

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Kaja ŠKAPIN

**VPLIV IZBRANIH VIROV DUŠIKA IN FOSFORJA NA PRODUKCIJO
FK506 PRI SEVU *Streptomyces tsukubaensis***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF THE SELECTED SOURCES OF NITROGEN AND
PHOSPHATE ON THE PRODUCTION OF FK506 BY *Streptomyces
tsukubaensis***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Hrvoje Petković, za recenzentko pa prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Mentor: doc. dr. Hrvoje Petković

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
zootehniko

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Kaja Škapin se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Kaja Škapin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 604.4: 615.332: 579.222: 579.873.7 (043) = 163.6
- KG *Streptomyces tsukubaensis*/ sekundarni metaboliti/ poliketidi/ FK506/ takrolimus/ optimizacija gojišča/
- AV ŠKAPIN, Kaja
- SA PETKOVIĆ, Hrvoje (mentor)/ MANDIĆ MULEC, Ines (recenzentka)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2012
- IN VPLIV IZBRANIH VIROV DUŠIKA IN FOSFORJA NA PRODUKCIJO FK506 PRI SEVU *Streptomyces tsukubaensis*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XII, 60 str., 16 pregl., 18 sl., 8 pril., 50 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Gojišča, ki se uporabljajo v industriji, so zaradi viskoznosti in vsebnosti netopnih delcev pogosto neprimerna za transkripcijske študije. Zato smo v diplomskem delu, kjer smo se ukvarjali z biosintezo FK506 (takrolimus) s pomočjo mikroorganizma *Streptomyces tsukubaensis* (NRRL 18488), poskušali optimizirati kemijsko definirano gojišče, ki bo vsebovalo popolnoma topne surovine in bo hkrati še vedno omogočalo zadovoljive donose imunosupresorja FK506. Prvi del poskusa je zajemal gojitev seva v industrijskem gojišču, s katerim smo preverili produkcijo FK506 v kompleksnemu gojišču. V drugem delu poskusa smo optimizirali vir dušika in fosforja v začetnem definiranemu produkcijskem gojišču (DPG). Kot vir dušika smo uporabili amonijev sulfat, kot vir fosforja pa puferski sistem kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) in dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4). Bioproces smo vodili v erlenmajerjevih steklenicah na stresalniku 6 dni pri 28 °C in 220 rpm. Po končani kultivaciji smo s pomočjo metode HPLC določili vsebnost FK506. Ugotovili smo, da dvig koncentracije amonijevega sulfata ne spodbuja produkcije FK506 in nima večjega vpliva na tvorbo biomase. Po drugi strani pa dodatek fosfatnih ionov močno spodbudi tako rast, kot tudi produkcijo FK506. Najboljšo produkcijo FK506, ki znaša 11,2 mg/L, smo zaznali pri koncentraciji 10,5 mmol/L fosfatnih ionov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 604.4: 615.332: 579.222: 579.873.7 (043) = 163.6
- CX *Streptomyces tsukubaensis*/ secondary metabolites/ polyketide/ FK506/ tacrolimus/
medium optimisation/
- AU ŠKAPIN, Kaja
- AA PETKOVIĆ, Hrvoje (supervisor)/ MANDIĆ MULEC, Ines (reviewer)
- PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
- PY 2012
- TI INFLUENCE OF THE SELECTED SOURCES OF NITROGEN AND
PHOSPHATE ON THE PRODUCTION OF FK506 BY *Streptomyces tsukubaensis*
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XII, 60 p., 16 tab., 18 fig., 8 ann., 50 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Industry-used media are often inappropriate for transcriptional studies due to viscosity and the presence of insoluble particles. Therefore, the aim of this work was to optimize a chemically defined medium, which would contain completely soluble media components and would simultaneously ensure satisfactory yields of the immunosuppressant FK506 (tacrolimus). We used microorganism *Streptomyces tsukubaensis* (NRRL 18488) for the purpose of this study. The first part of the experiment consisted cultivation of the strain in the complex industrial medium. This allowed us to test the production of FK506 in a complex medium. In the second part of the experiment, we attempted to increase FK506 yield in the starting minimal production medium (DPG) by re-optimizing different selected sources of nitrogen and phosphorus. Ammonium sulphate was used as a source of nitrogen and for source of phosphate we used buffer system of potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) and dipotassium hydrogen phosphate (K₂HPO₄). The bioprocess was carried out on the shaker at 220 rpm in an Erlenmayer flasks for 6 days at 28 °C. The yield of FK506 was measured using HPLC method. Based on our results, we can conclude that addition of ammonium sulfate to the DPG medium does not increase production of FK506 and has no significant impact on the biomass formation. On the other hand, addition of phosphate ions significantly stimulates both growth and production of FK506. The highest yield of FK506 (11,2 mg/L) was achieved when phosphate ions concentration reached around 10,5 mmol/L.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK.....	XII
1 UVOD	1
1.1 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Streptomyces</i>	3
2.1.1 Taksonomija bakterij rodu <i>Streptomyces</i>	3
2.1.2 Življenjski krog bakterij rodu <i>Streptomyces</i>	3
2.1.3 Genom bakterij rodu <i>Streptomyces</i>	5
2.1.4 Ekologija bakterij rodu <i>Streptomyces</i>	5
2.2 FIZIOLOGIJA BAKTERIJ RODU <i>Streptomyces</i>	7
2.2.1 Viri ogljika in regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov	7
2.2.2 Viri dušika in regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov	8
2.2.3 Viri fosforja in regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov	10
2.2.4 Morfološka diferenciacija in produkcija sekundarnih metabolitov	11
2.3 SEKUNDARNI METABOLITI.....	12
2.3.1 Regulacija sekundarnega metabolizma pri bakterijah rodu <i>Streptomyces</i>	13
2.3.2 Značilnosti sekundarnih metabolitov	15
2.3.3 Sekundarni metaboliti iz skupine poliketidov	15
2.3.4 Razdelitev poliketidnih sintaz glede na mehanizem biosinteze	17
2.3.5 Splošno o FK506 (takrolimus).....	18
2.3.6 Biosinteza FK506	19
2.3.7 Pomen FK506 v medicini	20

