone inhibicije pozitivnih TLC vzorcev po inkubaciji v fermentacijskem gojišču z glukozo in laktozo pri biološkem testiranju z *N. crassa* v primerjavi s kontrolnimi vzorci.

Oznaka vzorca	Povprečen premer cone inhibicije (mm)		
	Glukoza	Laktoza	Kontrola
3	6,7	0	17,6
4	3,7	13,5	14,9
17	3,1	14,5	17,0
18	1,9	15,1	17,1

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 17: Povprečen premer cone inhibicije pozitivnih TLC vzorcev po inkubaciji v fermentacijskem gojišču z glukozo in laktozo pri biološkem testiranju z *N. crassa* v primerjavi s kontrolnimi vzorci.

Oznaka vzorca	Povprečen premer cone inhibicije (mm)		
	Glukoza	Laktoza	Kontrola
20	4,0	17,0	17,7
22	0,8	16,0	16,2
39	2,2	15,5	18,0
60	11,3	16,4	16,7
65	8,8	14,7	17,0
77	8,2	16,1	16,4

4.2.1.3 HPLC analiza

HPLC analiza je po 120 h inkubacije v fermentativnem gojišču z laktozo pokazala povišano relativno vsebnost lovastatina glede na kontrolo pri vzorcu 39.

Preglednica 18: Relativna vsebnost lovastatina pri vzorcih 39 in 60 po inkubaciji v fermentacijskem gojišču z laktozo glede na standardno koncentracijo lovastatina (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).

Oznaka vzorca	Relativna vsebnost lovastatina v %
39	114,0
60	97,1

4.2.2 Mutiranje *A. terreus var. aureus* s kolhicinom

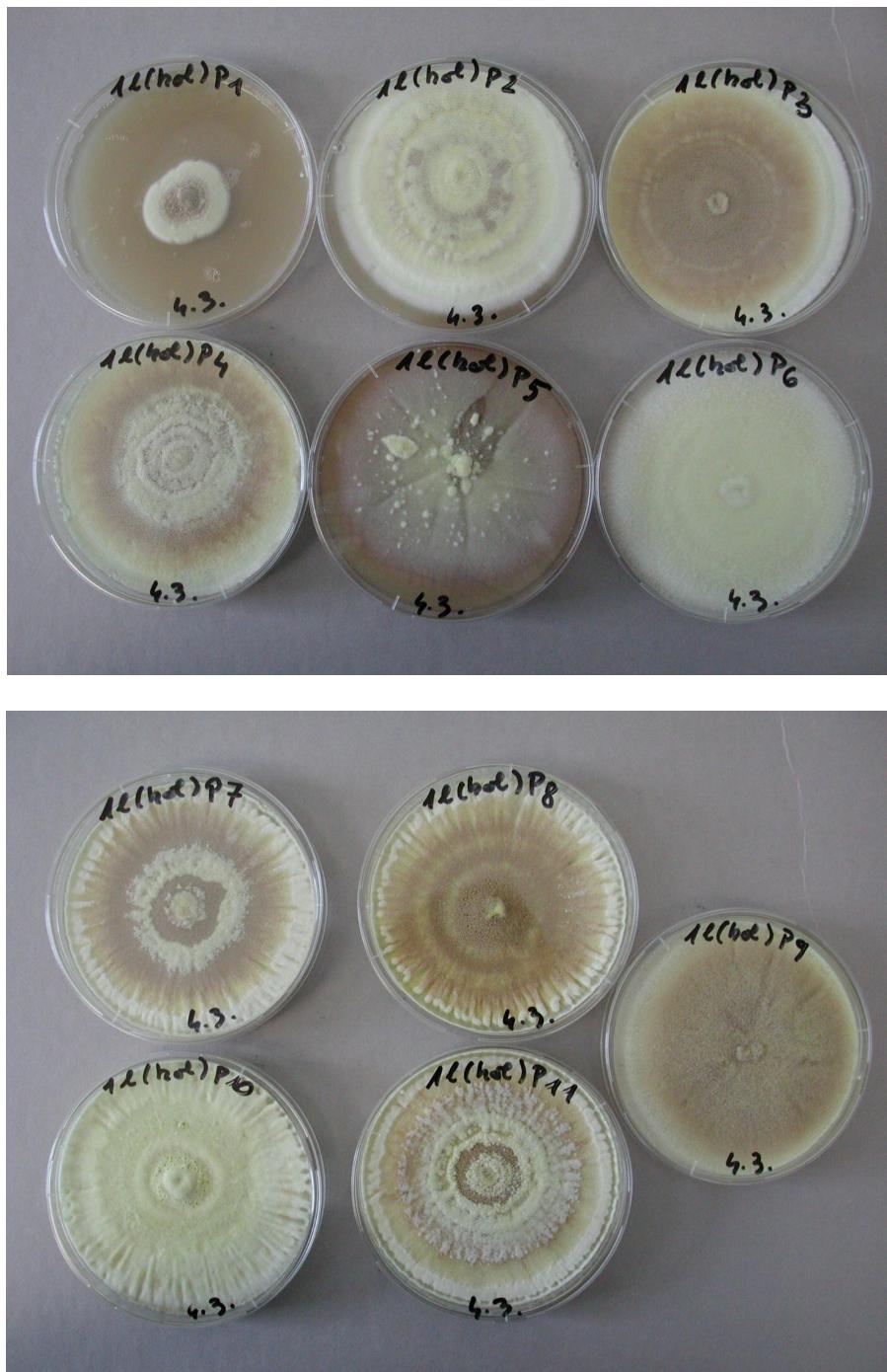
4.2.2.1 Morfologija kolonij

Slika 17 prikazuje rast *A. terreus var. aureus* 3073 po mutagenezi s kolhicinom ter selekciji z lastnim metabolitom na gojišču LVB z lovastatinom v končnih koncentracijah 0,5 g/l, 0,75 g/l, 1 g/l. Kolonije so bele barve in velikosti od 1 mm do 20 mm. Opazimo lahko, da z višanjem koncentracije lovastatina pada število kolonij ter njihova velikost.



Slika 17: Morfologija kolonij *A. terreus var. aureus* 3073 po mutagenezi s kolhicinom ter selekciji z lastnim metabolitom na gojiščih LVB z lovastatinom v končnih koncentracijah 0,5 g/l, 0,75 g/l, 1 g/l od leve proti desni (po 7 dnevni inkubaciji).

Slika 18 prikazuje 11 tipičnih morfologij monospornih kolonij *A. terreus var. aureus* 3073 izbranih med 102 vzorcema. Kolonije se med seboj razlikujejo po velikosti (3 cm - prerast), barvi (bela, rjava, rumenkasta, zelenkasta), gostoti in enakomernosti rasti, velikosti kraterja (0-3 cm), barvi kraterja (bel, rjav, rumenkast) ter barvi reverza (rjav, rumen, svetlo oranžen).



Slika 18: Morfološka raznolikost monospornih kolonij *A. terreus var. aureus* 3073 po mutagenezi s kolhicinom ter selekciji z lastnim metabolitom po 14 dnevni inkubaciji na gojišču LVB z lovastatinom v končni koncentraciji 1 g/l.

4.2.2.2 Analiza s TLC in HPLC

S TLC analizo smo izbrali 20 vzorcev s selekcijo na lovastatinu s koncentracijo 0,50 g/l, 10 vzorcev s koncentracijo 0,75 g/l, 8 vzorcev s koncentracijo 1,00 g/l, 2 vzorca s koncentracijo 1,20 g/l in 1,60 g/l ter 3 vzorce pri selekciji s koncentracijo lovastatina 1,40 g/l in 1,80 g/l. Izbrali smo tudi 3 vzorce s selekcijo na natrijevem kloroacetatu s koncentracijo 0,3 %. Ti vzorci so pod UV lučjo (254 nm) kazali povečano intenziteto rumene barve (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).

18 h po inkubaciji v vegetativnem gojišču se je pH vzorcev gibal med 5,65 in 6,33, PMV pa med 5 % in 24 %. Vzorcema P3 in T8, ki sta imela najvišji pH smo izmerili najnižji PMV. 120 h po inkubaciji v fermentativnem gojišču z laktozo se je pH vzorcev gibal med 5,65 in 6,52, PMV pa med 50 % in 74 %.

Preglednica 19: pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po selekciji na lovastatinu ter inkubaciji v vegetativnem in fermentacijskem gojišču.

