

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nejc PETROVIČ

**VLOGA PROLINA PRI PIGMENTACIJI BAKTERIJE**  
*Vibrio ruber* DSM 14379

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nejc PETROVIČ

**VLOGA PROLINA PRI PIGMENTACIJI BAKTERIJE *Vibrio ruber*  
DSM 14379**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE ROLE OF PROLINE IN *Vibrio ruber* DSM 14379  
PIGMENTATION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek medoddelčnega univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 26. 1. 2016 za mentorja imenovala prof. dr. Davida Stoparja, somentorico doc. dr. Tjašo Danevčič in recenzenta doc. dr. Mateja Butalo.

Mentor: prof. dr. David Stopar  
Somentorica: doc. dr. Tjaša Danevčič  
Recenzent: doc. dr. Matej Butala

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. David STOPAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Tjaša DANEVČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Matej BUTALA  
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.

Nejc Petrovič

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)**

|           |   |
|-----------|---|
| <b>ŠD</b> | Dn  |
| <b>DK</b> | UDK 579.22+579.26:582.231:579.843:547.97(043)=163.6   |
| <b>KG</b> | ekologija mikroorganizmov/pigmenti/ <i>Vibrio</i> sp. / <i>Vibrio ruber</i> DSM 14379/sekundarni metaboliti/barvila /naravna barvila/pigmenti/prodiginini/prodigiozin /okoljski dejavniki/vpliv slanosti/prolin   |
| <b>AV</b> | PETROVIČ, Nejc  |
| <b>SA</b> | STOPAR, David (mentor)/ DANEVČIČ, Tjaša (somentorica)/ BUTALA, Matej (recenzent)  |
| <b>KZ</b> | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101   |
| <b>ZA</b> | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije   |
| <b>LI</b> | 2016  |
| <b>IN</b> | VLOGA PROLINA PRI PIGMENTACIJI BAKTERIJE <i>Vibrio ruber</i> DSM 14379  |
| <b>TD</b> | Diplomsko delo (univerzitetni študij)   |
| <b>OP</b> | IX, 36 str., 6 sl., 84 vir.   |
| <b>IJ</b> | Sl  |
| <b>JI</b> | sl/en   |
| <b>AI</b> | Rdeč pigment prodigiozin, ki ga proizvaja bakterijski sev <i>Vibrio ruber</i> DSM 14379, je znan sekundarni metabolit, ki predstavlja metabolni ponor za NADPH ali prolin. V diplomskem delu smo merili količino pigmenta v celicah pri različnih, za rast ugodnih ali neugodnih razmerah. Vzporedno smo spremljali tudi prirast biomase ter količino znotrajceličnega prolina, normiranega na celično maso. Rezultati kažejo, da se količina prodigiozina poveča z dodatkom prolina v gojišče, tako pri nizkih kot visokih koncentracijah NaCl. Pričakovano je dodatek prolina v gojišče najbolj vplival na akumulacijo prolina v celicah pri najvišjih slanostih, medtem ko je bil učinek dodanega prolina pri optimalni ali nizki slanosti primerljiv in je v obeh primerih povečal znotrajcelično akumulacijo prolina. Več dodanega prolina v gojišče pri nižjih slanostih je pozitivno vplivalo na prirast biomase. Z večanjem koncentracije soli v gojišču je bil učinek dodatka prolina progresivno manjši. Pri najvišji uporabljeni slanosti signifikantnega vpliva dodatka prolina na prirast biomase nismo več zaznali. |

**KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)**

- DN** Dn
- DC** UDC 579.22+579.26:582.231:579.843:547.97(043)=163.6
- CX** ecology of microorganisms/*Vibrio* sp./*Vibrio ruber* DSM 14379/secondary metabolites/colorants/pigments/biological pigments/prodiginines/prodigiosin/ environmental factors / effect of salinity/proline
- AU** PETROVIČ, Nejc
- AA** STOPAR, David (supervisor)/ DANEVČIČ, Tjaša (co-advisor)/ BUTALA, Matej (reviewer)
- PP** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY** 2016
- TI** ROLE OF PROLINE IN *Vibrio ruber* DSM 14379 PIGMENTATION
- DT** Graduation thesis (University studies)
- NO** IX, 36 p., 6 fig., 84 ref.
- LA** sl
- AL** sl/en
- AB** The red pigment prodigiosin, produced by the bacterial strain *Vibrio ruber* DSM 14379, is a known secondary metabolite, which represents a metabolic sink for NADPH and proline. In this thesis, the amount of the pigment in the bacterial cells under various, favorable and unfavorable growth conditions was measured. In addition, we determined the biomass production, and the amount of intracellular proline, normalized to the cell mass. The results indicate that the amount of prodigiosin increases with the addition of proline to the growth medium, both at high and low salt concentrations. The addition of proline to the medium increased the accumulation of proline in the cells at the highest salinity, and to a lesser extent at optimal and low salinity. A higher amount of the added proline at lower salinity had a positive effect on the biomass production. By increasing salt concentration in the medium, the effect of added proline on biomass production was progressively smaller. At the maximum salinity, the effect of the added proline on biomass production was not significant.

**KAZALO VSEBINE**

|  |             |
|--|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>  | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>  | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE.....</b>   | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO SLIK.....</b>  | <b>VII</b>  |
| <b>KAZALO PRILOG.....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>1 UVOD .....</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 CILJI IN OPREDELITEV PROBLEMA.....   | 1           |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....  | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>   | <b>3</b>    |
| 2.1 SEKUNDARNI METABOLITI .....  | 3           |
| 2.2 PIGMENTI .....   | 4           |
| 2.3 SEKUNDARNI METABOLITI PRI BAKTERIJAH IZ RODU <i>Vibrio</i> .....   | 5           |
| 2.4 PRODIGININI.....   | 6           |
| 2.5 PRODIGIOZIN.....   | 7           |
| <b>2.5.1 Toksičnost prodigiozina.....</b>  | <b>8</b>    |
| <b>2.5.2 Ekofiziološke funkcije.....</b>   | <b>8</b>    |
| 2.5.2.1 Razpršitev bakterij.....   | 8           |
| 2.5.2.2 »Metabolni odtok« nikotinamid dinukleotid fosfata (NADPH) ali prolina iz centralnega metabolizma ..... | 9           |
| 2.5.2.3 Zaščita pred UV-sevanjem .....   | 9           |
| 2.5.2.4 Pretok energije in anionska izmenjava.....   | 9           |
| 2.6 BIOSINTEZA PRODIGIOZINA .....  | 10          |
| <b>2.6.1 Vpliv dekanikov okolja na sintezo prodigiozina .....</b>  | <b>11</b>   |
| 2.6.1.1 Slanost .....  | 11          |
| 2.6.1.2 Temperatura.....   | 11          |
| 2.6.1.3 Hranila .....  | 12          |
| 2.6.1.4 Dodatek aminokislin.....   | 12          |
| 2.6.1.5 Aktivnost respiracije.....   | 12          |
| <b>2.6.2 Uporaba prodigiozina .....</b>  | <b>13</b>   |
| 2.7 VLOGA PROLINA .....  | 13          |
| <b>3 MATERIAL IN METODE.....</b>   | <b>16</b>   |
| 3.1 MATERIALI .....  | 16          |
| 3.2 GOJIŠČA .....  | 16          |

|                |   |           |
|----------------|---|-----------|
| 3.3            | GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE .....   | 17        |
| 3.4            | DOLOČANJE KOLIČINE PROLINA V BAKTERIJSKI CELICI.....  | 17        |
| 3.5            | DOLOČANJE KONCENTRACIJE PIGMENTA V BAKTERIJSKI CELICI.....  | 18        |
| 3.6            | DOLOČANJE SUHE CELIČNE BIOMASE .....  | 18        |
| 3.7            | DOLOČANJE VPLIVA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ PROLINA NA<br>PIGMENTACIJO BAKTERIJE <i>Vibrio ruber</i> DSM 14379.....             | 18        |
| 3.8            | DOLOČANJE VPLIVA PROLINA NA PIGMENTACIJO BAKTERIJE <i>Vibrio<br/>ruber</i> DSM 14379 PRI RAZLIČNIH SLANOSTIH V GOJIŠČU..... | 19        |
| <b>4</b>       | <b>REZULTATI.....</b>   | <b>20</b> |
| <b>5</b>       | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>  | <b>24</b> |
| 5.1            | RAZPRAVA .....  | 24        |
| 5.2            | SKLEPI.....   | 26        |
| <b>6</b>       | <b>POVZETEK.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>7</b>       | <b>VIRI .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>ZAHVALA</b> |   |           |
| <b>PRILOGE</b> |   |           |

**KAZALO SLIK**

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Slika 1: | Pot sinteze delnih produktov 3-metil-3-n-amil-pirola (MAP) in 4-metoksi-2,2'-bipirrol-5-karbaldehida(MBC) (Williamson in sod., 2006).... | 11 |
| Slika 2: | Strukturni formuli prodigiozina in prolina (Scott in sod., 1976).....  | 14 |
| Slika 3: | Količina prolina in rdečega pigmenta prodigiozina, ki je nastala v bakterijskih celicah kulture <i>Vibrio ruber</i> DSM 14379.....       | 20 |
| Slika 4: | Količine sintetiziranega pigmenta v bakterijskih celicah <i>Vibrio ruber</i> DSM 14379.....  | 21 |
| Slika 5: | Skladiščenje prolina v celicah <i>Vibrio ruber</i> DSM 14379.....  | 22 |
| Slika 6: | Vpliv različnih koncentracij prolina v gojišču PKS na prirast biomase pri bakteriji <i>Vibrio ruber</i> DSM 14379.....                   | 23 |



**KAZALO PRILOG**

- Priloga A1: Vpliv različnih koncentracij prolina v gojišču PKS na koncentracijo prolina v celicah *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 0,5 % (w/V) NaCl
- Priloga A2: Vpliv različnih koncentracij prolina v gojišču PKS na koncentracijo prolina v celicah *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 3 % (w/V) NaCl
- Priloga A3: Vpliv različnih koncentracij prolina v gojišču PKS na koncentracijo prolina v celicah *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 10 % (w/V) NaCl
- Priloga B1: Vpliv različnih koncentracij prolina na količino rdečega pigmenta prodigiozina v bakterijskih celicah *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 0,5 % NaCl (w/V)
- Priloga B2: Vpliv različnih koncentracij prolina na količino rdečega pigmenta prodigiozina v bakterijskih celicah *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 3 % NaCl (w/V)
- Priloga B3: Vpliv različnih koncentracij prolina na količino rdečega pigmenta prodigiozina v bakterijskih celicah *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 10 % NaCl (w/V)
- Priloga C1: Vpliv različnih koncentracij prolina v gojišču PKS na prirast biomase *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 0,5 % (w/V) NaCl
- Priloga C2: Vpliv različnih koncentracij prolina v gojišču PKS na prirast biomase *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 3 % (w/V) NaCl
- Priloga C3: Vpliv različnih koncentracij prolina v gojišču PKS na prirast biomase *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 6,5 % (w/V) NaCl
- Priloga C4: Vpliv različnih koncentracij prolina v gojišču PKS na prirast biomase *Vibrio ruber* DSM 14379 pri 10 % (w/V) NaCl

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

|                   |  |
|-------------------|--|
| ACV               | L- $\delta$ -( $\alpha$ -aminoadipoil)-L-cisteinil-D-valin                 |
| ATP               | adenozin trifosfat   |
| CTAB              | N-cetil-N,N,N-trimetilamonijev bromid                                      |
| DSM               | Nemška zbirka mikroorganizmov (nem. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) |
| HSL               | homoserin lakton   |
| MAP               | 3-metil-3-n-amil-pirol   |
| MBC               | 4-metoksi-2,2'-bipirol-5-karbaldehid                                       |
| M <sub>w</sub>    | molekulska masa  |
| NADPH             | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat                                      |
| OD <sub>650</sub> | optična gostota pri 650 nanometrih   |
| PCP               | peptidil prenašalni protein (ang. peptidyl carrying protein)               |
| PKS               | uepton kvasni ekstrakt sol   |
| w/V %             | utežno – volumski odstotki   |
| RNA               | ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)                             |
| tRNA              | prenašalna RNA (ang. transfer RNA)   |

## 1 UVOD

Stalno spreminjajoče se okolje v morskih ekosistemih zahteva nenehno koordinacijo metabolnih procesov bakterij, ki poseljujejo to ekološko nišo. Nihanje fizikalnih in kemijskih dejavnikov, kot so pH, temperatura, hranila, nasičenost s kisikom in slanost ter z njo povezani osmotski pritisk, predstavljajo za tu živeče vrste stresne razmere, s katerimi se morajo pogosto soočati (Madigan in Martinko, 2006). Kako hitro in učinkovito se je neka mikrobna vrsta sposobna odzvati na te spremembe, v veliki meri odloča o uspešnosti poselitve specifične ekološke niše. V okoljih, kjer se mikroorganizmi znajdejo pod hudimi selekcijskimi pritiski, lahko sekundarni metaboliti odločilno vplivajo na njihovo preživetje. Te molekule dajejo bakterijam zaradi svojih bioloških in ekofizioloških učinkov kompeticijsko prednost pred ostalimi vrstami pri poseljevanju ekološke niše.

### 1.1 CILJI IN OPREDELITEV PROBLEMA

Prodigiozin, ki je tipičen produkt sekundarnega metabolizma, tvorijo mnoge, v morskih okoljih živeče bakterije. Bakterija *Vibrio ruber* DSM 14379 je zaradi svojih fenotipskih lastnosti izredno primeren modelni organizem za proučevanje ekofizioloških lastnosti pigmentov. Rdeč pigment, ki ga ta bakterijski sev v določenih fizioloških pogojih tvori tudi v zelo velikih koncentracijah, ima številne zanimive biološke učinke, ki imajo uporabno vrednost v medicini, farmaciji in biotehnologiji. Ker ima večina sekundarnih metabolitov kompleksno molekulsko zgradbo, jih je s kemijsko sintezo težko pridobiti. Zaradi tega je izolacija teh spojin iz mikroorganizmov ugodnejša. Z optimiziranimi gojitvenimi tehnikami namreč lahko zagotovimo dovolj velike količine teh spojin za komercialno uporabo. Zaradi tega je pomembno zagotoviti optimalne pogoje za rast kulture v laboratoriju in opredeliti fizikalne in kemijske dejavnike, ki vplivajo na biosintezo nekega sekundarnega produkta, saj lahko s tem dosežemo bistveno višje donose željenih metabolitov (Venil in sod., 2013).