2.4	VPLIV SESTAVIN GOJIŠČA NA PRODUKCIJO FK506	22
2.4.1	Vpliv vira ogljika na biosintezo FK506	22
2.4.2	Vpliv vira dušika na biosintezo FK506.....	23
2.4.3	Vpliv vira fosforja na biosintezo FK506.....	23
3	MATERIALI IN METODE	25
3.1	SHEMA DELA	25
3.2	MATERIALI	26
3.2.1	Gojišča	26
3.2.2	Raztopine.....	30
3.2.3	Aparature	32
3.2.4	Steklovina in ostali potrošni material	33
3.3	METODE DELA	33
3.3.1	Priprava osnovne suspenzije spor <i>S. tsukubaensis</i>	33
3.3.2	Razvoj laboratorijskega bioprocasa	34
3.3.3	Priprava gojišč	34
3.3.4	Določanje vsebnosti FK506.....	35
3.3.5	Določanje bioprocenih parametrov	35
3.3.6	Določanje vsebnosti FK506 s pomočjo metode HPLC	36
3.3.7	Statistična obdelava	36
4	REZULTATI.....	37
4.1	PRODUKCIJA FK506 V KOMPLESNEM GOJIŠČU	37
4.2	VPLIV DUŠIKA NA PRODUKCIJO FK506	39
4.2.1	Produkcija FK506 z izbranim virom dušika.....	39
4.2.2	Vpliv izbranega vira dušika na tvorbo biomase	40
4.2.3	Regulacija pH vrednosti gojišča z uporabo puferskega sistema	42
4.3	VPLIV FOSFORJA NA PRODUKCIJO FK506	44
4.3.1	Produkcija FK506 z izbranim virom fosforja.....	44
4.3.2	Vpliv koncentracije fosfatnega iona na tvorbo biomase	45
4.3.1	Regulacija pH vrednosti gojišča z uporabo puferskega sistema	47
5	RAZPRAVA.....	48
5.1	INDUSTRIJSKO GOJIŠČE	48

5.2	ZAMENJAVA KOMPLEKSNEGA VIRA DUŠIKA (SOJINE MOKE) Z AMONIJEVIM SULFATOM IN VPLIV KONCENTRACIJE AMONIJEVEGA SULFATA NA PRODUKCIJO FK506	49
5.3	VPLIV FOSFATNEGA IONA NA PRODUKCIJO FK506.....	50
6	SKLEPI	52
7	POVZETEK.....	53
8	VIRI	55

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Značilnosti primarnega in sekundarnega metabolizma mikroorganizmov (Hütter, 1986)	12
Preglednica 2: Sestava ISP4 gojišča - raztopina I	26
Preglednica 3: Sestava ISP4 gojišča - raztopina II	26
Preglednica 4: Sestava mineralne raztopine ISP4	26
Preglednica 5: Sestava 2TY gojišča	27
Preglednica 6: Sestava gojišča VG3	28
Preglednica 7: Sestava mineralne raztopine VG3	28
Preglednica 8: Sestava gojišča PG3	29
Preglednica 9: Sestava gojišča DVG	29
Preglednica 10: Sestava mineralne raztopine DVG	29
Preglednica 11: Sestava gojišča DPG	30
Preglednica 12: Sestava mineralne raztopine DPG	30
Preglednica 13: Volumen dodanega amonijevega sulfata glede na želeno koncentracijo	31
Preglednica 14: Volumen dodanega fosfatnega pufra glede na želeno koncentracijo	31
Preglednica 15: Rezultati parametrov bioprocesa vodenega v erlenmajerjevih steklenicah z industrijskim gojiščem (PG3)	38
Preglednica 16: HPLC rezultati bioprocesa vodenega v falkon kivetah z industrijskim gojiščem (PG3)	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Taksonomska opredelitev streptomycet (Madigan in sod., 2006)	3
Slika 2: Shema življenjskega kroga vrste <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) (Kieser in sod., 2000)	4
Slika 3: Asimilacija dušika (Wohlleben in sod., 2011)	9
Slika 4: Regulatorna kaskada A-faktorja pri <i>Streptomyces griseus</i> (Bibb, 2005)	11
Slika 5: Shematski prikaz encimske aktivnosti poliketid sintaz in nastajanja poliketidne verige (Baerson in Rimando, 2007)	16
Slika 6: Primer organiziranosti genskega zapisa oziroma organizacije proteinskih kompleksov vseh treh tipov PKS (Baerson in Rimando, 2007)	18
Slika 7: Struktura FK506 (Kino in sod., 1987a)	19
Slika 8: Pot biosinteze FK506 (Motamedi in Shafiee, 1998)	20
Slika 9: Kristalna struktura kompleksa obeh podenot kalcineruma ter kompleksa KFB12-FK506 (Klee in sod., 1998)	21
Slika 10: Shema eksperimentalnega dela v laboratoriju	25
Slika 11: Produkcija FK506 glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču	40
Slika 12: Vsebnost pmV (mokre biomase) glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču	41
Slika 13: Končna vsebnost suhe biomasa glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču	42
Slika 14: pH vrednost brozge z dodanim MOPS pri različnih koncentracijah amonijevega sulfata po 6. dnevih kultivacije	43
Slika 15: Produkcija FK506 glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču	45
Slika 16: Vsebnost mokre biomase (pmV) glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču	45
Slika 17: Končna vsebnost suhe biomase glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču	46
Slika 18: pH vrednost brozge z dodanim MOPS pri različnih koncentracijah fosfatnega iona po 6. dnevih kultivacije	47

KAZALO PRILOG

Priloga A: Produkcija FK506 glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

Priloga B: Končna mokra biomasa (pmV) glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

Priloga C: Končna suha biomasa glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

Priloga D: pH vrednost brozge z dodanim MOPS pri različnih koncentracijah amonijevega sulfata po 6. dnevih kultivacije

Priloga E: Produkcija FK506 glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

Priloga F: Končna mokra biomasa (pmV) glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

Priloga G: Končna suha biomasa glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

Priloga H: pH vrednost brozge z dodanim MOPS pri različnih koncentracijah fosfatnega iona po 6. dnevih kultivacije

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2TY = okrajšava za "triptone yeast extract media". Enostavno gojišče, ki se uporablja za namnoževanje bakterij.

actII-orf4 = specifični pozitivni regulator biosinteze antibiotika aktinorodina.

A-faktor = 2-izokapriolil-3R-hidroksimetil- γ -butirolakton.

ATCC = American Type Culture Collection.

ATP = adenzin trifosfat.

CoA = koencimomA.

DNK = deoksiribonukleinska kislina.

FAS = encim, ki sodeluje pri sintezi maščobnih kislin.

FK506 = imunosupresant, imenovan tudi tacrolimus.

GDH = glutamat-dehidrogenaza.

GOGAT = glutamat-2-oksoglutarat-transaminaza.

HPLC = visokotlačna tekočinska kromatografija.

Kbp = kilo bazni pari.

LAL družina = Large ATP-binding regulators of the LuxR family.

MOPS = 3-N-morpholine propanesulfonic acid, pufer, ki se uporablja za vzdrževanje konstantnega pH.

NRPS = neribosomska peptid sintaza.

PCR = verižna reakcija s polimerazo.

ppGpp = fosforiliran gvanin-nukleotid.

PKS = poliketid-sintaza.

RelA = ppGpp sintetaza.

SARP = regulatorni proteini antibiotikov streptomiket (*Streptomyces* antibiotic regulatory proteins).