Selekcija z lovastatinom s konc. (g/l)	Oznaka vzorca	Inkubacija v vegetativnem gojišču (18 h)		Inkubacija v fermentacijskem gojišču (120 h)	
		pH	PMV (%)	pH	PMV (%)
0,50	F1	5,91	18,0	5,68	67,0
	F2	5,72	22,0	5,68	68,0
	F3	5,85	18,0	5,73	68,0
	F4	5,99	17,0	6,44	50,0
	F5	5,66	24,0	5,74	69,0
	F6	5,65	20,0	5,85	64,0
	F7	5,89	19,0	6,21	63,0
	F8	5,91	16,0	6,31	66,0
	F9	6,05	12,0	5,78	65,0
	F10	5,89	17,0	6,14	74,0
	F11	5,98	18,0	6,42	70,0
	F12	5,99	17,0	6,23	65,0
	F13	6,15	16,0	5,98	66,0
	F14	5,98	21,0	6,22	69,0
	F15	6,00	15,0	6,11	71,0
	F16	5,88	19,0	6,32	71,0
	F17	5,79	18,0	5,87	61,0
	F18	5,95	16,0	6,01	66,0
	F19	5,87	20,0	5,96	63,0
	F20	5,78	21,0	6,35	62,0
0,75	C3	6,03	11,0	6,11	62,0
	C6	6,06	19,0	6,03	69,0
	C9	6,09	22,0	5,98	72,0
	C11	5,86	20,0	5,88	70,0
	C12	6,04	17,0	6,06	64,0
	C13	6,06	18,0	6,12	59,0
	C14	5,87	20,0	5,78	68,0
	C15	5,98	17,0	5,98	59,0
1,00	C16	5,99	19,0	6,15	61,0
	C17	5,90	20,0	6,00	66,0
	P2	5,87	21,0	5,75	70,0
	P3	6,33	5,0	6,02	69,0

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 19: pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po selekciji na lovastatinu ter inkubaciji v vegetativnem in fermentacijskem gojišču.

Selekcija z lovastatinom s konc. (g/l)	Oznaka vzorca	Inkubacija v vegetativnem gojišču (18 h)		Inkubacija v fermentacijskem gojišču (120 h)	
		pH	PMV (%)	pH	PMV (%)
1,20	P4	5,81	20,0	5,75	69,0
	P7	5,83	19,0	5,65	68,0
	P8	5,99	16,0	6,10	61,0
	P9	5,88	18,0	6,02	65,0
	P11	5,97	21,0	5,89	69,0
	P20	6,15	20,0	6,22	70,0
1,40	R5	5,83	20,0	6,11	64,0
	R16	5,79	19,0	6,51	60,0
	S3	5,88	19,0	6,32	68,0
1,60	S9	6,14	19,0	6,23	63,0
	S12	6,06	21,0	5,99	71,0
	T8	6,25	7,0	5,78	64,0
1,80	T9	5,84	18,0	6,43	60,0
	V1	5,92	17,0	6,52	65,0
	V12	5,90	19,0	6,32	66,0
	V14	5,86	20,0	5,97	70,0

Preglednica 20: pH in PMV pozitivnih TLC vzorcev po selekciji na natrijevem kloracetatu ter inkubaciji v vegetativnem in fermentacijskem gojišču.

Selekcija z natrijevim kloracetatom s konc. (%)	Oznaka vzorca	Inkubacija v vegetativnem gojišču (18 h)		Inkubacija v fermentacijskem gojišču (120 h)	
		pH	PMV (%)	pH	PMV (%)
0,30	A1	5,97	16,0	5,78	60,0
	A7	5,71	20,0	5,67	63,0
	A20	5,84	18,0	5,79	66,0

HPLC analiza je po 120 h inkubacije v fermentativnem gojišču z laktozo pokazala povišano relativno vsebnost lovastatina glede na kontrolo pri vzorcih R5, S3, T9 in V14.

Preglednica 21: Relativna vsebnost lovastatina pri vzorcih mutiranih s kolhicinom glede na standardno koncentracijo lovastatina (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).

Selekcija z lovastatinom s konc. (g/l)	Oznaka vzorca	Relativna vsebnost lovastatina v %
0,50	F1	80,4
	F2	78,2
	F3	60,4
	F4	49,4
	F5	68,3
	F6	64,8
	F7	27,0
	F8	68,8
	F9	77,9
	F10	68,5
	F11	34,0
	F12	13,7
	F13	71,1
	F14	53,6
	F15	64,6

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 21: Relativna vsebnost lovastatina pri vzorcih mutiranih s kolhicinom glede na standardno koncentracijo lovastatina (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).

Selekcija z lovastatinom s konc. (g/l)	Oznaka vzorca	Relativna vsebnost lovastatina v %
0,75	F16	62,0
	F17	63,8
	F18	68,0
	F19	74,6
	F20	28,9
	C3	62,0
	C6	40,1
	C9	34,7
	C11	79,9
	C12	51,3
1,00	C13	72,8
	C14	95,7
	C15	83,9
	C16	78,5
	C17	73,9
	P2	74,9
	P3	32,2
	P4	61,4
	P7	66,0
	P8	66,9
1,20	P9	87,1
	P11	55,2
	P20	62,8
	R5	105,0
	R16	95,6
	S3	104,7
	S9	68,6
	S12	90,4
	T8	78,9
	T9	105,6
1,40	V1	66,6
	V12	98,7
	V14	119,8

Preglednica 22: Relativna vsebnost lovastatina pri vzorcih mutiranih s kolhicinom glede na standardno koncentracijo lovastatina (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto).

Selekcija z natrijevim kloroacetatom s konc. (%)	Oznaka vzorca	Relativna vsebnost lovastatina v %
0,30	A1	92,4
	A7	76,2
	A20	61,1

4.2.2.3 Vpliv koncentracije natrijevega kloroacetata na rast *A. terreus var. aureus*

Rast *A. terreus var. aureus* 3073 na trdenem gojišču LVB z dodanim natrijevim kloroacetatom v končni koncentraciji 1,5 % je v celoti inhibirana. Povprečen premer kolonij po trideset dnevni inkubaciji z 1,2 % natrijevim kloroacetatom je 11 mm pri 1 % pa 28 mm. Pri nižjih koncentracijah kolonije prerastejo plošče.

Preglednica 23: Vpliv koncentracije natrijevega kloroacetata na rast *A. terreus var. aureus* 3073.

Koncentracija natrijevega kloroacetata (%)	Povprečen premer kolonij (mm)
0,3	prerast
0,7	prerast
1,0	28,0
1,2	11,0
1,5	ni rasti

4.2.3 Mutiranje *A. terreus var. aureus* s kolhicinom in benomilom

Na trdnih gojiščih PDA z benomilom v končnih koncentracijah 2 mg/l, 4 mg/l in 6 mg/l ni bilo opazne rasti.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Indukcija kalitve spor in njen učinek na produkcijo lovastatina

Z različnimi metodami obdelave spor *A. terreus var. aureus* smo poskušali izboljšati in pospešiti ter v čim večji meri sinhronizirati kalitev spor v predfermentorski fazi. Preverili smo tudi ali imajo nekatere od metod učinek na povečanje produkcije lovastatina. Opravili smo šest ločenih poskusov, kjer smo inducirali kalitev spor s temperaturnim šokom (pri 50 °C, 60 °C, 70 °C in 80 °C v trajanju 5 min ter pri 100 °C v trajanju 5 s in 10 s), s proteazo K v končnih koncentracijah 50 µg/ml, 5 µg/ml in 0,5 µg/ml v trajanju 10 min, z intenzivnim mešanjem na stresalniku pri 250 obr./min in temperaturi 30 °C v trajanju 12 h, s stokratnim pasiranjem skozi Potterjev homogenizator in s predinkubacijo v mešanici aminokislin (2 % kazein-hidrolizat).

Pri prvih treh poskusih smo spremljali rast micelija v tekočem gojišču MYA2 in količino nastale biomase. Ugotovili smo, da večina od obdelav spor ni prispevala k znatnemu izboljšanju kalitve in povečanju biomase v primerjavi s kontrolo. Povečano biomaso smo izmerili predvsem pri stresanju pri *A. terreus var. aureus* 352 v 1. poskusu in temperaturnem šoku v 2. poskusu (50 °C v trajanju 5 min in 100 °C v trajanju 5 s). V primerih obdelave spor s temperaturnim šokom pri 60 °C, 70 °C in 80 °C v trajanju 5 min ni prišlo do kalitve in nastanka biomase. Daljša izpostavitev temperaturam nad 60 °C je tako preprečila kalitev spor *A. terreus var. aureus* vsaj 24 h po indukciji.