Slanost pomembno vpliva na sestavo celičnih struktur (membranski lipidi, proteini), centralni metabolizem celice in sintezo sekundarnih metabolitov pri bakteriji *V. ruber* DSM 14379 (Danevčič in sod., 2005; Starič in sod., 2010; Danevčič in Stopar, 2011). Za aminokislino prolin je znano, da določenim bakterijskim vrstam (npr. *Serratia marcescens*, *Streptomyces coelicolor*, *Hahella chejuensis*) služi kot prekurzor za sintezo prodigiozina (Williamson in sod., 2006). V literaturi je večkrat izpostavljena tudi njegova vloga pri osmoregulaciji (Csonka, 1989; Danevčič in Stopar, 2011).

O tem, kako bakterijska celica *V. ruber* DSM 14379 izkoristi prisotnost prolina v okolju, kjer je zaradi povišanih ali znižanih slanosti izpostavljena različnim ionskim jakostim, in kako to vpliva na sintezo prodigiozina, v literaturi ni veliko znanega.

Cilj raziskovalnega dela je bil zato:

- preveriti vpliv različnih koncentracij prolina na pigmentacijo bakterije *V. ruber* DSM 14379 pri optimalnih pogojih za rast te bakterije
- preveriti vpliv prolina na pigmentacijo bakterije *V. ruber* DSM 14379 pri različnih koncentracijah NaCl

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Hipoteza, ki smo si jo zastavili v okviru diplomskega dela, je bila:

- dodatek prolina v gojišče bo povečal produkcijo rdečega pigmenta prodigiozina, ki ga sintetizirajo bakterije *V. ruber* DSM 14379, pri optimalni in neoptimalnih okoljskih koncentracijah NaCl za rast te bakterije

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SEKUNDARNI METABOLITI

Bakterije poleg primarnih metabolitov, ki so produkt centralnega metabolizma, sintetizirajo tudi sekundarne metabolite. Velikokrat tvorijo kar celo skupino med seboj tesno sorodnih sekundarnih spojin, ki so ponavadi značilne za določeno skupino mikroorganizmov, včasih tudi za eno samo vrsto (Madigan in Martinko, 2006). Sekundarni metaboliti so spojine z nizko molekulsko maso, ki zajemajo antibiotike, pigmente, toksine, efektorske molekule namenjene ekološki kompeticiji in simbiozi, feromone, encimske inhibitorje, imunomodulatorne agense, receptorske agoniste in antagoniste, pesticide, protitumorske učinkovine ter rastne faktorje živali in rastlin (Demain, 1998). Za razliko od primarnih, ki spremljajo aktivno rast mikroorganizmov do začetka stacionarne faze, začnejo sekundarni metaboliti v tej fazi šele nastajati, oziroma se začnejo tvoriti na prehodu iz eksponentne v stacionarno fazo rasti. Veliko je dokazov, da ima sekundarni metabolizem v hierarhiji regulacije nižjo prioriteto kot celična rast. Sinteza teh molekul je močno odvisna od fizioloških pogojev, ki se odzivajo na okoljske faktorje (Vining, 1990), še posebej sestave medija, v katerem rastejo (Venil in sod., 2013). V nasprotju s primarnimi, sekundarni metaboliti niso nujno potrebni za celično rast in razmnoževanje (Madigan in Martinko, 2006). Če gojimo nek mikroorganizem v bogatem, uravnoveženem mediju, ta po navadi ne tvori sekundarnih metabolitov, ali vsaj v bistveno manjši meri, kot znaša celoten potencial za njihovo produkcijo (Vining, 1990). Čeprav je represija sekundarnih metabolitov pogost pojav, je ob zagotovitvi ustreznih pogojev mogoče doseči tudi njihovo prekomerno produkcijo (Madigan in Martinko, 2006).

Specifičnost in ozek nabor fizioloških pogojev, ki so največkrat potrebni za sintezo sekundarnih produktov nakazuje, da praviloma nimajo očitne metabolne funkcije. Večina jih ima kompleksno in včasih tudi zelo nenavadno strukturo, ki za svojo sintezo potrebuje veliko število specifičnih encimskih reakcij, kar med drugim botruje njihovi izjemni raznovrstnosti. To je tudi glavni razlog, da večina teh poti še ni do potankosti razjasnjena. Kljub temu je poznano, da vse metabolne poti sekundarnih produktov izvirajo iz primarnega metabolizma, ki zagotavlja osnovne gradnike za njihovo biosintezo (Vining, 1990; Madigan in Martinko, 2006). Tvorba sekundarnih metabolitov je regulirana s hranili, fazo rasti, kontrolo s povratno zanko, encimsko inaktivacijo in encimsko indukcijo. Poleg splošnega mehanizma uravnave sekundarnega metabolizma pogosto obstajajo tudi specifični mehanizmi, ki stimulirajo produkcijo teh molekul. Vpliv na regulacijo imajo specifične spojine z majhno molekulsko maso, tRNA, sigma faktorji in genski produkti post-eksponentne faze. Prekurzorji pogosto stimulirajo produkcijo sekundarnih produktov tako, da zvečajo koncentracijo limitnega prekurzorja, z indukcijo encima za biosintezo tega produkta (sintazo), ali oboje hkrati (Demain, 1998).

Ponavadi so prekurzorji aminokislina, kot npr.:

- triptofan - stimulira sintezo ergot alkaloidov (Krupinski in sod., 1976),
- levcin - stimulira bacitracin sintazo (Haavik in Froyshov, 1982),
- metionin - stimulira L- $\delta$ -( $\alpha$ -aminoadipoil-L-cisteinil-D-valin (ACV) sintazo, ciklazo in ekspanzazo za sintezo cefalosporina bakterije *Cephalosporium acremonium* (Zhang in sod., 1987),
- lizin - stimulira lizin aminotransferazo (Rius in sod., 1996),
- glicin, fenilalanin, tirozin in arginin za stimulacijo sinteze vankomicina (McIntyre, in sod., 1996).

Kot induktorji lahko služijo tudi druge majhne molekule, kot so  $\gamma$ -butirolaktoni (butandiolidi) aktinomicet, homoserin laktoni (HSL) po Gramu negativnih bakterij, oligopeptidi po Gramu pozitivnih bakterij in drugi (Kawaguchi in sod., 1988).

Najpogosteje so genski zapisi za sekundarne metabolite v genskih gručah na kromosomu, vendar jih najdemo tudi na plazmidih (Demain, 1998). Geni, katerih produkti so vključeni v sintezo sekundarnih metabolitov so maksimalno izraženi šele, ko je rast organizma omejena. Poleg tega se v takih pogojih pri številnih genih, ki kodirajo encime za sintezo teh kompleksnih produktov, izredno poveča verjetnost za nastanek mutacij. Zaradi tega mora biti v nekem mikroorganizmu genska informacija, ki omogoči tako zapleteno biosintezo, izpostavljena pozitivni selekciji, saj tako zahteven proces porabi ogromno energije, zaradi česar je rast celic upočasnjena, kar posledično pomeni kompeticijsko pomanjkljivost za mikroorganizem. Z drugimi besedami, nek sekundarni metabolit se mora izkazati kot koristen za producentni organizem, ko ta ne more več tekmovali v svojem okolju na račun svojega polnega ravnega potenciala (Vining, 1990).

## 2.2 PIGMENTI

Naravni vir pigmentov so razne rude, insekti, rastline in mikroorganizmi. Med pigmente, ki jih tvorijo bakterije, spadajo karotenoidi, melanini, flavini, fenazini, kvinoni, bakterioklorofili in bolj specifično monascini, violacein, prodigiozin in indigo (Dufosse, 2009). Pigmenti bakterijske celice ščitijo pred UV-sevanjem (Konzen in sod., 2006), fotooksidacijo in poškodbami, ki jih povzroči vidna svetloba (Griffiths in sod., 1955), ter pred izsušitvijo (Margalith, 1992). Fotosinteza ne bi bila mogoča brez klorofilov, bakterioklorofilov ter fikobilinov, rdečih ali modrih antenskih pigmentov, ki zbirajo svetlobo (npr. fikoeritrin, fikocianin, alofikocianin) (Madigan in Martinko, 2006).

Glede na lokacijo jih razdelimo v dve skupini: tiste, ki ostanejo v večji meri vezani na bakterijske membrane (micele) in tiste, ki jih bakterije izločijo v medij. To dejstvo pomembno vpliva na izbiro načina izolacije in s tem povezanimi stroški, ko gre za

industrijsko zanimive produkte. Za biotehnološke postopke so bolj primerni vezani pigmenti, ki jih lažje pridobimo z razbitjem membran (micel) z acetonom, kot pigmenti izločeni v fermentacijsko brozgo, saj za njihovo ekstrakcijo potrebujemo ogromne količine organskih topil, kot je npr. etil acetat (Venil in sod., 2013).

Zaradi mnogih ekoloških in zdravju škodljivih posledic, ki jih povzročajo umetna barvila in njihovi stranski produkti, ki nastajajo pri industrijski proizvodnji le-teh, se povečuje potreba po naravno pridobljenih barvilih. Naravni pigmenti ali barve, ki so biološkega izvora se smatrajo zaradi svoje biološke aktivnosti za varne, saj so biorazgradljivi, zdravju neškodljivi in imajo lahko antioksidativne lastnosti. Ker gre svetovni trend vse bolj v smeri ekoloških in biorazgradljivih produktov, je potreba po barvilih naravnega izvora vse večja. Vse večje odkrivanje in proučevanje novih naravnih pigmentov namreč vodi k uporabi le-teh v živilski, papirni in tekstilni industriji. Med mikrobi imajo bakterije izreden potencial za produkcijo široke palete različnih bioproduktov, med katerimi so tudi pigmenti. Enostavni rastni pogoji, hitro večanje mikrobne biomase, neodvisnost od vremenskih pogojev in možnost pridobivanja različnih barvnih odtenkov so bistvene prednosti produkcije teh bioloških molekul s pomočjo mikroorganizmov. Ekstrakcija bakterijskih pigmentov v relativno čisti in koncentrirani obliki predstavlja največji tehnološki izziv (Venil in sod., 2013).

### 2.3 SEKUNDARNI METABOLITI PRI BAKTERIJAH IZ RODU *Vibrio*

Vibriji producirajo vrsto različnih sekundarnih metabolitov, ki jim omogočajo boljšo prilagoditev na spremembo dejavnikov okolja, ter jim dajejo kompeticijsko prednost v borbi za hranila in prostor pred ostalimi bakterijskimi vrstami (Manson in sod., 2011). Spojine, ki jih v ta namen sintetizirajo, so večinoma neribosomski peptidi in njihovi hibridi. Kljub njihovi skromni strukturi raznolikosti imajo te spojine širok spekter bioloških aktivnosti. Prodiginini delujejo antagonistično proti bakterijam (Hill in sod., 2005; Starič in sod. 2010), glivam, protozom (Daoust in Gerber, 1974; Harwood, 1978) in algam (Imamura, 1994). Opisani so tudi njihovi protirakavi (Jalal in sod., 1989; Sandy in sod., 2010), antimalarijski (Hill in sod., 2005) ter imunosupresivni učinki (Williamson in sod., 2007). Njihov protibakterijski učinek je lahko posledica npr. vpletanja v biosintezo maščobnih kislin bakterij (npr. andramid) (Oclarit in sod., 1994; Pohlmann in sod., 2005) ali inhibicije delovanja RNA polimeraze (Oliva in sod., 2001). Mnogi delujejo kot siderofori za vezavo železa v morskih okoljih, kjer so koncentracije te kovine izredno nizke (de Carvalho in Fernandes, 2010; Hider in Kong, 2010). Funkcija kelatorja je pomemben virulenčni dejavnik mnogih vibrijev in je lahko tudi njihovo glavno protimikrobno orožje (Manson in sod., 2011). Zanimive biološke učinke imajo kahalalidi, ki delujejo proti oportunističnim okužbam povezanim z AIDS-om in proti nekaterim rakavim celičnim linijam (Hamann, 2004).

Velik delež sekundarnih metabolitov, ki jih sintetizirajo bakterije iz rodu *Vibrio*, sodi v skupino signalnih molekul za zaznavanje celične gostote oziroma kvoruma (t.i. quorum sensing). Znan je tudi nevrotoksin tetrodotoksin (TTX) (Riemann in Azam, 2002), ki ga producirajo nekatere vrste, kot so *Vibrio harveyi* in *Vibrio alginolyticus*. Njegova fiziološka vloga v producentnih celicah še ni popolnoma razjasnjena, verjetno pa sodeluje pri regulaciji transporta natrija (Lee in sod., 2000). Poleg vseh naštetih, vibriji producirajo še vrsto produktov, katerih biološka aktivnost še ni poznana (Manson in sod., 2011).

Velika pestrost različnih sekundarnih bioloških molekul, ki jih najdemo pri tej skupini bakterij, se kaže v njihovem metabolnem potencialu in je odraz mnogih življenjskih stilov, ki jih lahko ti mikroorganizmi zavzamejo (npr. planktonski, pritrjeni, simbiotski, patogeni, komenzalni) (Thompson in sod., 2004). Različne variacije kemotipov znotraj ene vrste potencialno odražajo prilagojenost na določeno ekološko nišo (Wietz in sod., 2011). Vse te biomolekule niso zgolj domena vibrijev, ampak jih najdemo tudi v drugih, povsem nesorodnih bakterijskih vrstah, kar kaže na visoko stopnjo horizontalnih prenosov med bakterijami v tem okolju in postavlja vprašanja ekološke vloge nekaterih od teh učinkovin (Manson in sod., 2011).