SLOVARČEK

Definirano gojišče = gojišče, za katerega poznamo natančno kemijsko sestavo (tudi elemente v sledovih)

Imunosupresant = snov, ki zavira imunski odgovor z namenom preprečevanja zavračanja presajenih organov, oz. za nadzor nad avtoimunskimi boleznimi

Kompleksno gojišče = gojišče, ki vsebuje poleg definiranih komponent še naravne komponente, ki kemijsko niso definirane

Poliketidi = so sekundarni metaboliti bakterij, gliv, rastlin in živali. Sintetizirajo se preko kaskade dekarboksilacijskih kondenzacij krajših organskih kislin, ki se predhodno aktivirajo s koencimom A (CoA)

1 UVOD

Potreba po uspešnem presajanju organov se z dvigom življenjskega standarda in podaljševanjem življenjske dobe populacije bistveno povečuje. Že od prve uspešne presaditve organov, leta 1950 (Petechuk, 2006), poskušajo razviti spojine, ki bi preprečevale zavračanje organov, ob minimalnih stranskih učinkih. Z odkritjem ciklosporina leta 1966 (Heuslera in Pletscherb, 2001) so se v tej veji medicine odprle nove možnosti. Skoraj 20 let kasneje, 1984, so na Japonskem odkrili nov imunosupresor FK506 (tacrolimus), ki ga proizvaja *Streptomyces tsukubaensis*. Njegova aktivnost je v primerjavi s ciklosporinom bistveno višja, saj deluje pri 100x nižji koncentraciji (Kino in sod., 1987b). Danes se ga v medicini uporablja predvsem za preprečevanje zavračanja organov pri presaditvah jeter in ledvic. Uporablja se ga tudi za površinsko zdravljenje resnih imunsko povezanih kožnih boleznih, ki so povezane z imunskim sistemom (Bhuvana in sod., 2010; Kumar in sod., 2008).

Zdravilne učinkovine kot tudi druge sekundarne metabolite se v industriji proizvaja v bioreaktorjih. Ti lahko dosežajo volumne od 1 m³ pa tja do 500 m³ (Madigan in sod., 2006). Zato se mikroorganizem (v našem primeru *S. tsukubaensis*) najprej namnoži v manjših bioreaktorjih z vegetativnim gojiščem, dokler se ne doseže primeren volumen za inokulacijo produkcijskega gojišča (10 % v/v). Produkcijsko gojišče vsebuje težje razgradljive vire hranil, s katerimi se spodbudi sekundarni metabolizem. Ta gojišča, ki se uporabljajo v industriji, so viskozna, kompleksna, in vsebujejo večje število netopnih snovi, kar bistveno vpliva na dobljene rezultate s spektrofotometričnimi metodami ter metodami PCR v realnem času. Netopne komponente je težko ločiti od nastale biomase, kar otežuje meritve vsebnosti biomase in izolacijo kakovostne mRNA. Zaradi tega so industrijska gojišča, ki se uporabljajo za industrijsko proizvodnjo, pogosto neprimerna za študij kinetike rasti biomase, kot tudi za študij izražanja genov vpletenih v biosintezo FK506.

Poglavitni namen naloge je bil razviti in optimizirati kemijsko-definirano gojišče, ki bo vsebovalo popolnoma topne snovi, in bo hkrati še vedno omogočalo zadovoljive donose FK506 za potrebe študija izražanja genov vpletenih v biosintezo FK506.

1.1 DELOVNA HIPOTEZA

Kompleksna gojišča vsebujejo vir dušika in fosforja v obliki kompleksnih surovin, kot so npr. sojina moka in različni proteinski hidrolizati. V kolikor teh surovin v gojišču ni, je potrebno te nadomestiti z anorganskimi viri dušika in fosforja. Naša hipoteza je, da bo mogoče z zamenjavo nekaterih kompleksnih komponent gojišča z enostavnimi in v vodi popolnoma topnimi viri dušika in fosforja razviti gojišče, ki ne bo vsebovalo netopnih komponent in hkrati še vedno omogočalo zadovoljiv donos FK506.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Streptomyces*

2.1.1 Taksonomija bakterij rodu *Streptomyces*

Družino *Streptomycetaceae* ter rod *Streptomyces* so uvedli leta 1943, da bi uredili zmedo v debelu *Actinobacteria*, predvsem med aktinimomicetami. Od tedaj naprej so streptomicete opredelili kot po Gramu pozitivne bakterije z razvejanim, neseptiranim micelijem. Na zračnem miceliju tvori ovalne do cilindrične spore v verižicah, ki so endogene in so posledica segregacije protoplasta v sami hifi (Waksman in Henrici, 1943). Od ostalih filamentoznih aktinomicet se loči tudi po celični steni okarakterizirani kot tip I *sensu* (Lechevalier in Lechevalier, 1970), za katero je značilna LL-diaminopimelična kislina, glicin ter odsotnost karakterističnih sladkorjev. Na muraminskih ostankih je prisoten acetil (Uchida in Seino, 1997).

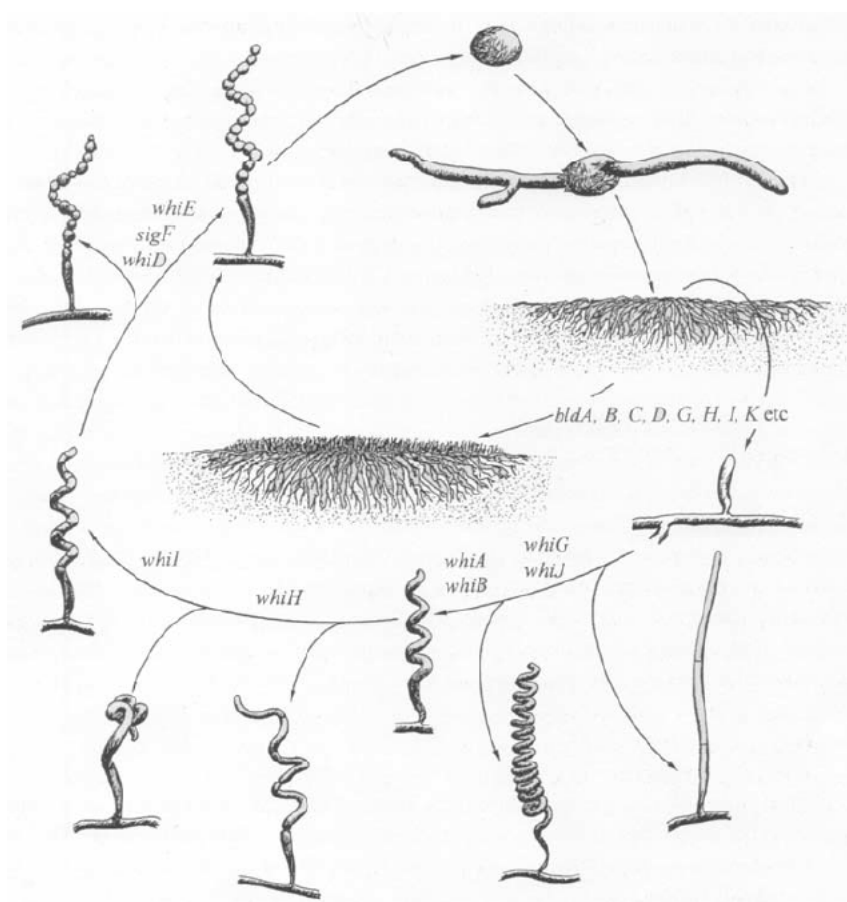
Domena:	BACTERIA
Deblo:	<i>Firmicutes</i>
Razred:	<i>Actinobacteria</i>
Podrazred:	<i>Actinobacteridae</i>
Red:	<i>Actinomycetales</i>
Podred:	<i>Streptomycineae</i>
Družina:	<i>Streptomycetaceae</i>
Rod:	<i>Streptomyces</i>