Pri drugih treh poskusih smo vzorcem izmerili vsebnost lovastatina po inkubaciji v tekočem gojišču LVB. Rezultati so prikazani kot relativna vsebnost lovastatina glede na kontrolo, kjer smo za osnovo vzeli povprečje vseh serij vzorcev in kontrol. Prav tako smo analizirali pH, PMV in sedimentacijo po inkubaciji v vegetativnem gojišču.

Pri 4. poskusu smo 168 h po indukciji opazovali morfologijo micelija v fermentativnem gojišču. Med posameznimi serijami je prišlo do razlik v barvi (svetla do temno rumena), velikosti peletov ter obsegu peletne in filamentozne rasti. Prav tako je pri indukciji s temperaturnim šokom 100 °C v trajanju 5 s prišlo do večje razlike med obema serijama pri merjenju PMV. Predvidevamo, da je do take razlike v PMV prišlo zaradi izgube spor pri čiščenju (odstranjevanje supernatanta) s čimer sta imela inokulum vegetativnih gojišč različne koncentracije. Pri merjenju vsebnosti lovastatina smo ugotovili sledeče:

- Rahlo povišana vsebnost lovastatina pri indukciji s temperaturnim šokom 100 °C v trajanju 5 s v primerjavi s kontrolo, vendar zaradi razlik znotraj serij ta rezultat ni zanesljiv.
- Pri indukciji s temperaturnim šokom 50 °C v trajanju 5 min je količnik vsebnosti lovastatina 1. in 2. serije 0,7.
- Pri indukciji s temperaturnim šokom 100 °C v trajanju 5 s je količnik vsebnosti lovastatina 1. in 2. serije 0,9.
- Pri indukciji s proteazo K v končni koncentraciji 0,5 µg/ml je količnik vsebnosti lovastatina 1. in 2. serije 0,57.
- Pri kontroli je količnik vsebnosti lovastatina 1. in 2. serije 0,77.

Razlike v morfologiji in vsebnosti lovastatina znotraj serij so verjetno posledica nenatančnega inokuliranja fermentativnih gojišč. Vseeno lahko sklepamo, da obstaja korelacija med prisotnostjo filamentozne rasti in povišane vsebnosti lovastatina, kar so predpostavili tudi Casas Lopez in sod. (2005). Manj kompaktni peleti in bolj filamentozna rast naj bi bila boljša za produkcijo lovastatina v primerjavi z majhnimi in kompaktnimi peleti. V nasprotju s tem so Gupta in sod. (2007) trdili, da je optimalna morfologija v obliki srednje velikih peletov (premer od 1,8 do 2 mm), za biosintezo lovastatina pa naj bi bile odgovorne rastoče celice na zunanji površini peletov. Bizukojc in Ledakowicz (2010) sta testirala vpliv morfologije in diferenciacije hif na produkcijo lovastatina. Najboljši rezultat sta dosegla v sistemu z majhnimi peleti (premer pod 1,5 mm) in visoko koncentracijo biomase (nad 10 g/l v idiofazi). Pomemben vpliv na velikost peletov in rast biomase ima koncentracija spor inokuliranih v vegetativno gojišče. Pri koncentraciji spor $2,56 \times 10^{10} \text{ l}^{-1}$ so imeli peleti trikrat manjši premer kot pri inokulu $1,39 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$. Analiza diferenciacije hif v peletu je pokazala, da obstaja pozitivna korelacija med deležem aktivne zunanje cone in produkcijo lovastatina.

Tudi pri 5. poskusu meritve pH, PMV in sedimentacije v 3. seriji močno odstopajo. Vzrok za to je verjetno enak kot pri 4. poskusu. Zaradi slabe rasti vsebnosti lovastatina pri 3. seriji nismo merili. Rezultati vsebnosti lovastatina so pokazali za več kot 100 % razlike med 1. in 2. serijo. Tudi med tremi ponovitvami inokulacije iz vegetativnega v fermentativno gojišče pri obeh serijah je prišlo do več kot 100 % razlike v vsebnosti lovastatina. 5. poskus lahko označimo kot neuspešen in rezultate kot nezanesljive.

6. poskus je bil ponovitev 5. poskusa. Poskus je bil uspešen, saj so meritve pH, PMV in sedimentacije ter vsebnosti lovastatina pokazale majhna odstopanja med serijami in ponovitvami. Ugotovimo lahko, da indukcija s temperturnim šokom 100 °C v trajanju 5 s v primerjavi s kontrolo ni povzročila povišane produkcije lovastatina.

5.1.2 UV mutageneza in selekcija mutant

Z mutiranjem *A. terreus var. aureus* smo poskušali pri fermentaciji manjšega obsega pridobiti seve z boljšo produkcijo lovastatina. Uporabili smo metodo naključne mutageneze z UV žarčenjem. Iz fotografije je razvidna morfološka raznolikost monospornih kolonij po mutagenezi z UV (slika 16). Kolonije so se razlikovale po barvi (bela, zelena, rumena, rjava), velikosti, barvi reverza (oranžna, rumena, rjava) in kraterju (barva, oblika, velikost).

Po UV mutagenezi smo vzorce najprej inkubirali na trdnem gojišču MCD z dodano 2-deoksi-D-glukozo, ki v večini primerov zavira rast. Zrasle kolonije smo nato precepili na trdno gojišče LVB z glukozo. Z ustvarjanjem selekcijskega pritiska pri gojenju na 2-deoksi-D-glukozi lahko izoliramo mutante, ki so rezistentne na katabolno represijo z glukozo. Poleg zmožnosti rasti pri višjih koncentracijah glukoze, smo žeeli izolirati mutante z dereguliranim metabolizmom za produkcijo lovastatina. Katabolna represija pri rodu *Aspergillus* je regulirana s proteinom CreAp (Ruijter in Visser, 1997; Strauss in sod., 1999). Vezava CreAp na promotor strukturnih ali regulatornih genov, vključenih v metabolizem alternativnih virov ogljika, preprečuje njihovo izražanje v prisotnosti glukoze ali drugega represivnega vira ogljika. Skupina genov odgovornih za biosintezo lovastatina

vključuje 18 ORF (odprtih bralnih okvirjev) (Kennedy in sod., 1999), med katerimi 2 kodirata regulatorna proteina LovE in ORF13. Gena za LovE in ORF13 vsebujejo vezavni mesti za CreAp, ki verjetno inhibira biosintezo lovastatina v prisotnosti glukoze. Nerepresivni viri ogljika kot so laktoza, etanol in glicerol ne aktivirajo CreAp (Hajjaj in sod., 2001). Sklepali smo, da bi mutacija gena, ki kodira CreAp lahko povzročila izboljšano producijo lovastatina pri rasti na glukozi.

Od 85 monospornih kolonij, ki smo jih testirali s TLC jih je 10 kazalo povečano intenziteto rumene barve pod UV lučjo pri vrednosti Rf kot ga doseže standard. Pri teh izolatih smo pričakovali povečano producijo lovastatina, zato smo pri njih nadaljevali s submerzno kultivacijo. Kot medij za producijo lovastatina smo uporabili tekoče kompleksno gojišče (fermentacijsko gojišče), kjer sta bila glukoza ali laktoza vir ogljika, CSL (koruzni sirup), kvas protevit in sojina moka pa vir dušika. Izbor vira ogljika in dušika ima vlogo pri regulaciji genske ekspresije in encimske aktivnosti pri sintezi poliketidov.

Hajjaj in sod. (2000) so proučevali rast *A. terreus* in biosintezo lovastatina v odvisnosti od vira ogljika. Pri rasti na kompleksnem gojišču z glukozo (45 g/l), mlekom v prahu (24 g/l) in kvasnim ekstraktom (2,5 g/l) so ugotovili sledeče:

- Glukoza se je porabila po 45 h inkubacije, ko je nastala biomasa. Pri tem je bilo opaziti tudi nastanek etanola in padec pH iz 6,5 na 4,9. Ob koncu inkubacije je pH vrednost narasla na 6,9.
- Mleko v prahu, ki primarno služi kot vir dušika je bilo odgovorno za nastanek laktoze (11 g/l) na začetku kultivacije. Laktoza in etanol sta se začela porabljati, ko je bil vir glukoze izčrpan. Laktoza se je v celoti porabila po približno 120 h inkubacije.
- Sinteza lovastatina se je pričela po 45 h inkubacije, kar je lahko posledica zmanjšanega učinka katabolne represije ali pa omejenega vira ogljika.
- Pri zacetni koncentraciji glukoze 70 g/l se je producija lovastatina močno zmanjšala.