## 2.4 PRODIGININI

Prodiginine producirajo mnoge po Gramu negativne, kot tudi po Gramu pozitivne bakterije. Prvič so prodiginine okarakterizirali pri bakteriji *Serratia marcescens* (Bennett in Bentley, 2000; Khanafari in sod., 2006). Zaradi svoje značilne rdeče barve so prodiginini zelo primerni kot modelne spojine za preučevanje sekundarnih metabolitov pri bakterijah (Williamson in sod., 2006). Glede na molekulsko strukturo jih razdelimo v štiri večje skupine (Wood, 1988; Bennett in Bentley, 2000). V prvo skupino sodijo prodigiozini, ki imajo na osnovno strukturo vezano linearno alkilno stransko verigo. Sem sodita prodigiozin in undecilprodigiozin. Ostale tri skupine zajemajo ciklične derivate prodigininov (Williamson in sod., 2006). Te biološke molekule delujejo toksično proti bakterijam, glivam in protozomom. Poleg tega je znan tudi njihov algiciden in protimalarijski učinek (Williams in Qadri, 1980). Sinteza prodigininov je odvisna od dejavnikov okolja, na primer sestave gojišč, v katerih bakterije rastejo (Cang in sod., 2000; Giri in sod., 2004). Njihova natančna lokacija v celici še ni poznana (Williamson in sod., 2007).

Regulacija biosinteze prodigininov je izredno kompleksna in natančno regulirana. Vključuje odzive na mnoge zunaj- in znotrajcelične signale. Znotrajcelični signali so vezani na fazo rasti celice, medtem ko so številni zunajcelični signali posledica odziva na temperaturo, razpoložljivost kisika, pH, svetlobo in ionsko jakost. Poleg fizikalnih, se količina produciranih prodigininov odziva še na mnoge kemijske dražljaje iz okolja. Ti so



povezani s spremembami razpoložljivosti virov ogljika in dušika, anorganskega fosfata ( $P_i$ ), soli, detergentov in prisotnostjo različnih kationov in anionov v okolju (Williams in Qadri, 1980; Bennett in Bentley, 2000). Sinteza prodigininov je regulirana preko zaznavanja signalnih molekul, s katerimi bakterije zaznavajo celično gostoto (ang. quorum sensing). Nekatere vrste iz rodov *Serratia* in *Streptomyces* sintetizirajo tudi številne majhne molekule, ki so udeležene pri regulaciji sinteze prodigininov (Williamson in sod., 2006).

Producenti prodigininov so sposobni zaznati številne fiziološke dejavnike, pri čemer uporabljajo zapletene regulatorne mreže, ki na podlagi teh signalov uravnavajo sintezo prodigininov. Pomembno je poudariti, da obstaja precejšnja raznolikost v načinu kontrole sinteze prodigininov, kar kaže na selekcijo neodvisnih in konvergentnih (npr. sistem alternativnega zunajceličnega signaliziranja) regulatornih poti, ki prilagodijo sintezo teh molekul na pogoje v okolju. Primerjava regulacije regulatornih sistemov bakterijskih sevov *Serratia* 93006, *Sma* SS-1 in *Sma* 274, kaže na veliko raznolikost regulacije teh mehanizmov tudi znotraj iste vrste (Williamson in sod., 2006). Najbolje okarakteriziran med prodiginini je prodigiozin, ki je v vodi netopen rdeči pigment (Venil in Lakshmanaperumasamy, 2009).

## 2.5 PRODIGIOZIN

Prodigiozin je najbolj znan predstavnik iz skupine prodigininov, ki ga producirajo številne bakterijske vrste. Prvič je bil opažen in okarakteriziran pri bakteriji *Serratia marcescens*. Producirajo ga mnoge bakterijske vrste iz rodu *Vibro*, kot npr. *V. psychroerythreus*, *V. gazogenes* (Harwood, 1978), *V. ruber* (Shieh in sod., 2003) *Vibrio rhizosphaerae* (Kumar in Nair, 2007). Poleg bakterij iz rodu *Vibrio* sp. ta pigment producirajo še sevi *Serratia* sp., bakterije *Streptomyces coelicolor*, *Hahella chejuensis* (Kim in sod., 2007), *Pseudoalteromonas denitrificans*, ki jih prav tako najdemo v morskih okoljih (Odić in sod., 2007; Odić in sod., 2010), in še mnoge druge bakterije.

Prodigiozin je tipičen primer sekundarnega metabolita, ki ga bakterije sintetizirajo v kasnejših fazah rasti (Starič in sod., 2010). V celicah ga najdemo v znotrajceličnih granulah in celično vezanih membranskih strukturah, v zunajceličnih frakcijah je vezan na zunajcelične vezikle (Ruffing in Chen, 2006). Proteini, ki sodelujejo pri sintezi tega pigmenta, so homologi maščobnih sintaz, modularnih poliketidnih sintaz tipa I in neribosomskih peptidnih sintaz (Carvalho in sod., 2003). Na produkcijo prodigiozina vplivajo mnogi okoljski dejavniki, kot so dostopnost anorganskega fosfata, sestava gojišča, temperatura in pH gojišča (Babitha in sod., 2004). Bakterija *Rugamonas rubra* lahko producira toliko prodigiozina, da ta precipitira, ko pH v celici pade, in kolonije spremenijo barvo ter dobijo kovinsko zelen sijaj. V tej fazi večina celic v koloniji ni več živih (Austin in Moss, 1986).

### 2.5.1 Toksičnost prodigiozina

Nekatere študije kažejo vpliv nekaterih frakcij ekstrakta prodigiozina na embriogenezo. Dokazan je toksičen vpliv prodigiozina na kokošji embrio (Fujikawa in Akimoto, 2011). Znan je tudi njegov inhibitorien učinek na rast nekaterih bakterijskih vrst, kot so bakterije *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* in *Pseudomonas aeruginosa*. Razumevanje mikrobne kompeticije v naravnem okolju je ključnega pomena za razumevanje strukture mikrobnih združb in kroženja hranil v ekosistemu. Dva glavna mehanizma antagonizma sta kompeticija mikroorganizmov za razpoložljiva hranila in prostor ter produkcija spojin, ki inhibirajo rast drugih organizmov v tem okolju. Pokazan je bil protibakterijski učinek prodigiozina proti bakterijam, ki živijo v istem okolju (npr. *Bacillus* sp.) (Starič in sod., 2010) in tudi proti nekaterim drugim nesorodnim bakterijam, kot so *Pseudoalteromonas* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* in *Micrococcus luteus* (Danevčič in Stopar, 2009). O mehanizmu delovanja prodigiozina na bakterijske celice je malo poznanega. V študiji Danevčič in sod. (2016) so pokazali, da prodigiozin inducira autolizine pri bakteriji *Bacillus subtilis*. Poleg tega je poznano, da prodigiozin deluje tudi antibiotično proti protozojem in glivam (Gerber, 1975).

### 2.5.2 Ekofiziološke funkcije

Ekofiziološka vloga prodigiozina, kot pri mnogih drugih pigmentih, še ni natančno definirana. Vse več raziskav kaže na njegovo vpletenost pri razpršitvi bakterij, metabolnem odtoku nikotinamid dinukleotid fosfata (NADPH) in prolina iz centralnega metabolizma, shranjevanju svetlobne energije, zaščiti pred UV-sevanjem, pretoku energije in anionskem transportu.

#### 2.5.2.1 Razpršitev bakterij

Pri poskusu, kjer se skozi tekočo bakterijsko kulturo *S. marcescens* dvigajo mehurčki zraka, so bile pigmentirane celice prisotne v zračnih mehurčkih v večji koncentraciji, kot v gojišču (Syzdek, 1985). Pigmentirane celice kažejo očitno večjo hidrofobnost, ki je lahko tudi posledica prisotnosti prodigiozina. Ker je večja zastopanost pigmentiranih celic v zračnih mehurčkih posledica zapletenega zaporedja dogodkov, na katerega vplivajo tudi pogoji v gojišču, je poenostavljeno sklepanje, ki upošteva samo hidrofobno naravo pigmenta, lahko napačno. Hidrofobnih lastnosti te bakterije ne moremo v celoti pripisati prodigiozinu. Nekatere druge raziskave na tem področju tako ne pripisujejo te vloge pigmentu, vsaj ne v celoti, saj naj bi nekateri klinični sevi bakterije *S. marcescens* kazali

hidrofobne lastnosti tudi v odsotnosti prodigiozina. Nepigmentirane celice so vsebovale dodatni protein, ki naj bi bil odgovoren za povečano površinsko hidrofobnost nekaterih nepigmentiranih mutant. Tudi rezultati, ki kažejo, da naj bi bil prodigiozin vsidran v notranjo celično membrano, ne podpirajo vloge pigmenta pri hidrofobnosti celice (Leon in sod., 2001; Carvalho in sod., 2003).

#### 2.5.2.2 »Metabolni odtok« nikotinamid dinukleotid fosfata (NADPH) ali prolina iz centralnega metabolizma

Pokazano je bilo, da se v primeru porušenega ravnotežja med sintezo in porabo prolina pri bakteriji *Streptomyces coelicolor*, viški te aminokislina preusmerijo v sintezo rdečega pigmenta, ki ga bakterija producira. Ta biološka funkcija bi lahko razložila tudi natančno regulacijo teh sekundarnih metabolitov (Hood in sod., 1992).

#### 2.5.2.3 Zaščita pred UV-sevanjem

Nedavno je bilo pokazano, da ima v bakterijski celici *V. ruber* DSM 14379 pigment prodigiozin zaščitno vlogo pred UV-sevanjem (Borič in sod., 2011). Njegova vloga je pomembna, ko se bakterijska celica znajde v okolju, kjer je izpostavljena visokim dozam UV-sevanja. Pigmentirane celice pri visokih stopnjah UV-sevanja približno tisočkrat bolje prenašajo izpostavljenost UV-žarkom kot nepigmentirane celice tega seva. Prodigiozin je zelo učinkovit UV-zaščitnik, saj se po stopnji zaščite pred UV-žarki lahko primerja z odpornostjo pri sporah *Bacillus* sp. in nekaterih bakterijah, kot je *Deinococcus radiodurans*, ki so v stacionarni fazi izredno odporne proti UV-sevanju. V kokulturi, kjer seva nista izpostavljena UV-stresu, nepigmentirana mutanta preraste divji tip, kar kaže na to, da energijsko potraten proces sinteze pigmenta celici odvaja energijo, ki jo potrebuje za metabolne procese (Haddix in sod., 2008). To tezo podpira tudi spoznanje, da prodigiozin pri bakteriji *S. marcescens* vpliva negativno na biomaso in tvorbo adenozin trifosfata (ATP). Kljub temu bakterijam, ki ga producirajo, v stresnih razmerah podeljuje kompeticijsko prednost pred celicami drugih bakterijskih vrst (Starič in sod., 2010; Borič in sod., 2011).

#### 2.5.2.4 Pretok energije in anionska izmenjava

Haddix in sod. (2008) so predvideli fiziološko vlogo prodigiozina v energijskem metabolizmu celice na podlagi rezultatov, ki kažejo obratno sorazmerje med koncentracijo ATP v celici in količino sintetiziranega prodigiozina pri bakteriji *S. marcescens*. V procesu odtoka energije deluje prodigiozin kot strogo reguliran razklopljevalec protonskega transporta in sinteze ATP z oksidativno fosforilacijo. Ključen argument za predlagano funkcijo prodigiozina je prikaz njegove  $H^+/Cl^-$  simporterske aktivnosti v umetno

pridobljenih liposomih. Proces naj bi varoval celice z omejevanjem produkcije reaktivnih kisikovih zvrsti (Sato in sod., 1998).

## 2.6 BIOSINTEZA PRODIGIOZINA

Regulacija sinteze prodigiozina je dokaj dobro raziskana pri bakteriji *Serratia marcescens*, kjer je poznana tudi njegova biosintetska pot. Sestavljena je iz dveh delov. Kondenzacija produktov obeh delnih poti, 3-metil-3-n-amil-pirola (MAP) in 4-metoksi-2,2'-bipirol-5-karbaldehida (MBC), je zadnja stopnja sinteze tega pigmenta (Slika 1). Sinteza produkta MBC je skupna več različnim bakterijam (*Serratia* spp., *Streptomyces coelicolor* in *Hahella chejuensis*) pri katerih najdemo homologne gene, ki kodirajo encime za posamezne stopnje v verigi reakcij. Bakterijama *S. coelicolor* in *S. marcescens* so skupni tudi osnovni prekursorji (prolin, acetat, serin in S-adenozilmetionin), ki jih vključijo v bipirol MBC. Prvi korak biosinteze MBC zajema vključitev prolina, pri čemer nastane pirolni obroč preko intermediata pirolil-2-karboksil-S-PCP. V naslednjem koraku se aktivira L-prolin s pomočjo ATP-ja in L-prolilna skupina se nato prenese na tiolno skupino fosfopanteteilnega dela peptidil prenašalnega proteina (PCP). L-prolil-S-PCP se nato oksidira do pirolil-2-karboksil-S-PCP. Ta mehanizem vključevanja prolina v pirol je skupen mnogim sekundarnim metabolitom, ki vključujejo pirolne skupine (npr. undecilprodigiozin, prodigiozin, pioluteorin, kumermicin A1, in drugi). Povsem drugače je pri biosintezi monopirola, kjer so te poti veliko bolj specifične za posamezno bakterijsko vrsto. To dejstvo podpira spoznanje, da encimi, ki katalizirajo sintezo MAP, nimajo homologov pri drugih bakterijskih sevih, ki si delijo homologne gene za sintezo MBC. To lahko razložimo s potrebo po vključevanju različnih začetnih prekursorjev ali s sintezo nekoliko različnih monopirolov (Williamson in sod., 2006).