Slika 1: Taksonomska opredelitev streptomicet (Madigan in sod., 2006)

2.1.2 Življenjski krog bakterij rodu *Streptomyces*

Streptomicete imajo kompleksen življenjski krog (slika 2), kar je tudi vzrok za številne raziskave njihovega življenjskega cikla, morfoloških in fizioloških lastnosti (Kieser in sod., 2000). V ugodnih razmerah pričnejo iz spor izraščati hife, ki se razrastejo v micelij. Ta se med vegetativno fazo tako razveja, da nastaja kompleksen preplet matriksa, oz.

substratnega micelija. Filamenti v miceliju so običajno premera 0,5–1,0 μm , različno dolgi in jim pogosto manjka prečna stena. Rast opazamo na koncih filamentov. S staranjem kolonije, oz. z nastopom neugodnih razmer (pomanjkanje hranil), se prične proces sporulacije z izraščanjem zračnega micelija. Ta tvori značilne strukture, imenovane sporofori. Ti nastajajo nad površino kolonije in tvorijo spore - konidije. Spore nastajajo enostavno z oblikovanjem prečne stene v več jedrnih sporoforih, čemur sledi ločevanje posameznih celic naravnost v spore in te služijo predvsem v razmnoževalne namene. Elementi zračnega micelija se razlikujejo po obliki in ureditvi pri posameznih vrstah rodu *Streptomyces* ter so eden od bistvenih ključev za razvrščanje streptomicet v skupine. Konidiji in sporofori so pogosto pigmentirani, kar prispeva k značilni barvi zrele kolonije (Madigan in sod., 2006).



Slika 2: Shema življenjskega kroga vrste *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Kieser in sod., 2000)

Na sliki 2 je prikazan življenjski krog *Streptomyces coelicolor* A3(2), od kalitve spor in izraščanja hif ter do razraščanja micelija, pojava zračnega micelija, septacije ter nazadnje sprostitve spor. Na sliki so označeni pomembni regulatorni geni, ki sodelujejo v regulaciji diferenciacije. Stranske puščice kažejo na fenotipe mutiranih sevov, ki imajo okvarjene posamezne regulatorne gene (Kieser in sod., 2000).

2.1.3 Genom bakterij rodu *Streptomyces*

Genom streptomicet je pogosto linearen, z visokim deležem GC baznih parov. Teh je v povprečju 70-74 molskih % (Kieser in sod., 2000). V celoti je bil najprej sekvenciran genom modelnega organizma *Streptomyces coelicolor*. Velikost genoma je okoli 8,7 Mb. Glede na lokacijo genov ga lahko razdelimo na tako imenovano »jedro«, regijo veliko 4,9 Mb, in levo in desno »roko« velikosti 1,5 in 2,3 Mb. V »jedru« so identificirali predvsem gene, ki kodirajo za življenje pomembne proteine (replikacija, transkripcija, translacija), torej primarni metabolizem, na »rokah« pa so večinoma našli gene z adaptivno funkcijo (rast na kompleksnih ogljikovih hidratih). Gensko zaporedje vsebuje 23 genskih grozdov, kar predstavlja 4,5 % genoma, ki naj bi kodirali biosintetske encime za širok spekter sekundarnih metabolitov. Večina teh grozdov je lociranih na »rokah« genoma (Challis in Hopwood, 2003) **Error! Reference source not found.**

2.1.4 Ekologija bakterij rodu *Streptomyces*

Streptomicete v naravi najpogosteje najdemo kot prostoživeče saprofite na rastlinskem materialu in rizosferi, ki je tanka plast zemlje v stiku z rastlinskimi koreninami. To je v bistvu niša, kjer pride do tesnih odnosov med rastlinami in bakterijami, ki kolonizirajo rizosfero. Rastline bakterije oskrbujejo s potrebnimi hranili in tako omogočajo njihov obstoj v rizosferi, koreninske izločke pa bakterije uporabljajo kot substrat, kar omogoča obstoj večjemu številu bakterij v rizosferi kot drugje v zemlji. Predvidevajo, da je za uravnavanje teh procesov simbioze potrebno kompleksno gensko ozadje, ki ga streptomicete tudi imajo (Challis in Hopwood, 2003). Poleg antagonističnih lastnosti pa streptomicetam daje prednost tudi razrast hif, s katerimi se raztezajo po substratu. V vlažni zemlji se v primerjavi z gibljivimi bakterijami ta prednost izgubi (Kieser in sod., 2000).

Streptomicete poseljujejo predvsem nevtralna, rahlo alkalna tla, ki dobro prepuščajo vodo, kar kaže na dobro prilagojenost na nizek vodni potencial. V tleh predstavljajo tja do 90 % vseh aktinobakterij in imajo pomembno vlogo pri začetnih stopnjah razkrajanja organskega materiala (Schrempf, 2006). Da jih je v zemlji res veliko, priča tudi dejstvo, da je vonj, ki ga poznamo kot vonj po prsti, v resnici posledica sinteze geozminov, molekul, ki jih proizvajajo streptomicete (Madigan in sod., 2006).

Kot že povedano so streptomicete predvsem talni mikroorganizmi, vendar lahko nekatere redke predstavnike izoliramo tudi iz sedimentov in vodnih območji (Madigan in sod., 2006).

2.2 FIZIOLOGIJA BAKTERIJ RODU *Streptomyces*

Metabolizem streptomicet temelji na kemoorganotrofnem metabolizmu (Holt in sod., 1994), kar pomeni, da izrabljajo organske spojine (katabolizem) kot vir energije in vir osnovnih gradbenih elementov za biosintezo (anabolizem) makromolekul in ostalih celičnih snovi. Streptomicete so striktni aerobi, zato moramo pri gojitvi v laboratorijskih pogojih poskrbeti za dobro prezračevanje, kar velja predvsem za submerzno gojitev (Madigan in sod., 2006). Sporulacija v tekočini vključuje oblikovanje specializiranih vej, sporogenih hif, v katerih se tvorijo dvoplastna sporulacijska septa. Tako nastale spore *S. griseus* so podobne sporam iz zračnih hif, vendar niso enake. Spore nastale v tekočini so občutljivejše na razgradnjo z lizosomom, najverjetneje zaradi tanjše stene (Kontro in sod., 2005; Ohnishi in sod., 2002). Temperaturni optimum je v območju med 25 in 35 °C, nekatere vrste pa lahko rastejo v psihrofilnem in termofilnem območju. Tudi pH območje je široko, in sicer 6,5–8,0 (Holt in sod., 1994).