Pri rasti na laktozi (z začetno koncentracijo 53 g/l) namesto glukoze se je rast biomase ustavila po 50 h od začetka inkubacije. Glavna substrata za rast biomase sta bila mleko v prahu in kvasni ekstrakt. Laktoza se je počasi porabljala v času med 50 h in 200 h, nato pa se je njena koncentracija ustalila na 25 g/l. Producija lovastatina se je pričela po približno 200 h in je enakomerno naraščala do konca fermentacije po 250 h. Na osnovi teh ugotovitev so Hajjaj in sod. (2001) sklepali, da se biosinteza lovastatina prične le ob zelo omejeni asimilaciji vira ogljika oziroma, da je pomanjkanje laktoze ugodno za biosintezo lovastatina.

Bizukojc in Ledakowicz (2007) sta testirala vpliv laktoze in kvasnega ekstrakta na producijo lovastatina. Ugotovila sta, da je poraba laktoze nujna za njegovo biosintezo, ki se deloma začne že v fazi rasti in se nato nadaljuje v idiofazi. Pri nizkih začetnih koncentracijah (5 in 10 g/l) je laktoza omejujoči dejavnik sinteze lovastatina, saj se ta ustavi ob dokončni porabi laktoze. Pri povečanju začetne koncentracije iz 20 na 40 g/l pa znatnega izboljšanja producije lovastatina ni bilo več zaznati in laktoza je ostala neporabljena, kot so ugotovili že Hajjaj in sod. (2001). Kultivacija *A. terreus* z dohranjevanjem vira ogljika bi se lahko izkazala kot učinkovita metoda pri produciji lovastatina. Previsoka začetna koncentracija organskega vira dušika inhibira biosintezo lovastatina (Bizukojc in Ledakowicz, 2007).

Casas Lopez in sod. (2003) so proučevali vpliv omejevanja vira dušika na donos lovastatina. Rast je bila ustavljena zaradi pomanjkanja dušika, medtem ko vir ogljika ni bil omejen. Prebitek ogljika po dohranjevanju se je v večji meri usmeril v sekundarni metabolizem in produkcijo lovastatina. Pri našem poskusu je fermentacija potekala brez dohranjevanja pri začetni koncentraciji laktoze ali glukoze 60 g/l. CSL, kvas protектив in sojina moka so bili vir dušika v skupni začetni koncentraciji 15 g/l. Meritve pH po fermentaciji so se pri vzorcih z glukozo gibale med 5,20 in 5,35, pri vzorcih z laktozo pa med 5,62 in 5,98. Za produkcijo lovastatina pri *A. terreus* je optimalen pH 6,0, vsako večje odstopanje od te vrednosti pa privede do znatnega padca produkcije (Kamath in sod., 2015).

Pri vrednotenju vsebnosti lovastatina smo za vseh 10 vzorcev uporabili metodo biološkega testiranja z *N. crassa*, vzorca 39 in 60 z laktozo pa smo analizirali še s HPLC. HPLC analiza vzorca 39 z laktozo je pokazala 14 % večjo vsebnost lovastatina glede na standardno koncentracijo lovastatina (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto). Pri biološkem testiranju vzorec 39 ni kazal pričakovane povečane cone inhibicije v primerjavi s kontrolo. Povprečna cena inhibicije je bila za 13,9 % manjša kot pri kontroli. Ugotovimo lahko, da metoda biološkega testiranja ni dovolj natančna za selekcijo mutant z 10-20 % boljšo produkcijo lovastatina in jo lahko uporabimo zgolj za približno oceno. Cone inhibicije pri vseh vzorcih z glukozo so pokazale nizko produkcijo lovastatina, iz česar sklepamo, da nam ni uspelo pridobiti mutant rezistentnih na represijo z glukozo. Izolirali pa smo mutantno (vzorec 3), ki je imela pri rasti na laktozi v celoti inhibirano biositezo lovastatina, ne pa tudi pri rasti na glukozi. Vzorec 3 z laktozo je imel zelo nizko vrednost PMV in se je tudi morfološko razlikoval od ostalih, s tem da je imel bolj filamentozno obliko submerzne rasti.

5.1.3 Mutageneza s kolhicingom in benomilom ter selekcija mutant

Tudi po mutagenezi s kolhicingom smo lahko opazovali morfološko raznolikost monospornih kolonij *A. terreus var. aureus* (slika 18). Specifične morfološke značilnosti so lahko indikator za izboljšano produkcijo sekundarnega metabolita pri mutantih. Povečana pigmentacija in sporulacija ter bolj razvejan micelij pri mutiranemu sevu glive *Monascus pilosus* (*M. pilosus*) so povezani z izboljšano produkcijo lovastatina. *M. pilosus* proizvaja poliketidne rdeče pigmente, povečana sinteza poliketidov pa se odraža na barvi kolonij (Miyake in sod., 2006).

Pri obdelavi *A. terreus* s kolhicingom lahko pride do pojava avtopoliploidije, ob nadaljnji obdelavi z benomilom pa do delecie kromosomov v poliploidnem jedru preko kromosomske rekombinacije (Toyama in sod., 2002). Pri našem poskusu je bila mutageneza z benomilom neuspešna, saj na gojiščih z benomilom ni bilo opazne rasti. Posledično smo se osredotočili zgolj na mutagenezo s kolhicingom, ki lahko poleg poliploidije povzroča tudi klastoge spremembe kromosomov in genske mutacije.

Želeli smo izolirati mutante s pomnoženimi strukturnimi geni za biositezo lovastatina oziroma mutante z dereguliranim metabolizmom za produkcijo lovastatina. Za selekcijo mutant smo uporabili metodo gojenja na lastnem metabolitu pri koncentracijah od 0,5 do

1,8 g/l. Na sliki 17 je viden učinek koncentracije eksogenega lovastatina na rast kolonij, kjer višja koncentracija bolj inhibira rast. Med mutantami s sposobnostjo rasti pri visokih koncentracijah lastnega metabolita je večja verjetnost za izolacijo izboljšanih producentov lovastatina (Jia in sod., 2011), v skladu s čimer so bili tudi rezultati pri našem poskusu. HPLC analiza vzorcev je pokazala večjo vsebnost lovastatina glede na standardno koncentracijo (po internem vrednotenju Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto) pri 4 vzorcih. Najvišjo vsebnost smo izmerili pri vzorcu V14 po selekciji na lovastatinu pri koncentraciji 1,8 g/l.

Pri drugem načinu predselekcije smo kot selektivno sredstvo uporabili natrijev kloroacetat. Analogi acetata inhibirajo sintezo acetil CoA (Finkelstein in sod., 1994) in zavirajo rast. Kopiranje acetata znižuje pH in slabo vpliva na produkcijo sekundarnih metabolitov. Želeli smo izolirati mutante, ki acetat v večji meri vključijo v biosintezo lovastatina. Pri mutantah rezistentnih na natrijev kloroacetat imamo večjo verjetnost za selekcijo izboljšanih producentov lovastatina. Pri našem poskusu smo uporabili natrijev kloroacetat v končni koncentraciji 0,3 %, na katerem je zraslo veliko število različno velikih kolonij. Za pripravo monospornih kolonij smo večinoma izbirali največje kolonije. Nadaljnja selekcija s TLC in končna HPLC analiza nista odkrili izboljšanih producentov. Za optimizacijo postopka selekcije je bolje uporabiti najvišjo koncentracijo selektivnega sredstva, ki ne inhibira rasti v celoti. Naredili smo preizkus vpliva koncentracije natrijevega kloroacetata na rast *A. terreus var. aureus*. Ugotovili smo, da natrijev kloroacetat inhibira rast pri koncentraciji med 1,2 in 1,5 %.