Začetni prekursor za biosintezo MAP, 2-oktenal, verjetno nastane z encimi za biosintezo maščobnih kislin ali z avtooksidacijo nenasičenih maščobnih kislin. Zanimivo je, da sta encima, ki katalizirata zadnje stopnje sinteze obeh prekursorjev prodigiozina (MAP in MBC), vsidrana na notranji membrani. To kaže na zbiranje prekursorjev MAP in MBC za sintezo pigmenta na citoplazemski membrani celice (Williamson in sod., 2006).



optimalno produkcijo pigmenta pri temperaturi 28 °C. Odvisno od sestave medija se produkcija pigmenta ustavi pri temperaturi 30 °C v bogatem gojišču oziroma pri temperaturi 42 °C (gojišče z maščobnimi kislinami) (Giri in sod., 2004). Pri bakteriji *V. ruber* DSM 14379 je produkcija pigmenta ravno tako največja pri optimalni temperaturi za rast organizma (28 °C) in pada proti višji in nižji temperaturi (Starič in sod., 2010). Podobno velja tudi za produkcijo undecilprodigiozina pri bakteriji *Streptomyces* sp. JS520 (Stanković in sod., 2012).

#### 2.6.1.3 Hranila

Maksimalno količino pigmenta v zaprtem sistemu na kompleksnem gojišču tvori bakterija *V. gazogenes* po 10 urah inkubacije. Poleg tega bakterija *V. gazogenes* tvori bistveno višje količine prodigiozina v definiranem, kot v kompleksnem gojišču, ki vsebuje velike količine aminokislin iz kvasnega ekstrakta in triptona. Allen in sod. (1983) so predvidevali, da je boljša produkcija prodigiozina na definiranem mediju posledica nižjih koncentracij aminokislin v gojišču. Pri bakteriji *V. ruber* DSM 14379 je poznano, da se koncentracija pigmenta povečuje s koncentracijo glukoze v gojišču do 5 g/L, z nadaljnjim večanjem koncentracije glukoze se je količina pigmenta znižala (Starič in sod., 2010). Prav tako dodatek različnih organskih molekul kot so fruktoza, maltoza, etanol, glicerol in druge tudi vpliva na sintezo prodigiozina pri različnih bakterijskih vrstah (Cang in sod., 2000; Giri in sod., 2004; Starič in sod., 2010; Stanković in sod., 2012).

#### 2.6.1.4 Dodatek aminokislin

Dodatek alanina, prolina ali histidina je nedeležim se celicam bakterije *S. marcescens*, inkubiranim pri temperaturi 27 °C, zvišal stopnjo sinteze proteinov in biosintezo prodigiozina. V primeru dodatka aminokislin, ki niso udeležene pri sintezi prodigiozina, povečanja sinteze proteinov ni bilo. Po 24 urah se je celokupna količina proteinov v celični suspenziji z dodanim prolinom povečala za 98 %, z dodanim alaninom pa za 67 %. Vse kaže, da se morajo aminokisliline, ki vplivajo na sintezo prodigiozina v nedeležih se celicah, metabolizirati, da služijo celici v prvi vrsti kot vir ogljika in dušika za izgradnjo makromolekul in intermediatov in šele nato so celicam na voljo za sintezo prodigiozina (Williams in sod., 1976).

#### 2.6.1.5 Aktivnost respiracije

Stopnja respiracije pigmentiranega seva bakterije *S. marcescens* se je znižala prej, kot pri nepigmentiranem sevu v pozni eksponentni, oziroma zgodnji stacionarni fazi rasti. Če so celice rasle v gojišču z virom ogljika, ki ni induciral sinteze prodigiozina, se je nivo

respiracije znižal pri obeh sevih enako. Rezultati študije (Kobayashi in Ichikawa, 1985) kažejo na to, da se je aktivnost respiracije pri bakteriji *S. marcescens* znižala s sintezo prodigiozina.

### 2.6.2 Uporaba prodigiozina

Prodigiozin veliko obeta na področju farmakologije, saj je poznana njegova protirakava in imunosupresivna aktivnost. Njegov citotoksičen in zaviralni učinek na rast mnogih tumorskih celičnih linij kaže spodbudne rezultate tudi na človeških rakastih B-celicah bolnikov s kronično limfocitno levkemijo (Campas in sod., 2003; Pandey in sod., 2007). Citotoksičen vpliv kaže prodigiozin tudi pri rakavih obolenjih, ki so odporna na nekatere druge znane protirakave učinkovine (Llagostera in sod., 2005). Prav tako so obetavni tudi njegovi imunosupresivni učinki (Han in sod., 2001).

Njegova uporabnost v industriji barv je omejena, saj ob prisotnosti vidne svetlobe hitro razpade. Lahko pa služi kot osnova za sintezo kromoforjev, ki dobijo po kemični modifikaciji željene lastnosti (Hobbson in Wales, 1998). Citotoksičnost najverjetneje posreduje zakisanje citoplazme, ki aktivira kaspaze in posledično povzroči apoptozo celic (Haddix in sod., 2008).

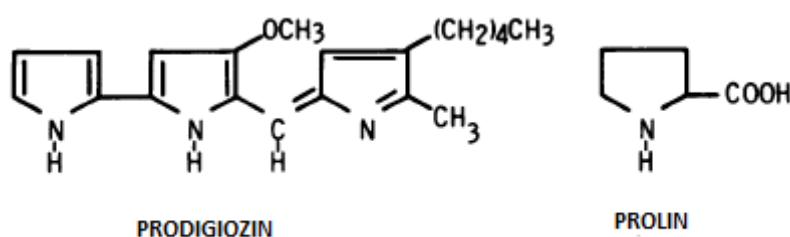
Raziskava iz leta 2001 pripisuje prodigiozinu sinergističen učinek s hitinazami bakterijskega seva *S. marcescens* B2 na inhibicijo kalitve spor kot učinkovito sredstvo pri kontroli rasti patogene glive *Botrytis cinerea*, ki povroča sivo plesen. Ta pogosto napada rastline, še posebej tiste, ki jih gojimo v rastlinjakih (npr. jagode) (Someya in sod., 2001).

## 2.7 VLOGA PROLINA

Aminokislino prolin različni organizmi akumulirajo za uravnavanje osmotskih neravnovesij, ki so posledica spremenjene ionske jakosti v njihovi okolici. Vloga prolina pri osmoregulaciji je dobro opisana pri rastlinah, bakterijah, protozojih, morskih nevretenčarjih in algah. Prolin ima pomembno vlogo tudi pri zaščiti encimov in celičnih struktur in kot obramba pred reaktivnimi hidrosilnimi radikali (Choudhary in sod., 2005).

Pri številnih poteh sekundarnega metabolizma, prisotnost primarnega metabolita pospeši produkcijo sekundarnega metabolita. Ti efektorji so pogosto prekurzorji, pri katerih moramo najprej določiti, ali je učinek samo posledica povečane koncentracije prekurzorja in/ali vključuje tudi indukcijo ene ali več encimov (sintaz), udeleženih pri biosintetski poti (Demain, 1998).

Od prekurzorjev za sintezo prodigiozina vzbudi prolin posebno pozornost zaradi svoje strukturne podobnosti s pirolnimi obroči pigmenta (Slika 2). Izkaže se, da ta aminokislina pomembno vpliva na količino producirane barvila. Divji sevi bakterije *S. marcescens* lahko uporabljajo prolin kot edini vir ogljika in dušika. Scott in sod. (1976) so pokazali, da lahko tudi mutiran sev bakterije *S. marcescens* vključi L-prolin v strukturo prodigiozina, kljub temu da ima okvarjen gen, ki omogoča razgradnjo prolina, in ga zato ne more uporabljati kot vira ogljika in dušika. Prolin se tako v strukturo pigmenta vgradi brez predhodnih modifikacij, če ima celica za rast na voljo alternativni vir ogljika in dušika. Dodani prolin se v tem primeru vgrajuje tudi v strukturo celičnih proteinov.



**Slika 2:** Strukturni formuli prodigiozina in prolina. Obstajata dve stereoisomeri prolina. V prodigiozin se vgrajuje samo L-prolin (Scott in sod., 1976).

V celicah *Streptomyces coelicolor* A3 (2) je prolin prekurzor za sintezo undecilprodigiozina, ki tvori skupaj s prodigiozinom skupino linearnih tripirollov (Hood in sod., 1992; Williamson in sod., 2006). Sinteza, razgradnja in transport prolina so v celici strogo regulirani (Hood in sod., 1992).

Pri bakteriji *S. marcescens* je znano, da so poleg prolina prekurzorji sinteze prodigiozina še druge aminokisliline, in sicer alanin, asparaginska kislina, glutaminska kislina, serin in histidin (Qadri in Williams, 1972).

Prolin prehaja v celico pri po Gramu negativni bakteriji *E. coli* s pasivnim transportom (preko porinov zunanje celične membrane) in aktivnim transportom preko citoplazemske celične membrane. Trije prolinski prenašalci PutP (prolinski prenašalec I), ProP (prolinski prenašalec II) in ProU (prolinski prenašalec III) z različnimi afinitetami do prolina so celici na voljo za prenos prolina preko notranje celične membrane. PutP ima visoko specifično afiniteto do prolina in je glavni prenašalec, ko celica potrebuje prolin kot vir energije za centralni metabolizem. ProP in ProU imata manjšo afiniteto do prolina, vendar širšo specifičnost za substrate, ki so udeleženi pri odzivu celice na stres (Wood, 1988).

Prolin lahko v bakteriji *V. ruber* nastopa kot aminokislina, osmoregulator ali prekurzor za sintezo prodigiozina. Pri visokih slanostih celice močno (tudi do desetkrat) povečajo



količino prolina v celicah v primerjavi s količino nakopičenega prolina pri optimalni slanosti gojišča (Danevčič in Stopar, 2011).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

- aceton  $C_3H_6O$   $M_w = 58,08$  g/mol (Sigma, ZDA)
- agar-agar (Sigma, ZDA)
- N-cetil-N,N,N-trimetilamonijev bromid ( $(C_{16}H_{33})N(CH_3)_3Br$  - CTAB) (Merck, Nemčija)
- destilirana voda
- etanol 96 % (V/V)  $C_2H_5OH$  (Sigma, ZDA)
- fosforna kislina  $H_3PO_4$  85 % (Merck, Nemčija)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- ledocetna kislina (Merck, Nemčija)
- magnezijev klorid heksahidrat  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$   $M_w = 203,3$  g/mol (Merck, Nemčija)
- MQ destilirana voda
- natrijev klorid  $NaCl$   $M_w = 58,5$  g/mol (Merck, Nemčija)
- ninhidrin  $C_9H_6O_4$   $M_w = 178,14$  g/mol (Fluka, Švica)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- prolina  $C_5H_9NO_2$   $M_w = 115,13$  g/mol (Merck, Nemčija)
- toluen  $C_7H_8$   $M_w = 92,14$  g/mol (Sigma, ZDA)

#### 3.2 GOJIŠČA

##### Gojišče PKS (pepton-kvasni ekstrakt-sol):

- 5 g peptokompleks
- 1 g kvasni ekstrakt
- 2 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 1000 mL destilirane vode
- 4 različne koncentracije  $NaCl$  (w/V):
  - I. 5 g  $NaCl$  za 0,5 % (w/V) PKS
  - II. 30 g  $NaCl$  za 3 % (w/V) PKS
  - III. 65 g  $NaCl$  za 6,5 % (w/V) PKS
  - IV. 100 g  $NaCl$  za 10 % (w/V) PKS

Za trdno gojišče smo dodali 15 g agar-agar na 1000 mL gojišča.

### 3.3 GOJENJE BAKTERIJSKE KULTURE

V okviru diplomskega dela smo za izvedbo eksperimentov uporabili bakterijski sev *V. ruber* DSM 14379 (Stopar in sod., 2004; Borić in sod., 2011; Borić in sod., 2012).

Svežo bakterijsko kulturo *V. ruber* DSM 14379 smo precepili iz agariziranega gojišča PKS, ki smo ga hranili pri temperaturi 4 °C, v 5 mL tekočega gojišča PKS s 3 % (w/V) NaCl in stresali na rotacijskem stresalniku 8 ur pri 200 obratih na minuto (rpm) v temi, pri temperaturi 28 °C. Po osmih urah inkubacije smo preverili optično gostoto (OD<sub>650</sub>) tekoče kulture pri 650 nm s spektrofotometrom. Za ničlitev smo uporabili absorbanco svežega gojišča PKS. Nato smo 1 mL tekoče kulture precepili v 100 mL sveže pripravljenega gojišča PKS z izbrano slanostjo (0,5 %, 3 % ali 10 % (w/V) NaCl), ki smo ga predhodno sterilizirali z avtoklaviranjem. Tako pripravljenemu gojišču smo aseptično dodali ustrezni volumen založne koncentracije prolina (500 µM), da smo dobili željene končne koncentracije dodanega prolina v gojišču (0; 1; 2,5; 5; 12,5; 20; 25 g/L). Kulture smo nato dalje stresali pri enakih pogojih 16 ur. Po končani inkubaciji smo kulturam izmerili OD<sub>650</sub> ter v vzorcih določili količino prolina in pigmenta v celicah ter suho celično maso.