Streptomicete so prehransko nezahtevni mikroorganizmi, saj so nekateri izolati sposobni uporabljati čez 50 različnih virov ogljika (Kieser in sod., 2000). Zaradi tega so izjemno pomembne pri razgradnji in kroženju hranil v zemlji, še posebej tiste vrste, ki lahko razgrajujejo lignin, tanin ali celo gumo. Večina streptomicet za rast ne potrebuje organskih virov dušika, vitaminov ali rastnih hormonov, potrebujejo pa esencialne mineralne soli (Kämpfer, 2006).

2.2.1 Viri ogljika in regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov

Ogljik v celici predstavlja 50 % suhe biomase (Eikelboom, 2000), zato je ta glavni element med makroelementi. Streptomicete asimilirajo različne vire organskega ogljika in ga uporabijo za tvorbo nove celične mase. Uporabljajo predvsem ogljikove hidrate, alkohole, maščobe, kot tudi aminokisliline in aromatske spojine. Večina izolatov proizvaja izvencelične hidrolitične encime, ki omogočajo razgradnjo polisaharidov (npr. škroba), proteinov ter maščob (Madigan in sod., 2006).

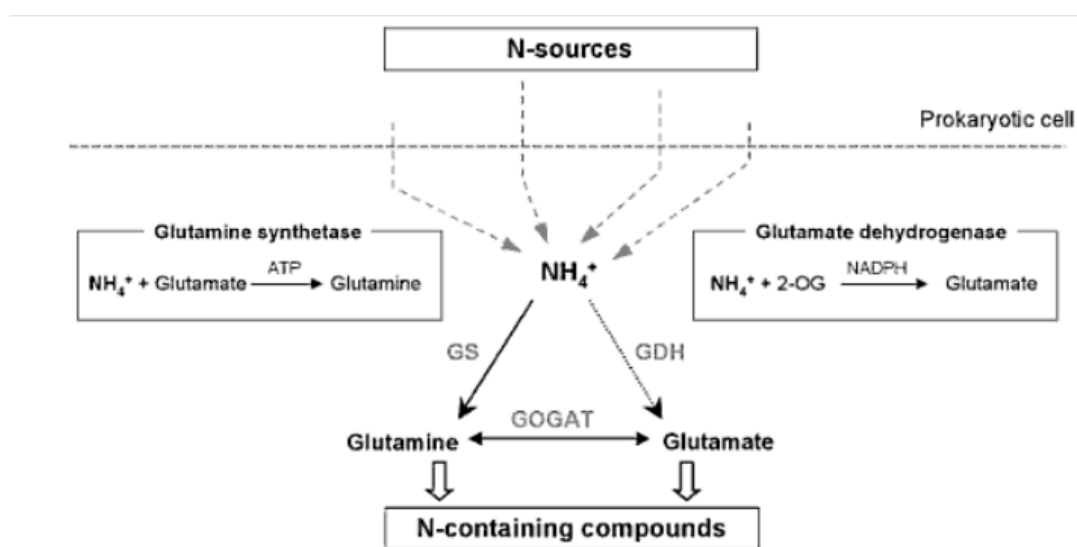
Pri večini streptomicet razgradnja glukoze poteka po poti Embden-Meyerhof-Parnas (glikoliza). Le nekatere vrste, npr. *Streptomyces antibioticus*, razgrajujejo glukozo po poti pentoza-fosfata, nobena pa ne uporablja Entner-Dourdofove poti, kar je značilno za vrste rodu *Pseudomonas*. Nekatere streptomicete lahko med sekundarnim metabolizmom preklopijo iz glikolize na pot pentoze-fosfata (Kieser in sod., 2000).

Viri ogljika so lažje (glukoza, fruktoza) ali težje (lignin, celuloza) razgradljivi. Da sprva izrabijo vir ogljika z največjim energijskim izkoristkom (glukoza), imajo streptomicete razvit mehanizem katabolne represije (CCR – carbon catabolite repression). Ta preprečuje, da bi bakterija sprva razgradila težje razgradljiv vir ogljika, in na ta način omogoča optimizirano stopnjo rasti v naravnih okoljih, kjer so prisotni kompleksni viri hranil (Kieser in sod., 2000). Čeprav je malo znanega o mehanizmu katabolne represije pri streptomicetah, obstajajo pomembne razlike med njimi in Gram negativnimi bakterijami. Pri po Gramu negativnih bakterijah igrata glukoza-PTS in ciklični AMP (cAMP) pomembno regulatorno vlogo v katabolni represiji, medtem ko pri streptomicetah ne (Ingram in sod., 1995; Kieser in sod., 2000). Glukoze permeaze, ki so jih odkrili v *Streptomyces coelicolor*, niso del sistema PTS (fosfoenolpiruvat : sladkor fosfotransferazni sistem) in niso vključene v CCR. Ključno vlogo v CCR streptomicet odigra glukokinaza (GlkA). GlkA deluje na transkripcijskem nivoju, vendar verjetno ni DNA vezavni protein. Najverjetneje sodeluje, oz. spreminja transkripcijske faktorje, ki so odgovorni za uravnavanje ekspresije katabolnih genov, ki so pod CCR (Kieser in sod., 2000). Poleg *glkA* naj bi pri CCR sodeloval tudi *ccrAI* (control of catabolite repression) (Ingram in sod., 1995; Kieser in sod., 2000).

2.2.2 Viri dušika in regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov

Drugi najbolj pogosti element v celici je dušik in predstavlja 14 % suhe biomase (Eikelboom, 2000). V naravi zalogo dušika predstavlja predvsem anorganski dušik v obliki amonijevega (amonijev sulfat) in nitratnega (KNO_3) iona. Organski viri dušika so predvsem aminokisliline, glicin, urea, kompleksni organski viri pa sojina moka, kvasni ekstrakt, itd. (Madigan in sod., 2006).

Asimilacija anorganskega dušika poteka preko glutamin/glutamat sintezne poti. Glutamat se sintetizira po dveh poteh. Pri prvi sodeluje glutamat dehidrogenaza (GDH), ki katalizira reduktivno aminacijo α -ketoglutarata (na sliki 8 označen kot OG – oksogutarat). Ta pot poteče le, če je koncentracija amonijevega iona v gojišču visoka (> 1 mM). Druga pot je energijsko bolj potrošna saj glutamin sintetaza (GS) z izrabo enega ATP prenese amino skupino na glutamat, da dobimo glutamin. Nato se ta amino skupina s pomočjo glutamat sintaze, oz. glutamat-2-oksoglutarat-transaminaze (GOGAT) prenese na α -ketoglutarat in nastane glutamat. Te reakcije so ključnega pomena za bakterijsko celico, saj glutamat priskrbi 85 % dušika, glutamin pa 15 % (White, 1995).