5.2 SKLEPI

- Obdelava spor *A. terreus var. aureus* s temperaturnim šokom pri temperaturi nad 60 °C v trajanju 5 min je preprečila kalitev spor. Pri vzorcih, ki smo jih 7,5 h, 10 h in 12 h po indukciji pregledali pod mikroskopom, nismo opazili nabrekanja spor ali kličnih hif. Z merjenjem biomase 24 h po indukciji smo ugotovili, da pri teh vzorcih ni prišlo do rasti micelija.
- Ugotovili smo, da indukcija kalitve spor *A. terreus var. aureus* s temperaturnim šokom (pri 50 °C v trajanju 5 min ter pri 100 °C v trajanju 5 s) in s proteazo K v končni koncentraciji 0,5 µg/ml v trajanju 10 min ni izboljšala produkcije lovastatina.
- Po 144 h inkubacije *A. terreus var. aureus* v fermentacijskem gojišču smo pri vzorcih, kjer se je že pojavila filamentozna rast, izmerili večjo vsebnost lovastatina, kot pri vzorcih, kjer ni bilo filamentozne rasti.
- Z UV mutagenezo *A. terreus var. aureus* in selekcijo na glukoznem analogu smo izolirali mutant s 14 % boljšo produkcijo lovastatina v primerjavi s standardnim producentom.
- Z mutagenezo s kolhicinom in selekcijo mutant na eksogenem lovastatinu pri koncentracijah med 1,2 g/l in 1,8 g/l smo izolirali 4 mutante z do 20 % boljšo produkcijo lovastatina v primerjavi s standardnim producentom.
- Benomil v koncentraciji 2 mg/l v celoti inhibira rast *A. terreus var. aureus* na trdnem gojišču PDA.
- Priporočena selektivna koncentracija natrijevega kloroacetata za izolacijo izboljšanih producentov lovastatina po mutagenezi je 1,2 %.

6 POVZETEK

Nalaganje holesterola na notranjo stran žilne stene lahko sproži arteriosklerozo, ki lahko pripelje do zožitve žil in s tem do slabše prekrvitve ter oskrbe organov s kisikom in hranljivimi snovmi. Skoraj polovica vsega holesterola v telesu izhaja iz biosinteze *de novo*. Lovastatin je pomemben farmacevtski produkt, ki se v medicini uporablja kot zdravilo za zniževanje holesterola v krvi (statin). HMG-CoA reduktaze je ključni, hitrost omejujoči encim pri biosintezi holesterola. Statini se reverzibilno vežejo na HMG-CoA reduktazo in inhibirajo njeno delovanje.

A. terreus je nitasta gliva, ki pri submerzni rasti v idiofazi proizvaja lovastatin. Zelo pomemben dejavnik, ki poleg sestave gojišča in pogojev kultivacije, vpliva na nivo produkcije sekundarnih metabolitov, je kvaliteta producentskega organizma. Klasičen pristop z naključno mutagenezo je še vedno močno prisoten pri izboljšavi producentskih organizmov. Učinkovitost te metode je vezana na postopek selekcije po mutagenezi. Racionaliziran pristop s predselekcijo je ena od možnosti za optimizacijo celotnega procesa.

Kalitev spor pri *A. terreus* poteka neuskrajeno, ker se klične hife najprej pojavijo pri večjih sporah. Sinhronizacija kalitve spor je dejavnik, ki lahko pozitivno vpliva na produkcijo lovastatina. Z različnimi načini obdelave spor lahko aktiviramo razgradnjo hidrofobnega ovoja in s tem pospešimo in sinhroniziramo kalitev.

V prvem sklopu raziskav smo za indukcijo kalitve spor v predfermentorski fazi uporabili različne postopke: temperaturni šok, obdelava s proteolizni encimi, mehanska obdelava in inkubacija v mešanici aminokislin. Vzorce smo testirali z mikroskopiranjem, določanjem suhe biomase, določanjem pH, PMV in sedimentacije po inkubaciji v vegetativnem gojišču ter končno HPLC analizo. S testiranjem smo žeeli selezionirati postopek obdelave spor, s katerim bi povečali produkcijo lovastatina glede na kontrolni vzorec. Ugotovili smo rahlo povišano vsebnost lovastatina pri indukciji s temperaturnim šokom 100 °C v trajanju 5 s v primerjavi s kontrolo, vendar zaradi razlik znotraj serij ta rezultat ni zanesljiv.

V drugem sklopu raziskav smo žeeli z UV mutagenezo ter uporabo mutagenih substanc kolhicin in benomil pridobiti seve *A. terreus var. aureus* z lastnostmi, kot so: boljša proizvodnja lovastatina, deregulacija metabolizma in rezistenca na glukozni analog, lasten metabolit ter natrijev kloroacetat. Po UV mutagenezi smo s predselekcijo pri rasti na 2-deoksi-D-glukozi poizkušali izolirati mutante s pridobljeno rezistenco na represijo z glukozo. Za predselekcijo po mutagenezi s kolhicinom smo uporabili eksogeni lovastatin pri različnih koncentracijah ter natrijev kloroacetat. Za nadaljnjo selekcijo mutant smo uporabili TLC, biološko testiranje in HPLC. Pri mutagenezi z UV žarki ter kolhicinom smo uspeli pridobiti 5 mutant z izboljšano produkcijo lovastatina. Benomil v koncentraciji 2 mg/l je v celoti inhibiral rast *A. terreus var. aureus*.

7 VIRI

- Alberts A.W., Chen J., Kuron G., Hund V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A. 1980. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 7: 3957-3961
- Alberts A.W. 1990. Lovastatin and simvastatin - inhibitors of HMG-CoA reductase and cholesterol biosynthesis. *Cardiology*, 77, suppl. 4: 14-21
- Angell S., Schwartz E., Bibb M.J. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Molecular Microbiology*, 6: 2833-2844
- Arabatzis M., Velegaki A. 2013. Sexual reproduction in the opportunistic human pathogen *Aspergillus terreus*. *Mycologia*, 105, 1: 71-79
- Arni P., Hertner T. 1997. Chromosomal aberrations *in vitro* induced by aneugens. *Mutation Research*, 379: 83-93
- Arnold F.H. 1998. Design by directed evolution. *Accounts of Chemical Research*, 31: 125-131
- Arnold F.H. 2001. Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, 409: 253-257
- Askenazi M., Driggers E.M., Holtzman D.A., Norman T.C., Iverson S., Zimmer D.P., Boers M.-E., Blomquist P.R., Martinez E.J., Monrea A.W., Feibelman T.P., Mayorga M.E., Maxon M.E., Sykes K., Vittum Tobin J., Cordero E., Salama S.R., Trueheart J., Royer J.C., Madden K.T. 2003. Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. *Nature*, 21: 150-156
- Baker S.K. 2005. Molecular clues into the pathogenesis of statin-mediated muscle toxicity. *Muscle & Nerve*, 31, 5: 572-580
- Baltz R.H. 2001. Genetic methods and strategies for secondary metabolite yield improvement in actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79: 251-259
- Barbesgaard P., Heldt-Hansen H.P., Diderichsen B. 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 569-572
- Bates W.K., Wilson J.F. 1974. Ethylene glycol-induced alteration of conidial germination in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 117: 560-567
- Behal V., Neuzil J., Hostalek Z. 1983. Effect of tetracycline derivatives and some cations on the activity of anhydrotetracycline oxygenase. *Biotechnology Letters*, 5: 537-542

- Beppu T. 1995. Signal transduction and secondary metabolism: prospects for controlling productivity. *Trends in Biotechnology*, 132: 264-269
- Bhaduria V., Zhao W.-S., Wang L.-X., Zhang Y., Liu J.-H., Yang J., Kong L.-A., Peng Y.-L. 2007. Advances in fungal proteomics. *Microbiological Research*, 162, 3: 193-200
- Bianchi D.E., Turian G. 1967. Nuclear division in *Neurospora crassa* during conidiation and germination. *Experientia*, 23: 192-197
- Bibb M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 142: 1335-1344
- Bingle L.E.H., Simpson T.J., Lazarus C.M. 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genetics and Biology*, 26: 209-223
- Bizukojc M., Ledakowicz S. 2007. A macrokinetic modelling of the biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus*. *Journal of Biotechnology*, 130: 422-435
- Bizukojc M., Ledakowicz S. 2010. The morphological and physiological evolution of *Aspergillus terreus* mycelium in the submerged culture and its relation to the formation of secondary metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 41-54
- Bochar D.A., Stauffacher C.V., Rodwell V.W. 1999. Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3-methyl coenzyme A reductase. *Molecular Genetics and Metabolism*, 66: 122-127
- Boruta T., Bizukojc M. 2014. Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *Journal of Biotechnology*, 175: 53-62
- Braun S., Vecht-Lifshitz, S. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology*, 9: 63-68
- Campbell C.D., Vedera J.C. 2010. Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. *Biopolymers*, 93: 755-763
- Carell T., Epple R. 1998. Repair of UV light induced DNA lesions: a comparative study with model compounds. *European Journal of Organic Chemistry*, 7: 1245-1258
- Carlile M.J., Watkinson, S.C. 1994. *The Fungi*. London, Academic Press: 565 str.
- Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Acien Fernandez F.G., Molina Grima E., Chisti Y. 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 270-277

Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcela E.M., Chistib Y. 2005. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. Journal of Biotechnology, 116: 61-77

Chen C.W., Lin H.F., Kuo C.L., Tsai H.L., Tsai J.F.Y. 1988. Cloning and expression of a DNA sequence conferring cephamycin C production. Biotechnology Journal, 6: 1222-1224

Clingen P.H., Arlett C.F., Roza L., Mori T., Nikaido O., Green M.H.L. 1995. Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells. Cancer Research, 55: 2245-2248

Corsini A., Maggi F.M., Catapano, A.L. 1995. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. Pharmacological Research, 31: 9-27

Corsini A., Bellostia, S., Baetta, R., Fumagalli, R., Paoletti, R., Bernini, F. 1999. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. Pharmacology & Therapeutics, 84, 3: 413-428

Crameri R., Davies J.E. 1986. Increased production of aminoglycosides associated with amplified antibiotic resistance genes. Journal of Antibiotics. 39, 1: 128-135

Cundliffe E. 1989. How antibiotic-producing organism avoid suicide. Annual Review of Microbiology, 43: 207-233

Delic I., Robbins P., Westpheling J. 1992. Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89: 1885-1889

Demain A.L. 1971. Overproduction of microbial metabolites and enzymes due to alteration of regulation. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology, 1: 113-142

Demain A.L., Adrio J.L. 2008. Strain improvement for production of pharmaceuticals and other microbial metabolites by fermentation. Progress in Drug Research, 65: 252-289

D'Enfert C. 1997. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology, 21: 163-172

De Saizieu A., Certa U., Warrington J., Gray C., Keck W., Mous J. 1998. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. Nature Biotechnology, 16: 45-48

El-Enshasy H. A. 1998. Optimization of glucose oxidase production and excretion by recombinant *Aspergillus niger*. Dissertation. Braunschweig, Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Biochemical Engineering Department: 142 str.

Elmayergi H., Scharer, J.M., Moo-Young, M. 1973. Effect of polymer additives on fermentation parameters in a culture of *A. niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 15: 845-859

Endo A. 1979. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* sp. *Journal of Antibiotics*, 32: 852-854

Fiehen O. 2002. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48: 155-171

Finkelstein M., Huang C.-C., Byng G.S., Tsau B.-R., Leach J. 1994. Fungal negative microorganism capable of producing high levels of beta-carotene. United States Patent, US005328845A: 11 str.

Flannigan B., Samson R., Miller J.D. 2013. *Aspergillus terreus* Thom. A Colonies on MEA after one week; B detail of colony showing columnar conidial heads x 44 ; C conidial heads and tip x 920; D conidia x2330. Manchester, The Aspergillus Website: 1 str. <http://aspergillus.org.uk/content/aspergillus-terreus-thom-colonies-mea-after-one-week-b-detail-colony-showing-columnar> (junij 2016)

Friesen J.A., Rodwell V.W. 2004. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biology*, 5: e248, doi: 10.1186/gb-2004-5-11-248: 7 str.

Fujii I., Watanabe A., Mori Y., Ebizuka Y. 1998. Structures and functional analyses of fungal polyketide synthase genes. *Actinomycetologica*, 12: 1-14

Ghosh A., Chatterjee B., Das A. 1991. Production of glucoamylase by 2-deoxy-d-glucose resistant mutant of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology Letters*, 13: 515-520

Goldstein, J.L., Brown, M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430

Gorenc G. 2002. Presoja metode ocenjevanja produkcije lovastatina pri glivi *Aspergillus terreus var. aureus*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 54 str.

Gradivo: submerzna rast nitastih gliv. 2014. Ljubljana, Študentski.net: 42 str.
http://studentski.net/gradivo/ulj_fkt_ki2_bii_sno_submerzna_rast_nitastih_gliv_0_1?r=1 (maj 2016)

Griesbach R.J., Kamo K.K. 1996. The effect of induced polyplodiy on the flavonols of *Petunia »Mitchell«*. *Phytochemistry*, 42, 2: 361-363

Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A., Cimerman A. 1995. A hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor synthesized by yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 132: 39-43

Guo C.-J., Wang C.C.C. 2014. Recent advances in genome mining of secondary metabolites in *Aspergillus terreus*. Frontiers in Microbiology, 5: 717, doi: 10.3389/fmicb.2014.00717: 13 str.

Gupta R., Saxena R.K., Chaturvedi P., Virdi J.S. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential on fungal cell wall lysis. Journal of Applied Bacteriology, 78: 378-383

Gupta K., Mishra P.K., Srivastava P. 2007. A correlative evaluation of morphology and rheology of *Aspergillus terreus* during lovastatin fermentation. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 12: 140-146

Hajjaj H., Niederberger P., Duboc P. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Applied and Environmental Microbiology, 67, 6: 2596-2602

Hamelin B.A., Turgeon J. 1998. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Trends in Pharmacological Sciences, 19, 1: 26-37

Han M.-J., Kim N.-J., Lee S.Y., Chang H.N. 2010. Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. Current Genetics, 56, 4: 369-382

Hargreaves, I.P., Duncan, A.J., Heales, S.J., Land, J.M. 2005. The effect of HMG-CoA reductase inhibitors on coenzyme Q10: possible biochemical/clinical implications. Drug Safety, 28: 659-676

Haritakun R., Rachtaewee P., Chanthaket R., Boonyuen N., Isaka M. 2010. Butyrolactones from the fungus *Aspergillus terreus* BCC 4651. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 58, 11: 1545-1548

Hendrickson, L., Davis C.R., Roach C., Nguyen D.K., Aldrich T., McAda P.C., Reeves C.D. 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. Chemistry & Biology, 6: 429-439

Hermersdörfer H., Leuchtenberger A., Wardsack C., Ruttloff H. 1987. Influence of culture conditions on mycelial structure and poly-galacturonase synthesis of *Aspergillus niger*. Journal of Basic Microbiology, 27: 309-315

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: 2417-2430

Hoog G.S. de, Gene H., Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 1126 str.

- Hopwood D. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, 97: 2465-2497
- Hotop S., Möller J., Dullau T., Schügerl K. 1989. Influence of preculture conditions on the morphology of *Penicillium chrysogenum*. DECHEMA Biotechnology Conference 3: 597-601
- Houbraken J., Samson R.A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70: 1-51
- Ikeda H., Seno E.T., Bruton C.J., Chater K.F. 1984. Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Genetics and Genomics*, 196: 501-507
- Ikeda H., Omura S. 1995. Control of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* for the selective production of a useful component. *Journal of Antibiotics*, 48: 549-562
- Isogai T., Fukagawa M., Aramori I., Iwami M., Kojo H., Ono T., Ueda Y., Kohsaka M., Imanaka H. 1991. Construction of a 7-aminocephalosporanic acid (7ACA) biosynthetic operon and direct production of 7ACA in *Acremonium chrysogenum*. *Bio/Technology*, 9: 188-191
- Istvan E.S., Palnitkar M., Buchanan S.K., Deisenhofer J. 2000. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO Journal*, 19, 5: 819-830
- Istvan E.S. 2001. Bacterial and mammalian HMG-CoA reductases: related enzymes with distinct architectures. *Current Opinion in Structural Biology*, 11: 746-751
- Istvan E.S., Deisenhofer J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science Magazine*, 292, 5519: 1160-1164
- Istvan E.S. 2002. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase. *American Heart Journal*, 144, 6: 27-32
- Jia Z., Zhang X., Cao X., Liu J., Qin B. 2011. Production of lovastatin by self-resistant mutant of *Aspergillus terreus*. *Annals of Microbiology*, 61: 615-621
- Jimenez-Oses G., Osuna S., Gao X., Sawaya M.R., Gilson L., Collier S.J., Huisman G.W., Yeates T.O., Tang Y., Houk K.N. 2014. The role of distant mutations and allosteric regulation on LovD active site dynamics. *Nature Chemical Biology*, 10: 431-436
- Jekosch K., Kück U. 2000. Loss of glucose repression in an *Acremonium chrysogenum* β-lactam producer strain and its restoration by multiple copies of the cre1 gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 556-563

Kaempfer R.O., Magasanik B. 1967. Mechanism of β -galactosidase induction in *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology, 27: 475-494

Kamath P.V., Dwarakanath B.S., Chaudhary A., Janakiraman S. 2015. Optimization of culture conditions for maximal lovastatin production by *Aspergillus terreus* (KM017963) under solid state fermentation. HAYATI Journal of Biosciences, 22: 174-180

Karničar K., Drobna I., Petek M., Magdevska V., Horvat J., Vidmar R., Baebler Š., Rotter A., Jamnik P., Fujs Š., Turk B., Fonovič M., Gruden K., Kosec G., Petković H. 2016. Integrated omics approaches provide strategies for rapid erythromycin yield increase in *Saccharopolyspora erythraea*. Microbial Cell Factories, 15: 93, doi: 10.1186/s12934-016-0496-5: 17 str.