### 3.4 DOLOČANJE KOLIČINE PROLINA V BAKTERIJSKI CELICI

Količino prolina v celici smo določali po metodi opisani v Danevčič in Stopar (2011). Predhodno smo pripravili 300 mL založne koncentracije 0,1 % (w/v) N-cetil-N,N,N-trimetilamonijev bromid (CTAB), ki smo jo kasneje potrebovali za določanje koncentracije dodanega prolina v vzorcu. Nato smo dvakrat po 2 mL kulture iz vsakega vzorca odpipetirali v 2 mL-mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 minut pri 10 000 obratih pri temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in usedlino celic resuspendirali v 1,7 mL 0,1 % (w/V) CTAB. Suspenzijo smo stresali na vibracijskem mešalniku 5 minut in nato centrifugirali 10 minut pri 13 000 obratih in sobni temperaturi. Tako pripravljen ekstrakta celic smo prenesli za nadaljnje meritve v 10 mL-centrifugirke v katere smo dodali 1 mL ekstrakta celic ali standarda, 1 mL led očetne kisline in 1 mL svežega ninhidrinskega reagenta. Za ničlitev smo pripravili 1 mL ekstrakta celic, 1 mL led očetne kisline in 1 mL reagenta brez ninhidrina. Ninhidrinski reagent in redčitve standardov smo vsakič sveže pripravili. Ninhidrinski reagent je sestavljen iz 1,25 g ninhidrina, 30 mL led očetne kisline in 20 mL 6 M fosforne kisline. Standarde prolina smo pripravili v 0,1 % (w/V) CTAB v koncentracijah 0, 5, 10, 50, 100, 250, 400 in 500 µM. Tako pripravljene vzorce smo segrevali eno uro v pečici pri temperaturi 100 °C. Potem smo vzorce ohlajali 20 minut na ledu in 10 minut pri sobni temperaturi. Po ohlajanju smo vzorcem dodali 2 mL toluena ter stresali na stresalniku pri 250 rpm 10 minut in temperaturi 28 °C. Po stresanju smo pustili vzorce na pultu pri sobni temperaturi in počakali 30 minut, da so se faze ločile. Toluensko fazo smo nato prenesli v treh ponovitvah po 300 µL v polipropilensko

mikrotitrsko ploščo in izmerili absorbanco pri 520 nm ( $A_{520}$ ). Koncentracijo prolina smo v vzorcih določili s pomočjo umeritvene krivulje in jo normirali na suho celično biomaso. V primerih, ko smo predvidevali, da bi koncentracija prolina lahko segala izven okvirov umeritvene krivulje, smo vzorce predhodno ustrezno koncentrirali oziroma redčili.

### 3.5 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PIGMENTA V BAKTERIJSKI CELICI

Količino pigmenta v celici smo določali po metodi opisani v Starič in sod. (2010) ter Borić in sod. (2011). Iz tekoče kulture smo odpipetirali dvakrat po 1,5 mL vsakega vzorca v 2 ml-mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 minut pri 10 000 obratih in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odlili in usedlino celic resuspendirali v enakem volumnu acetona ter stresali 90 minut na stresalniku. Po stresanju smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 13 000 obratih in temperaturi 4 °C. Na polipropilensko mikrotitrsko ploščo smo v treh ponovitvah nanesti 300 µL ekstraktov pigmenta v acetonu ter izmerili absorpcijski spekter pri valovnih dolžinah med 380 in 600 nm s spektrofotometrom. Za ničlitev smo uporabili čisto topilo (aceton). Dobljene spektre smo integrirali in koncentracijo pigmenta v mg/L določili s pomočjo umeritvene krivulje z enačbo  $y = 3,106 \cdot x$ , kjer predstavlja  $y$  površino absorpcijskega spektra pigmenta med 380 in 600 nm in  $x$  koncentracijo pigmenta v mg/L. Količino pigmenta smo v vzorcih normirali na suho celično biomaso.

### 3.6 DOLOČANJE SUHE CELIČNE BIOMASE

Za določanje suhe celične biomase smo 40 mL kulture centrifugirali 10 minut pri 10 000 obratih in temperaturi 4 °C. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v enakem volumnu sterilne destilirane vode. Nato smo suspenzijo spet centrifugirali 10 minut pri 13 000 obratih in temperaturi 4 °C, odlili supernatant in celice resuspendirali v 5 mL sterilne destilirane vode. Suspenzije celic smo prenesli v tehtiče, ki smo jih predhodno sušili pri temperaturi 105 °C preko noči in prazne stehali na analitski tehtnici. Suspenzijo bakterijskih celic smo sušili 24 ur pri temperaturi 105 °C. Po sušenju smo tehtiče prenesli v eksikator in pustili, da se ohladijo. Nato smo jih stehali, dobljeno težo odšteli od teže predhodno stehanih tehtičev brez dodane biomase in tako določili suho celično maso.

### 3.7 DOLOČANJE VPLIVA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ PROLINA NA PIGMENTACIJO BAKTERIJE *V. ruber* DSM 14379

Bakterijo *V. ruber* DSM 14379 smo gojili v gojišču PKS s 3 % (w/v) NaCl z dodatkom različnih koncentracij prolina (0; 1; 2,5; 5; 12,5; 20; 25 g/L) 16 ur pri temperaturi 28 °C in 200 rpm v temi. Po inkubaciji smo kulturam izmerili  $OD_{650}$  ter določili količino prolina (poglavje 3.4), količino pigmenta (poglavje 3.5) in količino suhe celične biomase (poglavje

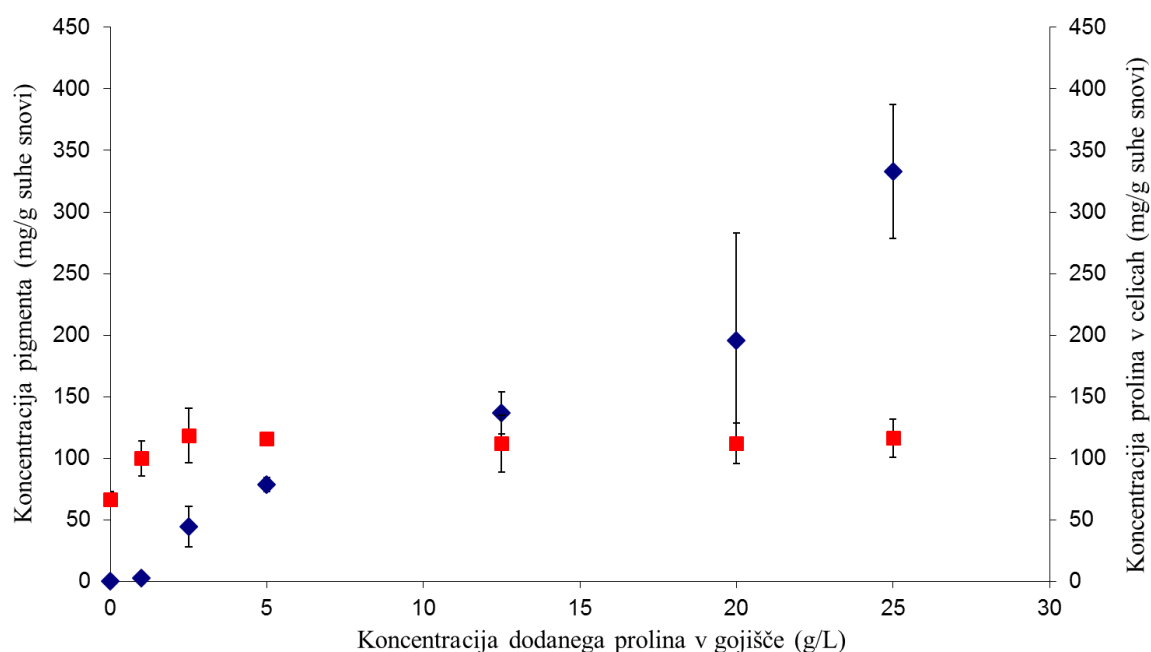
3.6). Količino pigmenta in prolina smo normirali na suho celično biomaso. Vsako različico gojenja smo izvedli v treh ponovitvah.

### 3.8 DOLOČANJE VPLIVA PROLINA NA PIGMENTACIJO BAKTERIJE *V. ruber* DSM 14379 PRI RAZLIČNIH SLANOSTIH V GOJIŠČU

Za izbrane koncentracije prolina (0; 2,5; 5; 12,5; 20 g/L) smo preverili njihov vpliv na pigmentacijo pri gojenju bakterije *V. ruber* DSM 14379 pri štirih različnih slanostih (0,5; 3; 6,5 in 10 % (w/V) NaCl). Kulturo bakterije *V. ruber* smo gojili pri teh slanostih z ali brez dodatka prolina 16 ur pri temperaturi 28 °C in 200 rpm v temi v treh ponovitvah. V vseh primerih smo kulturam izmerili OD<sub>650</sub> ter določili količino prolina (poglavje 3.4), količino pigmenta (poglavje 3.5) in količino suhe celične biomase (poglavje 3.6). Količino pigmenta in prolina smo normirali na suho celično biomaso. Bakterijsko kulturo *V. ruber* DSM 14379 smo vedno inkubirali v temi, tako da smo preprečili morebiten razpad pigmenta zaradi vpliva vidne oziroma UV-svetlobe.

## 4 REZULTATI

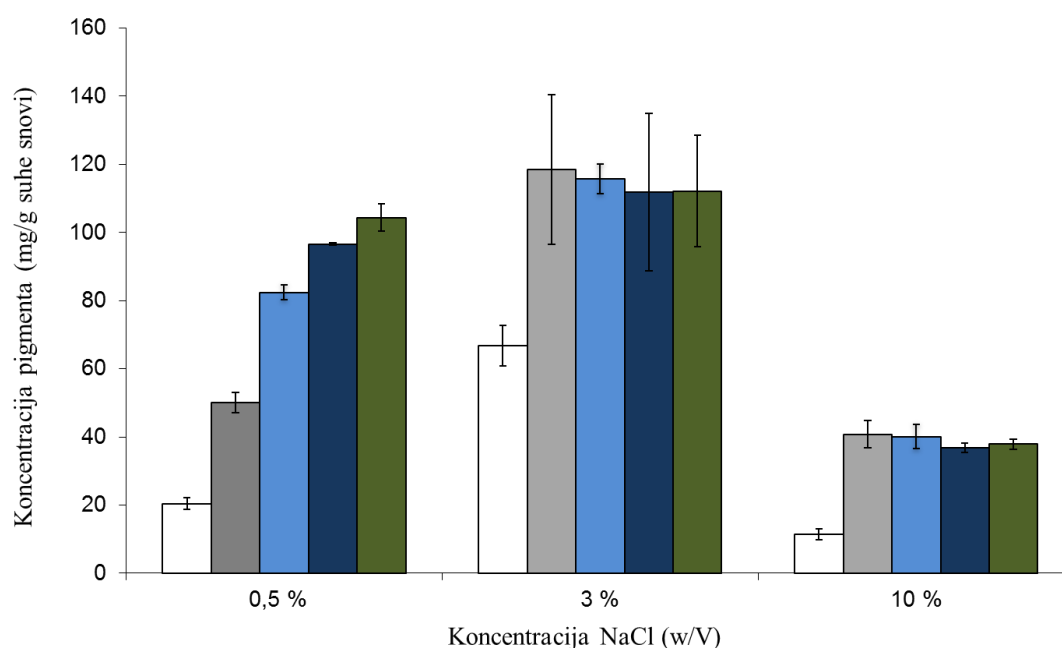
Količina pigmenta, ki jo je proizvedla bakterija *V. ruber* DSM 14379, pri različnih koncentracijah dodanega prolina v gojišče pri optimalni slanosti (3 % (w/V) NaCl) je prikazana na sliki 3. Z večanjem koncentracije dodanega prolina v gojišče do 2,5 mg/L se je koncentracija produciranega prodigiozina povečevala. Z nadaljnjim povečevanjem koncentracije prolina v gojišču se koncentracija prodigiozina ni več znatno spreminjala. Koncentracija znotrajceličnega prolina je bila premosorazmerna koncentraciji prolina, dodanega v gojišče. Pri izbranih koncentracijah dodanega prolina v gojišče ni prišlo do zasičenja znotrajcelične količine prolina. Iz rezultatov izhaja, da celica lahko kopiči večje količine prolina kot ga uporabi za sintezo prodigiozina.



**Slika 3:** Količina prolina in rdečega pigmenta prodigiozina, ki je nastala v bakterijskih celicah *V. ruber* DSM 14379 po 16 urah inkubacije pri temperaturi 28 °C na rotacijskem stresalniku (200 rpm). Prolin smo predhodno dodali v gojišče PKS s 3 % (w/V) NaCl v različnih koncentracijah (0; 1; 2,5; 5, 12,5; 20 in 25 g/L). Rjavi kvadrati (■) označujejo količino pigmenta, modri rombi (◆) količino prolina v celicah. Vrednosti za oba parametra so preračunane na gram suhe celične mase. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture *V. ruber* DSM 14379.