Slika 3: Asimilacija dušika (Wohlleben in sod., 2011)

Večina preučevanih streptomicet tudi asimilirata anorganski dušik preko glutamin sintetaze (GS) in glutamat-2-oksoglutarat-transaminaze (GOGAT). Presenetljivo, pri njih najdemo dva tipa glutamin sintetaze (GS): glutamin sintetazo I (GSI), ki jo najdemo pri prokariontih in je regulirana z adenilacijo, in glutamin sintetazo II (GSII), ki je podobna evkariontski. Asimilacija dušika preko glutamin sintetaze (GS) je energijsko potratna a učinkovita pri majhnih koncentracijah amonija. Večina streptomicet lahko asimilirata dušik preko kompleksa glutamat – dehidrogenaze : glutamat – 2 – oksoglutarat – transaminaze (GDH:GOGAT), ki ga imajo tudi druge bakterije. Ta pot je energijsko ugodnejša, vendar poteče le ob visoki koncentraciji amonija. Pri nekaterih streptomicetah (*S. clavuligerus* in

S. aureofaciens) niso odkrili glutamat-dehidrogenaze (GDH), zato domnevajo, da imajo za asimilacijo dušika samo energijsko potraten kompleks glutamin sintetaze: glutamat – 2 – oksoglutarat – transaminaze (GS-GOGAT) (Kieser in sod., 2000).

Sicer naj bi obstajala represija katabolizma aminokislin, vendar pri streptomicetah navadno ne najdemo CCR vezane na katabolizem aminokislin tako kot pri enterobakterijah. Represija z amonijevim ionom pa naj bi imela vpliv tako na katabolizem aminokislin kot tudi na sekundarni metabolizem, vendar pa obe metabolni poti nista direktno povezana (Kieser in sod., 2000).

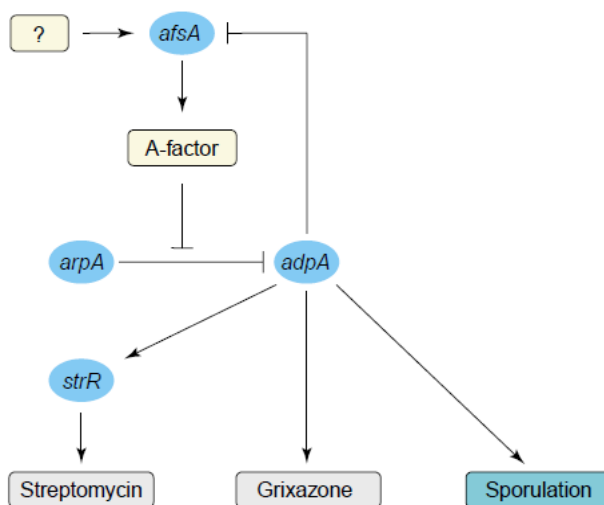
2.2.3 Viri fosforja in regulacija biosinteze sekundarnih metabolitov

Tudi fosfor je pomemben za celice, saj sestavlja nukleotide (ATP, GTP), nukleinske kisline (DNK, RNK), fosfolipide, itd., sodeluje pa tudi pri regulaciji sekundarnega metabolizma. V celici predstavlja 3 % suhe teže (Eikelboom, 2000). Najpogostejši vir fosforja je fosfatni ion (kalijev dihidrogen fosfat, dikalijev hidrogen fosfat, dinatrijev hidrogen fosfat) (Madigan in sod., 2006), organski vir pa je predvsem kvasni hidrolizat.

Bakterije so razvile signalni mehanizem za spodbuditev asimilacije fosfata, ko le-tega primanjkuje v okolju. Pri *S. lividans* in *S. coelicolor* je to dvokomponentni sistem PhoR-PhoP, podoben PhoR-PhoB pri *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* (Martin, 2004). PhoR je membranski protein senzor kinaze, PhoP pa je odzivni regulator, ki se po fosforilaciji s PhoR veže na tarčna zaporedja DNK. Ko je v okolju zadostna količina fosfata, se le-ta prenese v celico preko Pit transporterja z nizko afiniteto. Sestavljen je iz enega samega transmembranskega proteina in deluje s pomočjo razlike v elektrokemijskem potencialu ($\Delta\mu$) (White, 1995). Ob pomanjkanju fosfata pa se PhoR fosforilira (PhoR~P) in prenese fosfat na nefosfoirliran PhoP. Nastali transkripcijski faktor (PhoP~P) nato sproži transkripcijo številnih genov v PHO regulonu. Ob tem se prepíše tudi gen *phoA*, ki očitno zavira nastajanje sekundarnih metabolitov, saj mutanti *S. lividans* z delecijo *phoP* ali *phoR* ne tvorijo PhoA, proizvajajo pa prekomerno količino antibiotika aktinorhodina (Martin, 2004).

2.2.4 Morfološka diferenciacija in produkcija sekundarnih metabolitov

Procesa morfološke diferenciacije in produkcije sekundarnih metabolitov sta podvržena kompleksni regulaciji (Kieser in sod., 2000). Procesa sta med seboj povezana (Bibb, 2005), kar prikazuje slika 9, kjer igra A-faktor pri *S. griseus* pomembno vlogo regulacije, tako proizvodnje antibiotikov (streptomycin, grixazone) kot tudi sporulacije. Ob ustreznem signalu iz okolice (na sliki kot "?") *afsA* gen omogoči sintezo A-faktorja, najboljše okarakteriziranega γ -butirolaktona (Bibb, 2005). V začetni fazi rasti je koncentracija A-faktorja nizka. Protein ArpA je vezan na promotorsko regijo *adpA* in preprečuje njegovo transkripcijo. Ko pa koncentracija A-faktroja doseže kritično mejo, se le-ta veže na ArpA, promotorska regija *adpA* se sprostí in transkripcija tega genase sproži. AdpA nato spodbudi transkripcijo *strR*, ki je specifičen regulator produkcije streptomicina. Transkripcijski aktivator AdpA aktivira tudi druge gene, ki sodelujejo pri nastanku zračnega micelija (*adaA*, *amfR*) in septaciji hif (*ssgA*) (Kato in sod.,2004).



Slika 4: Regulatorna kaskada A-faktorja pri *Streptomyces griseus* (Bibb, 2005)

Pri morfološki diferenciaciji sodelujejo številni geni imenovani *whi* in *bld*. *Bld* geni so pomembni pri razraščanju zračnega micelija v stacionarni fazi rasti in nekateri od njih naj bi sodelovali tudi pri produkciji sekundarnih metabolitov (Kieser in sod., 2000; Bibb, 1996).

2.3 SEKUNDARNI METABOLITI

Sekundarni metaboliti, imenovani tudi idioliti, so spojine, ki imajo dokaj različno kemijsko strukturo od primarnih metabolitov, iz katerih so sestavljeni (npr. sladkorji, amino kisline in organske kisline). Proizvajajo jih številni mikroorganizmi, za rast katerih niso nujno potrebni, vendar na različne načine služijo preživetju (Demain, 1992). Na splošno velja, da poteka biosinteza sekundarnih metabolitov med posebno fazo rasti ali pod posebnimi pogoji, ki niso povezani z maksimalno hitrostjo rasti (Hütter, 1986). Še več, maksimalno proizvodnjo sekundarnih metabolitov so opazili, kadar v gojišču začne primanjkovati hranil. S proizvodnjo sekundarnih metabolitov se pogosto povezane tudi določene morfološke spremembe (npr. tvorba spor) (Döhren in Gräfe, 1997).