Keller N.P., Hohn T.M. 1997. Metabolite pathway gene clusters in filamentous fungi. Fungal Genetics and Biology, 21: 17-29

Keller N.P., Turner G., Bennett J.W. 2005 Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. Nature Reviews Microbiology, 3: 937-947

Kennedy J., Turner G. 1996. Delta-(L-alpha-amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase is a rate limiting enzyme for penicillin production in *Aspergillus nidulans*. Molecular Genetics and Genomics, 253: 189-197

Kennedy J., Auclair K., Kendrew S.G., Park C., Vedera J.C., Hutchinson C.R. 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. Science, 284: 1368-1372

Khaldi N., Seifuddin F.T., Turner G., Haft D., Nierman W.C., Wolfe K.H., Fedorova N.D. 2010. SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. Fungal Genetics and Biology: FG & B, 47, 9: 736-741

Khetan A. 1999. Metabolic engineering of antibiotic biosynthetic pathways. V: Manual of industrial microbiology and biotechnology. 2nd ed. Demain A.L., Davies J.E., Ronald M. (eds.). Washington, ASM Press: 717-724

Kim Y., Nandakumar M.P., Marten M.R. 2007. Proteomics of filamentous fungi. Trends in Biotechnology, 25, 9: 395-400

King M.W. 2016. Introduction to cholesterol metabolism. themedicalbiochemistrypage, LLC:12 str.
<http://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol.php> (junij 2016)

Korošec T., Ačimović J., Seliškar M., Kocjan D., Fon Tacer K., Rozman D., Urleb U. 2008. Novel cholesterol biosynthesis inhibitors targeting human lanosterol 14a-demethylase (CYP51). Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16: 209-221

- Kuchner O., Arnold F.H. 1997. Directed evolution of enzyme catalysis. Trends in Biotechnology, 15: 523-530
- Kumar Chaudhary A., Dhakal D., Sohng J.K. 2013. An insight into the “-omics” based engineering of *Streptomycetes* for secondary metabolite overproduction. BioMed Research International, 2013: 968518, doi: 10.1155/2013/968518: 15 str.
- Kumar M.S., Kumar P.M., Sarnaik H.M., Sadhukhan A.K. 2000. A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. Journal of Microbiological Methods, 40: 99-104
- Kumar M.S., Swapan K.J., Senthil V., Shashanka V., Kumar S.V., Sadhukhan A.K. 2000. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. Process Biochemistry, 36: 363-368
- 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: 2694-2698
- Lara F., Mateos R.C., Vázquez G., Sanchez S. 1982. Induction of penicillin biosynthesis by l-glutamate in *Penicillium chrysogenum*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 105: 172-178
- Leadlay P.F. 1997. Combinatorial approaches to polyketide biosynthesis. Current Opinion in Chemical Biology, 1: 162-168
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. 1993. Principles of biochemistry. 2nd ed. New York, Worth Publishers: 1013 str.
- Lee T., Yun S.H., Hodge K.T., Humber R.A., Krasnoff S.B., Turgeon G.B., Yoder O.C., Gibson D.M. 2001. Polyketide synthase genes in insect- and nematode-associated fungi, Applied Microbiology and Biotechnology, 56: 181-187
- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Mahadevan P.R., Tatum E.L. 1967. Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*. Journal of Cell Biology, 35: 295-302
- Mansouri K., Pissowotzki K., Distler J., Mayer G., Heinzel P., Braun C. 1989. Genetics of streptomycin production. V: Genetics and molecular biology of industrial microorganisms Hershberger C.L., Queener S.W., Hegeman G. (eds.). Washington, American Society of Microbiology: 61-67
- McCarroll N.E., Protzel A., Ioannou Y., Stack H.F., Jackson M.A., Waters M.D., Dearfield K.L. 2002. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. Mutation Research, 512: 1-35

- McHenney M.A., Baltz R.H. 1996. Gene transfer and transposition mutagenesis in *Streptomyces roseosporus*: mapping of insertions that influence daptomycin or pigment production. *Microbiology*, 142: 2363-2373
- McTaggart F. 2003. Comparative pharmacology of rosuvastatin. *Atherosclerosis Supplements*, 4, 1: 9-14
- Merrick M.J., Edwards R.A. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiological Review*, 59: 604-622
- Mirkes P.E. 1974. Polysomes, ribonucleic acid, and protein synthesis during germination of *Neurospora crassa* conidia. *Journal of Bacteriology*, 117: 196-202
- Mitard A., Riba, J.P. 1988. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnology and Bioengineering*, 32: 835-840
- Miyake T., Uchitomi K., Zhang M.-Y., Kono I., Nozaki N., Sammoto H., Inagaki K. 2006. Effects of the principal nutrients on lovastatin production by *Monascus pilosus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70, 5: 1154-1159
- Moghadasian, M.H. 1999. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sciences*, 65, 13: 1329-1337
- Mons S., Veretout F., Carlier M.-F., Erk I., Lepault J., Trudel E., Salesse C., Ducray P., Mioskowski C., Lebeau L. 2000. The interaction between lipid derivatives of colchicine and tubulin: consequences of the interaction of the alkaloid with lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1468: 381-395
- Moore R.N., Bigam G., Chan J.K., Hogg A.M., Nakashima T.T., Vederas J.C. 1985. Biosynthesis of the hypocholesterolemic agent mevinolin by *Aspergillus terreus*. Determination of the origin of carbon, hydrogen, and oxygen by ¹³C NMR and mass spectroscopy. *Journal of American Chemical Society*, 107: 3694-3701
- Moore B.S., Hopke J.N. 2001. Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *ChemBioChem*, 2: 35-38
- Nawarskas J.J. 2005. HMG-CoA reductase inhibitors and coenzyme Q10. *Cardiology in Review*, 13, 2: 76-79
- Nicholson T.P., Rudd B.A.M., Dawson M., Lazarus C.M., Simpson T.J., Cox R.J. 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chemistry & Biology*, 8: 157-178
- Nielsen J., Johansen C., Jacobsen M., Krabben P., Villadsen J. 1995. Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnology Progress*, 11: 93-98

- Nielsen J. 1996. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. Trends in Biotechnology, 14: 438-443
- Nielsen J. 2001. Metabolic engineering. Applied Microbiology and Biotechnology, 55: 263-283
- Nobeli I., Thornton J. M. 2006. A bioinformatician's view of the metabolome. Bioessays, 28: 534-545
- Nolan R. 1986. Automation system in strain improvement. V: Overproduction of microbial metabolites. Vanek Z., Hostalek Z. (eds.). London, Butterworth: 215-230
- Olsson A.G., Pears J., McKellar J., Mizan J., Raza A. 2001. Effect of rosuvastatin on low-density lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia. American Journal of Cardiology, 88: 504-508
- Otsuka T., Suyama Y., Yanagi U. 2014. Method for generating fungal spores using dry dispersion and ultrasonic device. Report of the Research Institute of Industrial Technology, Nihon University, 98: 1-9
- Overbeek R., Larsen N., Smith W., Maltzev N., Selkov E. 1997. Representation of function: the next step. Gene, 191: GC1-GC9
- Overbeek R., Fonstein M., D'Sousza M., Pusch G.D., Malstev N. 1999. The use of gene clusters to infer functional coupling. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96: 2896-2901
- Ozcengiz G., Alaeddinoglu N.G., Demain A.L. 1990. Regulation of biosynthesis of bacilysin by *Bacillus subtilis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 6: 91-100
- Parekh S. 2000. Strain improvement. V: Encyclopedia of microbiology. Vol. 4. 2nd ed. Lederberg J. (ed.). San Diego, Academic Press: 428-443
- Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 54: 287-301
- Pfefferkorn J.A., Song Y., Sun K.-L., Miller S.R., Trivedi B.K., Choi, C., Sorensen, R.J., Bratton, L.D., Unangst, P.C. 2007. Design and synthesis of hepatoselective, pyrrole-based HMG-CoA reductase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17, 16: 4538-4544
- 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 of Microbiology: 155-169