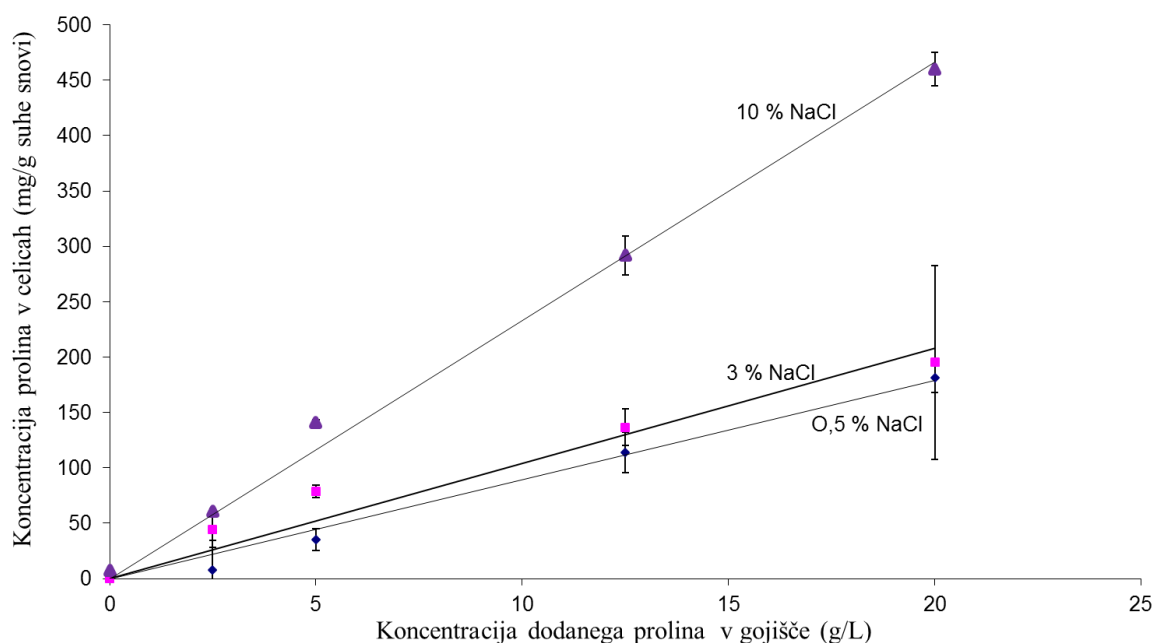
Na koncentracijo znotrajceličnega pigmenta lahko vpliva več dejavnikov. Na sliki 4 je prikazan vpliv koncentracije soli in koncentracije prolina v gojišču na znotrajcelično koncentracijo prodigiozina. V celici se je največ prodigiozina sintetiziralo pri 3 % (w/V) NaCl, ki je optimalna za produkcijo tega sekundarnega metabolita (Starič in sod., 2010). Dodatek 2,5 g/L prolina je povečal koncentracijo znotrajceličnega prodigiozina za

približno 1,8 krat, glede na koncentracijo pigmenta v celicah, ki so rasle v gojišču brez dodanega prolina. Višje koncentracije prolina v okolju niso imele znatnega vpliva na produkcijo prodigiozina pri optimalni slanosti. Pri optimalni slanosti je lahko celica z zunajcelično dodanim prolinom sintetizirala do 120 mg prodigiozina na gram suhe mase (Priloga B2). Pri nizki slanosti, 0,5 % (w/V) NaCl, je bila sinteza prodigiozina več kot trikrat manjša kot pri optimalni slanosti brez dodatka prolina v gojišče. Dodatek prolina je imel pri nizki slanosti značilen vpliv na sintezo prodigiozina, saj se je z večanjem koncentracije prolina v gojišču večala tudi koncentracija prodigiozina v celici. Pri največji količini dodanega prolina v gojišče se je koncentracija znotrajceličnega prodigiozina povečala za več kot petkrat in je bila primerljiva tisti pri optimalni slanosti. Pri povečani slanosti okolja, 10 % (w/V) NaCl, je koncentracija znotrajceličnega prodigiozina brez dodatka prolina upadla za približno šestkrat glede na optimalno slanost. Tudi pri najvišji slanosti okolja je dodatek prolina značilno povečal koncentracijo znotrajceličnega prodigiozina. Do maksimalnega odziva je prišlo že pri dodatku 2,5 g/L prolina. Kljub dodatku prolina je bila koncentracija prodigiozina še vedno približno trikrat nižja kot pri optimalnih slanostih z dodanim prolinom in približno enkrat nižja kot pri optimalni slanosti brez dodanega prolina (Slika 4).



**Slika 4:** Količine sintetiziranega pigmenta v bakterijskih celicah *V. ruber* DSM 14379 pri znižani (0,5 % (w/V) NaCl), optimalni (3 % (w/V) NaCl) in zvišani (10 % (w/V) NaCl) slanosti gojišča PKS ter različnih koncentracijah dodanega prolina pri temperaturi 28 °C, 200 rpm, gojenih v temi. Različne barve stolpcev pomenijo različne koncentracije dodanega prolina v gojišče PKS (bela – 0 g/L; siva – 2,5 g/L; svetlo modra – 5 g/L; temno modra – 12,5 g/L; zelena – 20 g/L). Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture *V. ruber* DSM 14379.

Poleg tega, da prolin vpliva na sintezo prodigiozina, ima tudi vlogo osmoregulatorja v celici. Bakterijska celica lahko prolin sama sintetizira, v primeru da je prolin v okolju ga lahko iz okolja tudi sprejme. Količina sprejetega prolina v bakterijskih celicah pri različnih slanostih in dodatkih zunajceličnega prolina je prikazana na sliki 5. Gradient akumulacije prolina v bakterijske celice glede na dodano količino prolina je bil največji pri 10 % (w/V) NaCl. Pri optimalni slanosti za rast bakterije *V. ruber* (3 % (w/V) NaCl) je bil gradient akumulacije prolina v celicah 2.2 krat manjši kot pri povišani slanosti. Pri znižani koncentraciji NaCl (0,5 % (w/V) NaCl) v okolju je bil gradient akumulacije primerljiv z gradientom akumulacije pri optimalni slanosti.

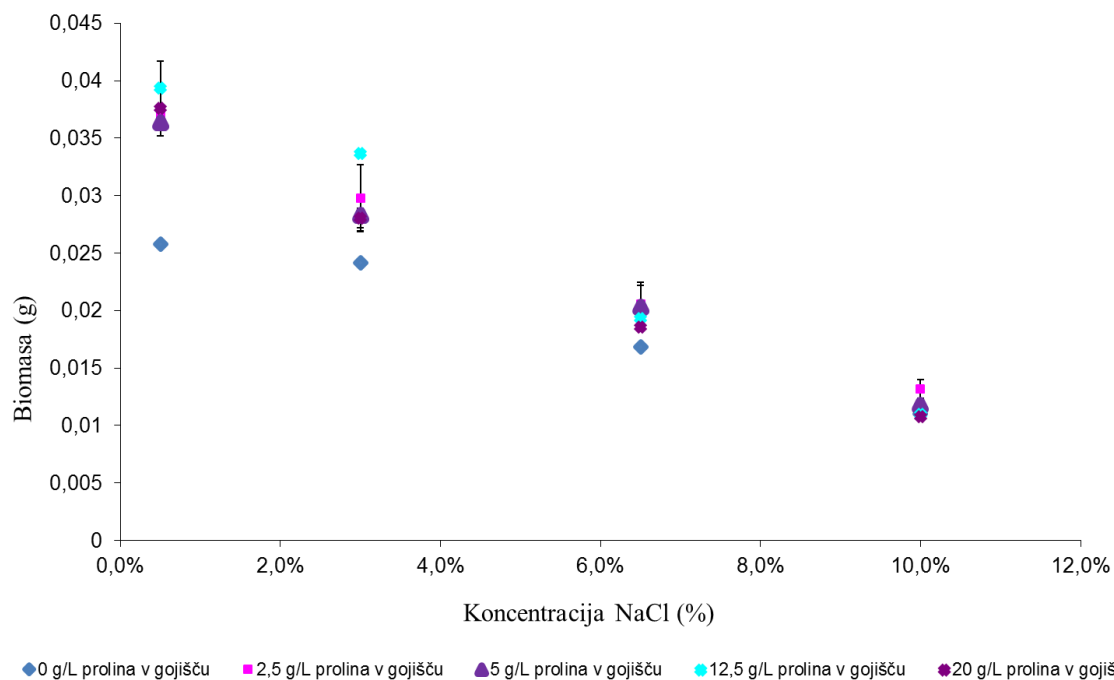


**Slika 5:** Kopičenje prolina v bakterijskih celicah *V. ruber* DSM 14379 pri znižani (0,5 % (w/V) NaCl), optimalni (3 % (w/V) NaCl) in povišani (10 % (w/V) NaCl) slanosti v gojišču PKS z dodanimi različnimi količinami prolina. Celice so bile gojene 16 ur pri temperaturi 28 °C in 200 rpm v temi. Meritve za vsako slanost so linearno aproksimirane s pripadajočimi gradienti naraščanja ( $y = 9,48 x$  za 0,5 % (w/V) NaCl ;  $y = 10,42 x$  za 3 % (w/V) NaCl ;  $y = 23,34 x$  za 10 % (w/V) NaCl). Za posamezno slanost so bile  $R^2$  vrednosti: 0,5 % (w/V) NaCl – 0,993; 3 % (w/V) NaCl – 0,947; 10 % (w/V) NaCl – 0,995. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture *V. ruber* DSM 14379.

Glede na rezultate je očitno, da lahko celica pri povišanih koncentracijah soli v okolju sprejme znatne količine prolina. V primeru, da prolin v okolju ni in ga celica potrebuje za osmoregulacijo ali biosintezo, mora celica prolin sama sintetizirati, kar je povezano z biosintetskimi stroški. Zaradi tega smo preverili, če lahko celična biomasa prirašča hitreje v primeru, ko prolin dodajamo v gojišče ali ne. Rezultati prirasta biomase pri različnih začetnih koncentracijah prolina v gojišču so prikazani na sliki 6. Pri najvišji slanosti 10 %



(w/V) NaCl ni imel dodatek prolina statistično značilnega vpliva na prirast biomase. Dodatek prolina je pri 0,5 % (w/V) NaCl povečal prirast biomase. Podobno je bilo tudi pri optimalni slanosti.



**Slika 6:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina v gojišče PKS na prirast biomase pri bakteriji *V. ruber* DSM 14379 pri štirih različnih slanostih (0,5; 3; 6,5 in 10 % (w/V) NaCl). Masa suhe snovi predstavlja biomaso pridobljeno iz 40 ml bakterijske kulture *V. ruber* DSM 14379 v ustreznem gojišču. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture *V. ruber* DSM 14379.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti, kakšen vpliv ima dodatek prolina, prekursorja za sintezo prodigiozina, v kompleksno gojišče PKS, v katerem raste bakterija *V. ruber* DSM 14379, na proizvodnjo pigmenta. Zanimalo nas je, kakšen vpliv ima dodatek te aminokislina na produkcijo rdečega pigmenta pri optimalnih in stresnih osmotskih pogojih. V svojem naravnem okolju (brakične vode Škocjanskega zatoka) se ta bakterijska vrsta velikokrat nahaja v podobnih situacijah spremenjene slanosti (Stopar in sod., 2004), zato bi lahko izsledki raziskovalnega dela pripomogli k razumevanju mehanizmov regulacije in odziva sekundarnega metabolizma bakterije *V. ruber* DSM 14379. Prodigiozin je zaradi svojih številnih bioloških učinkov tudi ekonomsko zanimiv sekundarni produkt (Venil in sod., 2013).

Bakterija *V. ruber* DSM 14379, ki smo jo gojili pri 3 % (w/V) NaCl, je pričakovano producirala največje količine rdečega pigmenta, v primerjavi z ostalimi testiranimi pogoji. Da je to optimalna slanost, pri kateri bakterija sintetizira največje količine prodigiozina, je skladno z rezultati Starič in sod. (2010). Podobna slanost (3,5 % NaCl) je optimalna tudi za produkcijo prodigiozina pri sorodni bakterijski vrsti *V. gazogenes*, čeprav bakteriji rasteta pri precej različnih optimalnih slanostih (*V. ruber* pri okrog 2,5 % (Odić in sod., 2007) in *V. gazogenes* pri okrog 0,5 % NaCl (Allen in sod., 1983)). Te primerjave nakazujejo, da je optimalna sinteza sekundarnih metabolitov možna pri drugačnih okoljskih pogojih kot optimalna rast bakterijskih celic. Pri stresnih koncentracijah soli v gojišču opazimo hiter upad rasti (Slika 6). Pokaže se, kot poročajo že mnoge predhodne objave (Allen in sod., 1983; Galinski in Trüper, 1994; Danevčič in sod., 2005; Odić in sod., 2007; Danevčič in Stopar, 2011), da mora bakterija v takšnih pogojih reorganizirati sestavo nekaterih celičnih struktur (predvsem membrane) in preusmeriti energetske tokove v celici, da lahko vzdržuje celično homeostazo. Prerazporeditev energetskih tokov močno vpliva tudi na znižano produkcijo sekundarnih metabolitov, saj ima sekundarni metabolizem v hierarhiji regulacije nižjo prioriteto kot celična rast (Demain, 1998), kar kažejo tudi dobljeni rezultati (sliki 4 in 6).

Pri soočanju z osmotskim stresom bakterije proizvajajo in kopičijo osmolite, ki ohranijo integriteto celic v stresnih pogojih. Bakterija *V. ruber* kot odgovor na povišano slanost, sintetizira aminokislino prolin, ki jo ščiti pred hiperosmotskim pritiskom (Danevčič in Stopar, 2011). Energijsko bolj ugodno rešitev kot sinteza, predstavlja vnos prolina iz okoljskega medija. Bakterija *V. ruber* lahko pri vseh pogojih slanosti sprejema prolin iz gojišča proporcionalno koncentraciji v gojišču. Rezultati kažejo, da je pri 10 % (w/V) NaCl osmotski gradient preko membrane največji, saj je bila neto količina nakopičenega

prolina v celicah največja (Slika 5). Tudi pri drugih dveh merjenih slanostih so celice *V. ruber* kopičile prolin v citoplazmi sorazmerno s koncentracijami prolina v gojišču, vendar z značilno manjšim gradientom.

Kot osnovni prekursor je prolin udeležen pri sintezi prodigiozina in tudi nekaterih drugih prodigininov (Williamson in sod., 2006). Če ga dodamo v gojišče, kjer raste kultura *V. ruber*, se sinteza pigmenta občutno poveča (sliki 3 in 4). Ni pa poznano, kako spremenjena osmolarnost vpliva na učinek prolina. Učinki prolina in nekaterih drugih aminokislin na sintezo prodigiozina so bili opisani tudi pri drugih bakterijah (Scott in sod., 1976). Pri nedeležih se celicah bakterije *S. marcescens* so Williams in sod. (1971) pokazali, da prolin najbolje inducira sintezo prodigiozina pri koncentraciji 10 g/L v gojišču. Ker lahko bakterija *V. ruber* v citoplazmi kopiči velike količine prolina (Slika 5), ki presegajo potrebe centralnega metabolizma, se del teh molekul lahko preusmeri v sekundarni metabolizem. Kot kažejo rezultati (Slika 4), prolin očitno poveča sintezo prodigiozina, ne glede na to, ali smo bakterijo *V. ruber* gojili pri optimalni ali neoptimalnih slanostih. Pri optimalni in visoki slanosti doseže proizvodnja prodigiozina nasičenje že pri relativno nizkih koncentracijah dodanega prolina (2,5 g/l). Ker nadaljnje zviševanje količine prolina v gojišču, kot tudi v sami celici, ni imelo več značilnega vpliva na količino sintetiziranega prodigiozina v celici to kaže, da je sinteza pigmenta najverjetneje limitirana z drugimi dejavniki. Zanimivo je, da dodatek prolina v gojišče ni imel praktično nobenega vpliva na rast celic pri 10 % (w/V) NaCl (Slika 6). Sinteza kompatibilnih topljencev ali osmolitov je za celice energetsko izredno potraten proces, ki je zlasti pomemben pri povišani slanosti, zato bi pri teh pogojih pričakovali povečan prirast biomase v gojišču. Očitno rast pri teh slanostih primarno omejujejo drugi mehanizmi in ne sinteza kompatibilnih topljencev kot je prolin. Po drugi strani vidimo zelo očitno vpliv dodatka prolina, tako na sintezo prodigiozina (Slika 4) kot tudi na prirast celične biomase pri znižani slanosti (Slika 6). Zlasti je sinteza pigmenta pri teh pogojih zelo odvisna od dodatka prolina v gojišče. Tudi pri najvišjih koncentracijah dodanega prolina ni prišlo do nasičenja sinteze prodigiozina. Dodani prolin v tem primeru ni opravljal funkcije kompatibilnega topljenca. Povečana rast je bila zelo verjetno posledica dodanega ogljika in dušika v prolinu. Del dodanega ogljika in dušika je verjetno prispeval tudi k produkciji pigmenta. Podoben asimetričen odziv bakterije *V. ruber* na povišane in znižane slanosti je pokazala že predhodna študija, kjer so proučevali vpliv slanosti na metabolizem ogljika (Danevčič in Stopar, 2011).