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

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

Sekundarni metaboliti so najverjetneje nastali v procesu evolucije iz genov primerne metabolizma. To potrjuje podobnost med sintezni poti primarnih in sekundarnih metabolitov. Tak primer je sinteza poliketidov. Prva stopnja sinteze, kjer se acilni prekursorji povezujejo, je nedvomno sorodna sintezi lipidov v primarnem metabolizmu (Vining, 1986). Sekundarni metabolizem se je v organizmih obdržal zaradi dolgoročnih prednosti pri preživetju v biološki skupnosti in okolju (Döhren in Gräfe, 1997). Tako lahko idioliti služijo kot signalni za zaznavanje kvoruma in sprožijo diferenciacijo celic ali

proizvodnjo patogenih determinant (Martin in sod., 2005), delujejo lahko kot kemijski agensi, ki posredujejo interakcije med organizmi, oz. med organizmi in njihovim okoljem (Vining, 1986), lahko imajo tudi vlogo pri transportu kovin (Challis in Hopwood, 2003).

2.3.1 Regulacija sekundarnega metabolizma pri bakterijah rodu *Streptomyces*

Biosintetske poti sekundarnih metabolitov so zelo natančno uravnavane z zunanjimi in notranjimi signali, ki so posledica spreminjajočega se življenjskega okolja in zapletenega življenjskega cikla streptomicet (Bibb, 1996; Bibb, 2005). Prav to je verjetno razlog za obstoj velikega števila genov, ki kodirajo regulatorne proteine, transportne beljakovine ter encime, ki so potrebni za normalno delovanje celice (Hopwood, 2002).

Geni za biosintezo posameznih sekundarnih metabolitov so združeni v tako imenovane genske skupine, ki so lahko velike od nekaj do čez 100 kbp. Večina teh genskih skupin vsebuje za biosintetsko pot specifične regulatorne gene, ki so pogosto odvisni od genov potrebnih za produkcijo različnih sekundarnih metabolitov, ki jih ta sev proizvaja. Streptomicete imajo različne družine regulatornih proteinov, katerih delovanje je uravnano tako z znotrajceličnimi kot tudi zunajceličnimi signalnimi molekulami. Regulacija se tako vrši na transkripcijskem, translacijskem in post-translacijskem nivoju in tako tvori zelo kompleksno regulatorno kaskado (Bibb, 2005).

Za spodbuditev biosinteze sekundarnih metabolitov ob pomanjkanju dušika imata z ribosomom povezana ppGpp sintetaza (RelA) ter njen produkt gvanozin tetrafosfat (ppGpp) pomembno regulatorno vlogo. Kot primer lahko navedemo indukcijo biosinteze antibiotika aktinorhodina ob zmanjšani hitrosti rasti pri bakteriji *Streptomyces coelicolor* (Hesketh in sod., 2001). Povečano izražanje gensko spremenjenega *relA* sproži izražanje gena *actIII-orf4*, ki je specifični pozitivni regulator biosinteze omenjenega antibiotika (Chakraborty in Bibb, 1997). RelA je nujno potreben za sintezo aktinorhodina pri *S. coelicolor* v času pomanjkanja dušika, ko pa primanjkuje fosfata, je odveč. V takem primeru mora obstajati signalizacijska pot, neodvisna od ppGpp (Chakraborty in Bibb, 1997).

Po drugi strani povečane koncentracije anorganskega fosfata v gojišču/okolju preprečujejo biosintezo mnogih sekundarnih metabolitov. Mutacije dvokomponentnega sistema PhoR-PhoP (Martin, 2004) v *Streptomyces lividans* povzročijo zmanjšano aktivnost alkalne fosfataze, omejen je transport fosfata in poveča pa se biosinteza aktinorhodina, kar nakazuje, da fosforiliran PhoP verjetno preprečuje transkripcijo genov, ki so vpleteni v biosintezo antibiotikov (Sola-Landa in sod., 2003).

Na biosintezo sekundarnih metabolitov vpliva tudi dotok prekursorjev, oziroma gradbenih enot iz primarnega metabolizma, ki pogosto inducirajo biosintezo sekundarnih metabolitov. Regulirajo pa ga tudi nekatere druge majhne molekule iz okolice. Kot primer lahko navedemo avto-induktorje kot so γ -butirolaktoni. Najbolj okarakteriziran γ -butirolakton je tako imenovani A-faktor (2-izokaprilolil-3R-hidroksimetil- γ -butirolakton) pri *Streptomyces griseus*. Ta deluje na ciljne beljakovine, ki so represorji in regulatorji biosinteznih poti ter morfološke diferenciacije, kot smo omenili v poglavju 2.1.2. Z vezavo γ -butirolaktonov na ciljne beljakovine pride do inhibicije njihove aktivnosti. O sami sintezi γ -butirolaktonov je znano relativno malo. Predvidevajo, da je sinteza povezana z neznanim fiziološkim signalom, nakar γ -butirolakton deluje kot analog homoserinskih laktonov, ki sodelujejo v zaznavanju gostote celic. Verjetno pa njihova funkcija ni samo signaliziranje, ampak tudi uravnavanje in usklajevanje sekundarnega metabolizma ter morfološke diferenciacije glede na razvoj micelijskih kolonij (Bibb, 2005).

Številni geni, ki specifično uravnavajo biosintezne poti posameznih antibiotikov, pripadajo družini t.i. pot-specifičnih regulatorjev SARP (angl. *Streptomyces* antibiotic regulatory protein). Te gene najdemo v aktinomicetah, predvsem v strepomicetnih rodovih (Bibb, 2005). Ti transkriptorski aktivatorji imajo N-terminalni del, ki ga najdemo tudi pri dobro preučeni proteini družine OmpR družine. Pogosto se nahajajo v genskih grozdih in regulirajo na primer biosintezo aromatskih poliketidov, ribosomskih in neribosomskih biosintetiziranih peptidov, poliketidov tip I, β -laktamov in azoksi komponent (Bibb, 2005). Poleg SARP je še LAL družina, ki ima na N-terminalnem delu domeno za vezavo ATP, na C-terminalnem delu pa domeno, ki je značilna za družino DNK-vezavnih proteinov, LuxR. Od tod tudi angleško ime družine "Large ATP-binding regulators of the LuxR family". Do

sedaj so regulatorje iz družine LAL odkrili pri 13 skupinah genov PKS tipa I in dveh skupinah genov za glikopeptidna antibiotika (Bibb, 2005).