- Queener S., Sebeck K., Veznia C. 1978. Mutants blocked in antibiotic synthesis. Annual Review of Microbiology, 2: 593-636
- Randolph L.F., Hand D.B. 1940. Relation between carotenoid content and number of genes per cell in diploid and tetraploid corn. Journal of Agricultural Research, 60: 51-64
- Roche V.F. 2005. Antihyperlipidemic statins: a self-contained, clinically relevant medicinal chemistry lesson. American Journal of Pharmaceutical Education, 69, 4: 546-560
- Ruijter G.J., Visser J. 1997. Carbon repression in Aspergilli. FEMS Microbiology Letters, 151: 103-114
- Saito A., Fugii T., Yoneyama T., Miyashita K. 1998. The *glkA* is involved in glucose repression of chitinase production in *Streptomyces lividans*. Journal of Bacteriology, 180: 2911-2914
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. 2000. Introduction to food and airborne fungi. 6th ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 389 str.
- Sanchez S., Demain A.L. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. Enzyme and Microbial Technology, 31: 895-906
- Schmit J.S., Brody S. 1976. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. Bacteriological Reviews, 40, 1: 1-41
- Schügerl K., Wittler R., Lorenz T. 1983. The use of molds in pellet form. Trends in Biotechnology, 1: 120-123
- Segura D., Gonzalez R., Rodriguez R., Sandoval T., Escalante L., Sanchez S. 1996. Streptomyces mutants insensitive to glucose repression showed deregulation of primary and secondary metabolism. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 4: 30-36
- Selkov E. Jr., Grechkin Y., Mikhailova N., Selkov E. 1998. MPWW: the metabolic pathways database. Nucleic Acids Research, 26: 43-45
- Selkov E., Maltzev N., Olsen G.J., Overbeek R., Whitman W.B. 1997. A reconstruction of the metabolism of *Methanococcus jannaschii*. Gene, 197: GC11-GC26
- Seno E.T., Chater K.F. 1983. Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Journal of General Microbiology, 129: 1403-1413
- Servin-Gonzalez L., Jensen M.R., White J., Bibb M.J. 1994. Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). Microbiology, 140: 2555-2565

- Shapiro S. 1989. Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. V: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Shapiro S. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 135-211
- Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. Current Opinion in Chemical Biology, 7: 285-295
- Sinha R.P., Häder D.-P. 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. Photochemical & Photobiological Sciences, 1: 225-236
- Sirtori C.R. 2014. The pharmacology of statins. Pharmacological Research, 88: 3-11
- Skandalis A., Encell L.P., Loeb L.A. 1997. Creating novel enzymes by applied molecular evolution. Chemistry & Biology, 4: 889-898
- Skatrud P.L. 1992. Genetic engineering of 6-lactam antibiotic biosynthetic pathways in filamentous fungi. Trends in Biotechnology, 10: 324-329
- Smith D.J., Burnham M.K., Edwards J., Earl A.J., Turner G. 1990. Cloning and heterologous expression of the penicillin biosynthetic gene cluster from *Penicillium chrysogenum*. Biotechnology, 8, 1: 39-41
- Smith J.J., Lilly M.D., Fox R.I. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicilin production of *Penicillium chrysogenum*. Biotechnology and Bioengineering, 35: 1011-1023
- Stanbury P.F., Whitaker A., Hall S.J. 1995. Principles of fermentation technology. 2nd ed. Oxford, Pergamon Press: 357 str.
- Stephanopoulos G. 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. Metabolic Engineering, 1: 1-11
- Stramondo J.G., Avgerinos G.C., Costa J.M., Colton C.K., Wang D.I.C. 1981. Enzymatic synthesis of the antibiotic gramicidin S: kinetics of inhibition and enzyme destabilization. V: Advances in biotechnology: Fermentation products. Vol. 3. Vezina C., Singh K. (eds.). Ontario, Pergamon Press Canada: 101-106
- Strauss J., Horvath H.K., Abdallah B.M., Kindermann J., Mach R.L., Kubicek C.P. 1999. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. Molecular Microbiology, 32: 169-178
- Strohl W.R. 2001. Biochemical engineering of natural product biosynthesis pathways. Metabolic Engineering, 3: 4-14
- Tao H., Bausch C., Richmond C., Blattner F.R., Conway T. 1999. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. Journal of Bacteriology, 181: 6425-6440

- Tinwell H., Ashby J. 1991. Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone-marrow micronucleus assay. *Mutagenesis*, 6: 193-198
- Tobert J.A. 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-COA reductase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 7: 517-526
- Töpfer N., Kleessen S., Nikoloski Z. 2015. Integration of metabolomics data into metabolic networks. *Frontiers in Plant Science*, 6: 49, doi: 10.3389/fpls.2015.00049: 13 str.
- Toyama H., Yamagishi N., Toyama N. 2002. Construction of cellulase hyper-producers of *Trichoderma reesei* Rut C-30 for utilization of waste paper using colchicine and benomyl. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17: 175-178
- Turner G. 2010. Genomics and secondary metabolism in *Aspergillus*. V: *Aspergillus: molecular biology and genomics*. Machida M., Gomi K. (eds.). Poole, Caister Academic Press: 139-157
- Van Suijdam J.C., Kassen N.W.F., Paul P.G. 1980. An inoculum technique for the production of fungal pellets. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 10: 211-221
- Van Suijdam J.C., Metz, B. 1981. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 111-148
- Vinci V., Byng G. 1998. Strain improvement by non-recombinant methods. V: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. Demain A.L., Davies J.E. (eds.). Washington, American Society of Microbiology: 103-113
- Vezić C., Bolduc C., Kudelski A., Audet P. 1979. Biosynthesis of kitasamycin (leucomycin) by leucine analog-resistant mutants of *Streptomyces kitasatoensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15, 5: 738-746
- Walter S., Schrempf H. 1996. The synthesis of the *Streptomyces reticuli* cellulase (avicelase) is regulated by both activation and repression mechanisms. *Molecular Genetics and Genomics*, 251: 186-195
- Wang Y., Zheng J., Liu P., Wang W., Zhu W. 2011. Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium. *Marine Drugs*, 9, 8: 1368-1378
- Watanabe A., Ebizuka Y. 2002. A novel hexaketide naphthalene synthesized by a chimeric polyketide synthase composed of fungal pentaketide and heptaketide synthases. *Tetrahedron Letters*, 43: 843-846
- Watson J.D., Caudy A.A., Myers R.M., Witkowski J.A, 2007. Recombinant DNA: genes and genomes - a short course. 3rd ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press: 474 str.

- White, C.M. 2002. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42, 9: 963-970
- Wittler R., Baumgartl H., Lübbbers D.W., Schügerl K. 1986. Investigation of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnology and Bioengineering*, 28: 1024-1036
- Yang S.-S., Wang J.-Y. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40: 259-265
- Yoon J.H., Lee C.S., O'Connor T.R., Yasui A., Pfeifer G.P. 2000. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *Journal of Molecular Biology*, 299: 681-693
- Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Študentska založba: 92 str.
- Zhao H., Chockalingam K., Chen Z. 2002. Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 104-110
- Zhou B.-B. S., Elledge S.J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408: 433-439
- Zhou Z., Gu J., Du Y.-L., Li Y.-Q., Wang Y. 2011. The -omics era- toward a systems-level understanding of *Streptomyces*. *Current Genomics*, 12: 404-416

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Alešu Gaspariču in sodelavcem Službe za biotehnološki razvoj sektorja Biokemije Krke d.d., Novo mesto za vodenje, nasvete in pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za mentorstvo, strokovne nasvete in kritike pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se prof. dr. Darji Žgur-Bertok za pregled in recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se Darkotu in Urši za pregled in lekturo diplomske naloge.