Tok energije v celici, ki se sooča s stresnimi razmerami preusmerjajo številni mehanizmi, ki lahko vplivajo tudi na sekundarni metabolizem. Znano je, da se pri znižani slanosti poveča neto količina ATP v celici, zniža se glikolitična aktivnost, spremeni se struktura membrane in njen redukcijski potencial (Danevčič in Stopar, 2011). Slanost vpliva tudi na topnost kisika v gojišču, ki pomembno vpliva tako na rast kot na sekundarni metabolizem (Heinemann in sod., 1970). Pri bakterijskih celicah *S. marcescens*, ki so bile inkubirane na stresalniku, je bila stimulacija produkcije štirikrat večja kot v stacionarni kulturi.

Pigmentacijo je bilo v tem primeru zaznati tudi veliko hitreje (14 ur prej), kot če celična suspenzija ni bila inkubirana na stresalniku (Qadri in Williams, 1972).

## 5.2 SKLEPI

- Bakterijska celica *V. ruber* lahko kopiči zunajcelično dodan prolin in učinkovitost kopičenja prolina se z višanjem koncentracije NaCl v gojišču večja.
- Proizvodnja prodigiozina v bakterijskih celicah *V. ruber* je odvisna od zunajcelično dodanega prolina, pri višjih slanostih pride do nasičenja prodigiozina v celicah *V. ruber*.
- Bakterijske celice asimetrično odreagirajo na dodatek prolina v gojišče pri visoki in nizki slanosti; zunajcelično dodan prolin je znatno povečal rast celic in tvorbo prodigiozina pri nizkih slanostih, z višanjem slanosti se je vpliv prolina nakopičenega v celici, na rast celic in tvorbo pigmenta, progresivno zmanjševal.

## 6 POVZETEK

Številne bakterije, ki živijo v morskih ekosistemih, tvorijo sekundarne metabolite. Ker se v njihovem naravnem okolju fizikalni in kemijski pogoji nenehno spreminjajo, jim lahko ti produkti zagotovijo kompeticijsko prednost pred ostalimi mikroorganizmi v izbrani ekološki niši. Rdeč pigment prodigiozin, ki ga producira bakterijski sev *V. ruber* DSM 14379, je znan sekundarni metabolit, z mnogimi ekofiziološkimi učinki. Pomaga pri disperziji bakterij v zraku, predstavlja metabolni ponor za NADPH ali prolin, omogoča shranjevanje sončne energije, učinkuje protimikrobno na sorodne in nesorodne bakterijske vrste. Bakterija ga sintetizira v ozkem pasu ekofizioloških pogojev, ki so značilni za določen bakterijski sev. Vpliv nekaterih okoljskih pogojev, kot so pH, temperatura, slanost in vir hranil, na produkcijo tega pigmenta je bil v preteklih študijah precej dobro opisan. Slabše je poznano, kako na biosintezo pigmenta vpliva dostopnost prekurzorjev.

V tem diplomskem delu smo preverili vpliv dodatka prolina, ki je eden ključnih prekurzorjev za biosintezo prodigiozina, na produkcijo pigmenta. V ta namen smo merili količino pigmenta v celicah pri različnih, za njegovo rast ugodnih in neugodnih razmerah. Vzporedno smo spremljali tudi prirast biomase ter količino znotrajceličnega prolina normiranega na celično maso. Rezultati kažejo, da se količina prodigiozina poveča z dodatkom prolina v gojišče, ne glede na to, ali bakterija *V. ruber* raste pri 3 % (w/V) NaCl, ki je optimalna za njegovo biosintezo ali pri 0,5 % oziroma 10 % slanosti, ki predstavlja za celice *V. ruber* velik osmotski stres. Zlasti očitno je dodatek prolina povečal koncentracijo pigmenta pri nizki slanosti. Ne glede na pozitiven učinek dodatka prolina na produkcijo prodigiozina je bila še vedno največja produkcija pri optimalni slanosti za rast bakterije *V. ruber*. Prolin, ki smo ga dodali celicam *V. ruber*, ima vlogo prekurzorja prodigiozina in obenem vlogo osmolita, ki ga celice kopičijo kot odgovor na povišan osmotski stres. Pričakovano je dodatek prolina v gojišče najbolj vplival na kopičenje prolina v celicah pri najvišji slanosti, medtem ko je bil učinek dodanega prolina pri optimalni in nizki slanosti primerljiv in se je koncentracija prolina v celici v obeh primerih povečala. Prirast biomase je bil pri različnih slanostih in dodatkih prolina v gojišče različen. Več dodanega prolina pri nižjih slanostih je pozitivno vplivalo na prirast biomase. Z večanjem koncentracije soli v gojišču je bil učinek dodatka prolina progresivno manjši. Pri najvišji uporabljeni slanosti značilnega vpliva dodatka prolina na prirast biomase nismo več zaznali.

Rezultati kažejo, da ima tako koncentracija soli kot dodatek prolina v gojišče vpliv na produkcijo prodigiozina pri bakteriji *V. ruber*. Glede na dobljene rezultate smo potrdili postavljene hipoteze. Dodani prolin pozitivno vpliva na rast pri nizkih slanostih. Kljub temu, da se dodani prolin najbolj učinkovito nakopiči pri visoki slanosti to ni dovolj, da bi celice uspele ohranjati visoke priraste biomase. Predpostavka, da bo prirast biomase na

račun dodanega osmoprotektanta prolina v gojišče pri povišani slanosti boljši, ni bila potrjena.

## 7 VIRI

- Allen G. R., Reichelt J. L., Gray P. P. 1983. Influence of environmental factors and medium composition on *Vibrio gazogenes* growth and prodigiosin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 6: 1727-1732.
- Austin D. A., Moss M. O. 1986. Numerical taxonomy of red pigmented bacteria isolated from a lowland river, with the bacteria isolated from a lowland river, with the description of a new taxon, *Rugamonas rubra* gen. nov., sp. nov. *Journal of General Microbiology*, 132: 1899-1909.
- Babitha S., Sandhya C., Pandey A. 2004. Natural food colorants. *Applied Botany Abstracts*, 23, 4: 258-266.
- Bennett J. W., Bentley R. 2000. Seeing red: the story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, 47: 1-32.
- Borić M., Danevčič T., Stopar D. 2011. Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379: a new UV-protective pigment. *Microbial Ecology*, 62: 528-536.
- Borić M., Danevčič T., Stopar D. 2012. Viscosity dictates metabolic activity of *Vibrio ruber*. *Frontiers in Microbiology*, 3: 255, doi: 10.3389/fmicb.2012.00255: 12 str.
- Campas C., Dalmau M., Montaner B., Barragan M., Bellosillo B., Colomer D. 2003. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17: 746-750.
- Cang S., Sanada M., Johdo O., Ohta S., Nagamatsu Y., Yoshimoto A. 2000. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnology Letters* 22, 22: 1761-1765.
- Carvalho J. C., Pandey A., Babitha S., Soccol C. R. 2003. Production of Monascus biopigments. *Agro Food Industry Hi-tech*, 14: 37-42.
- Choudhary N. L., Sairam R. K., Tyagi A., 2005. Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42: 366-370.
- Csonka L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53, 1: 121-147.

- Danevčič T., Borić Vezjak M., Tabor M., Zorec M., Stopar D. 2016. Prodigiosin induces autolysins in actively grown *Bacillus subtilis* cells. *Frontiers in Microbiology*, 7: doi: 10.3389/fmicb.2016.00027: 10 str.
- Danevčič T., Rilfors L., Štancar J., Lindblom G., Stopar D. 2005. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM 14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochemica et Biophysica Acta, Biomembranes*, 1712: 1-8.
- Danevčič T., Stopar D. 2009. Environmental quality determines physiological behaviour of bacteria. V: *Handbook of environmental quality*. Drury E. K., Pridgen T. S. (eds.). New York, Nova Science Publishers: 349-364.
- Danevčič T., Stopar D. 2011. Asymmetric response of carbon metabolism at high and low salt stress in *Vibrio* sp. DSM 14379. *Microbial Ecology*, 62: 198-204.
- Daoust J. Y., Gerber N. N. 1974. Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus*. *Journal of Bacteriology*, 118: 756-757.
- de Carvalho C. C. C. R., Fernandes P. 2010. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Marine Drugs*, 8: 705-727.
- Demain A. L. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *International Microbiology*, 1: 259-264.
- Dufosse L. 2009. Pigments, microbial. V: *Encyclopedia of microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Schaechter M. (ed.) Amsterdam, Elsevier: 457-471.
- Farrell J., Rose A. 1967. Temperature effects on microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 21: 101-120.
- Fujikawa H., Akimoto R. 2011. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1: 172-178.
- Galinski E. A., Trüper H. G. 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *Microbiological Reviews*, 15: 95-108.
- Gerber N. N. 1975. Prodigiosin-like pigments, *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 3: 469-485.



- Giri A. V., Anandkumar N., Muthukumaran G., Pennathur G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4: 11, doi: 10.1186/1471-2180-4-11: 10 str.
- Griffiths M., Sistrof W., Cohen-Bazire G., Steiner R. Y. 1955. Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature*, 176: 1211-1214.
- Haavik H. I., Froyshov O. 1982. On the role of L-leucine in the control of bacitracin formation by *Bacillus licheniformis*. V: Peptide antibiotics: biosynthesis and functions. Kleinkauf H., van Dohren H. (eds.). Berlin, Walter de Gruyter: 155-159.
- Haddix P. L., Jones S., Patel P., Burnham S., Knights K., Powell J. N., LaForm A. 2008. Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggest an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 190, 22: 7453-7463.
- Hamann M. T. 2004. Technology evaluation: Kahalalide F, PharmaMar. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 6: 657-665.
- Han S. B., Park S. H., Jeon Y. J., Kim Y. K., Kim H. M., Yang K. H. 2001. Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin - 2R $\alpha$  expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen induced arthritis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299: 415-425.
- Harwood, C. S. 1978. *Beneckeia gazogenes* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium. *Current Microbiology*, 1: 233-238.
- Heinemann, B., Howard A. J., Palocz H. J. 1970. Influence of dissolved oxygen levels on production of L-asparaginase and prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Applied microbiology*, 19, 5: 800-804.
- Hider R. C., Kong X.L. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Products Reports*, 27: 637-657.
- Hill R. T., Hamann M. T., Enticknap J.J., Rao K. V. 2005. Kahalalide-producing bacteria. United States Patent: PCT/US2004/036201: 2 str.  
<http://www.wipo.int/patentscope/search/en/WO2005042720> (avgust 2016)
- Hobbs D. K., Wales D. S. 1998. Green colorants. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 114: 42- 44.

- Hood D. W., Heidstra R., Swoboda U. K., Hodgson D. A. 1992. Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism. *Gene*, 115: 5-12.
- Imamura N., Adachi K., Sano H. M., Agnesidin A. 1994. A component of marine antibiotic magnesidin, produced by *Vibrio gazogenes* ATCC 29988. *Journal of Antibiotics*, 47: 257-261.
- Jalal M. A. F., Hossain M. B., Vanderhelm D., Sandersloehr J., Actis L. A., Crosa J. H. 1989. Structure of anguibactin, a unique plasmid-related bacterial siderophore from the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of American Chemical Society*, 111: 292-296.
- Kawaguchi T., Azuma M., Horinouchi S., Beppu T. 1988. Effect of B-factor and its analogues on rifamycin biosynthesis in *Nocardia* sp. *Journal of Antibiotics*, 41: 360-365.
- Khanafari A., Asadi M. M., Fakhr F. A. 2006. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 6, 1: doi: 10.3844/ojbsci.2006: 13 str.
- Konzen M., De marco D., Cordova C. A. S., Vieira T. O., Antonio R. V., Creczynski-Pasa T.B. 2006. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14: 8307-8313.
- Kim D., Lee J. S., Park Y. K., Kim J. F., Jeong H., Oh T. K., Kim B. S., Lee C. H. 2007. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 937-944.
- Kobayashi N., Ichikawa Y. 1985. Decrease in respiration activity related to prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens*. *Microbiology and Immunology*, 29: 301-308.
- Krupinski V. M., Robbers J. E., Floss, H. G. 1976. Physiological study of ergot: induction of alkaloid synthesis by tryptophan at the enzymatic level. *Journal of Bacteriology*, 125: 158-165.
- Kumar N. R., Nair S. 2007. *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a red-pigmented bacterium that antagonizes phytopathogenic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2241-2246.

- Lee M. J., Jeong D. Y., Kim W. S., Kim H. D., Kim C. H., Park W. W., Park Y. H., Kim K. S., Kim H. M., Kim D.S. 2000. A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1698-1701.
- Leon L. L., Miranda C. C., De Souza A. O., Duran N. 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 3: 449-450.
- Llagostera E., Soto-Cerrato V., Joshi R., Montaner B., Gimenez-Bonafe P., Perez Tomas R. 2005. High cytotoxic sensitivity of the human small cell lung doxorubicin resistant carcinoma (GLC4/ADR) cell line to prodigiosin through apoptosis activation. *Anticancer Drugs*, 16: 393-399.
- MacLeod R. A. 1965. The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriological Reviews*, 29: 9-20.
- Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11<sup>th</sup> ed. New Jersey, Practice Hall International: 992 str.
- Manson M., Gram L., Larsen T. O. 2011. Production of bioactive metabolites by marine *Vibrionaceae*. *Marine Drugs*, 9: 1440-1468.
- Margalith P. Z. 1992. Pigment microbiology. 1<sup>st</sup> ed. London, Chapman & Hall: 156 str.
- McIntyre J. J., Bull A. T., Bunch A. W. 1996. Vancomycin production in batch and continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 412-420.
- Oclarit J. M., Okada H., Ohta S., Kaminura K., Yamaoka Y., Iizuka T., Miyashiro S., Ikegami S. 1994. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios*, 78: 7-16.
- Odić D., Budič B., Mandić-Mulec I., Stopar, D. 2010, Influence of bacterial lysate quality on growth of two bacterioplankton species. *Microbial Ecology*, 59: 246-252.
- Odić D., Turk V., Stopar D. 2007. Environmental stress determines the quality of bacterial lysate and its utilization efficiency in simple microbial loop. *Microbial Ecology*, 53: 639-649.
- Oliva B., O'Neill A., Wilson J. M., O'Hanlon P. J., Chopra I. 2001. Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 532-539.

- Pandey R., Chander R., Sainis K. B. 2007. Prodigiosins: a novel family of immunosuppressants with anticancer activity. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 44: 295-302.
- Pohlmann J., Lampe T., Shimada M., Nell P. G., Pernerstorfer J., Svenstrup N., Brunner N. A., Schiffer G., Freiberg C. 2005. Pyrrolidinedione derivatives as antibacterial agents with a novel mode of action. *Bioorganics & Medicinal Chemistry Letters*, 15: 1189-1192.
- Qadri S. M. H., Williams R. P. 1972. Induction of prodigiosin biosynthesis after shift-down in temperature of nonproliferating cells of *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*, 23: 704-709.
- Riemann L., Azam F. 2002. Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5554-5562.
- Reichelt J. L., Baumann P. 1974. Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria. *Archives of Microbiology*, 97: 329-345.
- Rius N., Maeda K., Demain A. 1996. Induction of L-lysine  $\epsilon$ -aminotransferase by L-lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins. *FEMS Microbiology Letters*, 144: 207-211.
- Ruffing A., Chen R. R. 2006. Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. *Microbial Cell Factories*, 5: 25-33.
- Sandy M., Han A., Blunt J., Munro M., Haygood M., Butler A. 2010. Vanchrobactin and anguibactin siderophores produced by *Vibrio* sp. DS40M4. *Journal of Natural Products*, 73: 1038-1043.
- Sato T., Konno H., Tanaka Y., Kataoka T., Nagai K., Wasserman H. H., Ohkuma S. 1998. Prodigiosins as a new group of H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporters that uncouple proton translocators. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 34: 21455-21462.
- Scott R. H., Qadri S. M., Williams R. P. 1976. Role of L-Proline in the biosynthesis of prodigiosin. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 561-566.
- Shieh W. Y., Chen Y. W., Chaw S. M., Chiu H. H. 2003. *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 479-484.

- Someya N., Nakajima M., Hirayae K., Hibi T., Akutsu K. 2001. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 67: 312-317.
- Stanković N., Radulović V., Petković M., Vučković I., Jadranin M., Vasiljević B., Nikodinović-Runić J. 2012. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 1217-1231.
- Starič N., Danevčič T., Stopar D. 2010. *Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production—a competitive advantage in the environment? *Microbial Ecology*, 60: 592–598.
- Stopar D., Černe A., Zigman M., Poljšak-Prijatelj M., Turk V. 2004. Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. *Microbial Ecology*, 47: 1-8.
- Syzdek L. D. 1985. Influence of *Serratia marcescens* pigmentation on cell concentrations in aerosols produced by bursting bubbles. *Applied Environmental Microbiology*, 49: 173-178.
- Thompson F. L., Iida T., Swings J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 403-431.
- Venil C. K., Lakshmanaperumasamy P. 2009. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*, 5, 3: 49-61.  
<http://ejbio.imedpub.com/an-insightful-overview-on-microbial-pigment-prodigiosin.pdf>
- Venil C. K., Zakaria Z. A., Ahmad W. A. 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48: 1065-1079.
- Vining L. C. 1990. Functions of secondary metabolites. *Annual Review of Microbiology*, 44: 395-427.
- Wietz M., Mansson M., Gram L. 2011. Chitin stimulates production of the antibiotic andrimid in a *Vibrio coralliilyticus* strain. *Environmental Microbiology Reports*, 3: 559-564.
- Williamson N. R., Fineran P. C., Gristwood T., Chawrai S. R., Leeper F. J., Salmond G. P. C. 2007. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiology*, 2, 6: 605-618.

- Williamson N. R., Fineran P. C., Leeper F. J., Salmond G. P. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 887-899.
- Williams R. P., Gott, C. L., Qadri, S. M., Scott R. H. 1971. Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 106, 2: 438-443.
- Williams R. P., Qadri S. M. 1980. The pigments of *Serratia*. V: The genus *Serratia*. (Von Graevenitz A., Rubin S. J. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 31-75.
- Williams R. P., Scott R. H., Lim D. V., Qadri S. M. 1976. Macromolecular syntheses during biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 31: 70-77.
- Wood J. M. 1988. Proline porters effect the utilization of proline as nutrient or osmoprotector for bacteria. *Journal of Membrane Biology*, 106: 183-202.
- Zhang J., Banko G., Wolfe S., Demain A. L. 1987. Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *Journal of Industrial Microbiology*, 2: 251-255.

## ZAHVALA

Mentorju, **prof. dr. Davidu Stoparju**, za številne koristne nasvete, nenehne spodbude, usmerjanje ter odkrivanje vedno novih poti do razumevanja in povezovanja ključnih strokovnih informacij.

Somentorici **doc. dr. Tjaši Danevčič** za pomoč pri načrtovanju in izvedbi eksperimentalnega dela diplomske naloge, temeljite strokovne popravke, konstruktivne pripombe in celovit vpogled v področje raziskovalnega dela.

Hvala obema za potrpežljivost, dostopnost in hitro odzivnost, ter prijeten pristop k vzajemnemu reševanju problemov, s katerimi sem se soočal tekom nastajanja diplomskega dela.

**Doc. dr. Mateju Butali** za temeljito recenzijo in osvetlitev nekaterih konceptov diplomskega dela z nove perspektive.

Staršema, **Meliti in Davorinu**, ter starima staršema, **Jožefu in Jožici**, ki so mi omogočili študij in me na tej poti nesebično podpirali tudi v »težkih«  
trenutkih.

Sestrama, **Alji in Tjaši**, za veliko pozitivne energije in srčnosti, ki me je hranila z optimizmom.

Punci **Ireni**, ki na izviren način iz mene vedno izvabi najboljše, je moj najstrožji kritik in navdih hkrati, ter njeni družini, ki je v mnogih pogledih soodgovorna za moj uspešen zaključek študija.

Najlepša hvala vsem!

## PRILOGE

**Priloga A1:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina v gojišču PKS na koncentracijo prolina v celicah *V. ruber* DSM 14379 pri 0,5 % (w/V) NaCl. Bakterijsko kulturo smo gojili 16 h pri temperaturi 28 °C v temi na stresalniku pri 200 rpm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Koncentracija prolina v celicah (mg/g suhe celične mase) | Standardni odklon |
|--|--|-------------------|
| 0  | 0,8  | 0,2               |
| 2,5  | 7,6  | 2,5               |
| 5  | 35,4   | 2,1               |
| 12,5   | 113,9  | 17,3              |
| 20   | 181,4  | 15,1              |

**Priloga A2:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina v gojišču PKS na koncentracijo prolina v celicah *V. ruber* DSM 14379 pri 3 % (w/V) NaCl. Bakterijsko kulturo smo gojili 16 h pri temperaturi 28 °C v temi na stresalniku pri 200 rpm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Koncentracija prolina v celicah (mg/g suhe celične mase) | Standardni odklon |
|--|--|-------------------|
| 0  | 0,1  | 0,2               |
| 1  | 2,4  | 1,4               |
| 2,5  | 44,3   | 16,3              |
| 5  | 78,7   | 5,8               |
| 12,5   | 136,8  | 16,8              |
| 20   | 195,3  | 87,4              |
| 25   | 332,7  | 54,4              |

**Priloga A3:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina v gojišču PKS na koncentracijo prolina v celicah *V. ruber* DSM 14379 pri 10 % (w/V) NaCl. Bakterijsko kulturo smo gojili 16 h pri temperaturi 28 °C v temi na stresalniku pri 200 rpm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Koncentracija prolina v celicah (mg/g suhe celične mase) | Standardni odklon |
|--|--|-------------------|
| 0  | 7,59   | 3,11              |
| 2,5  | 61,05  | 26,71             |
| 5  | 141,29   | 9,81              |
| 12,5   | 291,77   | 18,41             |
| 20   | 460,17   | 13,33             |



**Priloga B1:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina na količino rdečega pigmenta prodigiozina v bakterijskih celicah *V. ruber* DSM 14379 pri 0,5 % NaCl (w/V). Bakterijsko kulturo smo gojili 16 ur pri temperaturi 28 °C na rotacijskem stresalniku (200 rpm) v gojišču PKS. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Koncentracija pigmenta (mg/g suhe celične mase) | Standardni odklon |
|--|---|-------------------|
| 0  | 20,4  | 1,7               |
| 2,5  | 50,0  | 3,0               |
| 5  | 82,4  | 2,2               |
| 12,5   | 96,6  | 0,3               |
| 20   | 104,3   | 4,0               |

**Priloga B2:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina na količino rdečega pigmenta prodigiozina v bakterijskih celicah *V. ruber* DSM 14379 pri 3 % NaCl (w/V). Bakterijsko kulturo smo gojili 16 ur pri temperaturi 28 °C na rotacijskem stresalniku (200 rpm) v gojišču PKS. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Koncentracija pigmenta (mg/g suhe celične mase) | Standardni odklon |
|--|---|-------------------|
| 0  | 66,8  | 5,9               |
| 1  | 99,9  | 14,1              |
| 2,5  | 118,5   | 21,9              |
| 5  | 115,8   | 4,4               |
| 12,5   | 111,9   | 23,1              |
| 20   | 112,2   | 16,3              |
| 25   | 116,3   | 15,7              |

**Priloga B3:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina na količino rdečega pigmenta prodigiozina v bakterijskih celicah *V. ruber* DSM 14379 pri 10 % NaCl (w/V). Bakterijsko kulturo smo gojili 16 ur pri temperaturi 28 °C na rotacijskem stresalniku (200 rpm) v gojišču PKS. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Koncentracija pigmenta (mg/g suhe celične mase) | Standardni odklon |
|--|---|-------------------|
| 0  | 11,4  | 1,6               |
| 2,5  | 40,8  | 4,1               |
| 5  | 40,1  | 3,6               |
| 12,5   | 36,7  | 1,4               |
| 20   | 37,9  | 1,5               |

**Priloga C1:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina v gojišču PKS na prirast biomase *V. ruber* DSM 14379 pri 0,5 % (w/V) NaCl. Bakterijsko kulturo smo gojili 16 h pri temperaturi 28 °C na stresalniku pri 200 rpm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Količina biomase (g) | Standardni odklon |
|--|----------------------|-------------------|
| 0  | 0,026                | 0,002             |
| 2,5  | 0,046                | 0,001             |
| 5  | 0,036                | 0,001             |
| 12,5   | 0,039                | 0,002             |
| 20   | 0,038                | 0,002             |

**Priloga C2:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina v gojišču PKS na prirast biomase *V. ruber* DSM 14379 pri 3 % (w/V) NaCl. Bakterijsko kulturo smo gojili 16 h pri temperaturi 28 °C na stresalniku pri 200 rpm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Količina biomase (g) | Standardni odklon |
|--|----------------------|-------------------|
| 0  | 0,024                | 0,001             |
| 2,5  | 0,030                | 0,003             |
| 5  | 0,028                | 0,001             |
| 12,5   | 0,034                | 0,0002            |
| 20   | 0,028                | 0,001             |

**Priloga C3:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina v gojišču PKS na prirast biomase *V. ruber* DSM 14379 pri 6,5 % (w/V) NaCl. Bakterijsko kulturo smo gojili 16 h pri temperaturi 28 °C na stresalniku pri 200 rpm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Količina biomase (g) | Standardni odklon |
|--|----------------------|-------------------|
| 0  | 0,017                | 0,001             |
| 2,5  | 0,021                | 0,002             |
| 5  | 0,020                | 0,002             |
| 12,5   | 0,019                | 0,001             |
| 20   | 0,019                | 0,0001            |

**Priloga C4:** Vpliv različnih koncentracij dodanega prolina v gojišču PKS na prirast biomase *V. ruber* DSM 14379 pri 10 % (w/V) NaCl. Bakterijsko kulturo smo gojili 16 h pri temperaturi 28 °C na stresalniku pri 200 rpm. Povprečne vrednosti in standardni odkloni so izračunani iz treh neodvisnih gojenj bakterijske kulture.

| Koncentracija dodanega prolina v gojišču (g/L) | Količina biomase (g) | Standardni odklon |
|--|----------------------|-------------------|
| 0  | 0,011                | 0,002             |
| 2,5  | 0,018                | 0,0004            |
| 5  | 0,012                | 0,001             |
| 12,5   | 0,011                | 0,001             |
| 20   | 0,011                | 0,0004            |