2.3.2 Značilnosti sekundarnih metabolitov

Posebnost sekundarnih metabolitov je njihova strukturna raznolikost. Ti se med seboj ne razlikujejo le po kemijski zgradbi, ampak tudi po strukturni kompleksnosti (Vining, 1986). Teh struktur je na prvi pogled veliko, toda večina teh struktur pripada eni od številnih družin, od katere ima vsaka posebno strukturno karakteristiko glede na pot, po kateri je sintetizirana. Po strukturi lahko sekundarne metabolite razdelimo v naslednje skupine (Hanson, 2003):

- Poliketidi (rapamicin, FK506) in maščobne kisline
- Peptidni antibiotiki
- Terpenoidi (terpentecin) in steroidi
- Fenilpropanoidi
- Alkaloidi (benhamycin)
- Posebne aminokisline in peptidi (A10255 B)
- Posebni ogljikovi hidrati

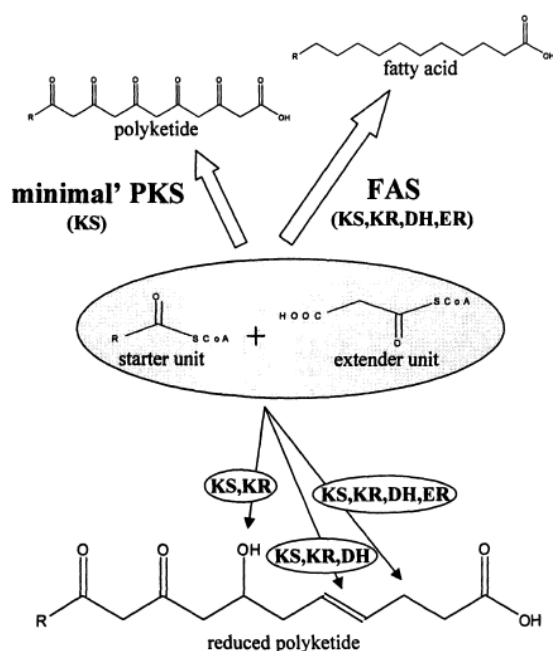
2.3.3 Sekundarni metaboliti iz skupine poliketidov

Poliketidi so velika družina naravnih produktov z veliko strukturno raznolikostjo in širokim spektrom farmakoloških aktivnosti. Med njimi lahko najdemo veliko pomembnih kliničnih zdravil kot so protibakterijske učinkovine eritromicin in tetraciklin, imunosupresanti FK506 in rapamicin, zniževalci holesterola lovastatin, protirakaste učinkovine daunorubicin in epotilon ter veliko drugih medicinsko in komercialno pomembnih metabolitov (Kuščer in sod., 2005).

Čeprav so poliketidi strukturno različni, vsi nastanejo na podoben način. Sintetizirajo se preko kaskade dekarboksilacijskih kondenzacij krajših organskih kislin, ki se predhodno aktivirajo s koencimom A (CoA). Sinteza se prične s kondenzacijo začetne enote, ki je največkrat malonil-CoA oziroma acetyl-CoA. Nadaljuje se s pripenjanjem podaljševalnih

enot, ki so največkrat malonil-CoA ali metilmalonil-CoA, v verigo pa se lahko vgradijo tudi številne druge kratke organske kisline. Poleg njih strukturno raznolikost povečajo tudi različni načini kondenzacij posameznih enot. Kondenzacije katalizirajo poliketid sintaze (PKS) (Baerson in Rimando, 2007).

Poliketid sintaze so več-encimski kompleksi na katerih se postopno sestavlja poliketidna veriga s pomočjo različnih katalitičnih domen. Te domene navadno vedno vsebujejo vsaj tri od naštetih podenot: KS (ketosintazna aktivnost), KR (ketoreduktazna aktivnost), ER (enoilreduktazna aktivnost), DH (dehidratazna aktivnost), itd. Dodatno raznolikost v strukturo poliketidov vnašajo še razlike znotraj molekulske ciklizacije in od PKS neodvisne modifikacije (post PKS modifikacije) (Baerson in Rimando, 2007).



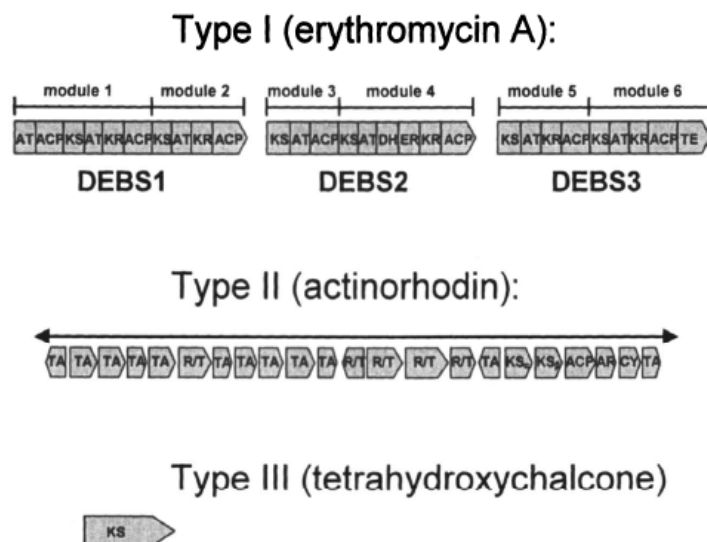
Slika 5: Shematski prikaz encimske aktivnosti poliketid sintaz in nastajanja poliketidne verige. Iz slike je razvidno, kako posamezne podenote PKS katalizirajo ključne stopnje v biosintezi, in kako te vplivajo na strukturo nastajajočega poliketida (Baerson in Rimando, 2007).

2.3.4 Razdelitev poliketidnih sintaz glede na mehanizem biosinteze

Glede na strukturo in predvsem način delovanja PKS delimo v tri razrede. PKS tipa I so strukturno analogne sintazam maščobnih kislin tipa I (FAS tip I), ki jih najdemo v glivah, živalih in nekaterih rastlinah. PKS tipa II so analogne FAS tipa II v bakterijah in vseh vrstah rastlin. PKS III so evolucijsko oddaljene od ostalih dveh skupin in so strukturno ter katalitično veliko bolj enostavne, so pa tudi najmanj raziskane (Baerson in Rimando, 2007).

- PKS tipa I so modularni encimski kompleksi veliki 100–10.000 kDa. Sestavljeni so iz več encimov z različnim številom modulov, v katerih so urejene katalitične enote. Tekom sinteze enega poliketida je vsak modul uporabljen le enkrat. Vsak tak modul navadno vsebuje vsaj tri katalitične enote - ketosintazno (KS) in aciltransferazno (AT) domeno ter domeno, ki ji pravimo proteinski prenašalec acilne skupine (ACP). Te domene so nujne za sintezo poliketidne verige. Natančna zgradba nastale verige je odvisna tudi od ostalih aktivnih domen, ki jih lahko vsebuje modul, in sicer ketoreduktaze, enoilreduktaze, dehidrigenaze. Dobra primera PKS tip I je PKS za biosintezo eritromicin A, ki ga proizvaja *Saccharopolyspora erythraea* in FK506, ki ga proizvaja *Streptomyces tsukubaensis*.
- PKS tipa II so tudi več-encimski kompleksi sestavljeni iz velikega števila manjših proteinov. Vsaka izmed teh proteinskih podenot poseduje svojo katalitično aktivnost. Posamezni katalitični centri so med sintezo ene poliketidne verige uporabljeni večkrat. Temu načinu pravimo iterativni, ponavljajoči način sinteze. Natančen mehanizem, ki določa, kolikokrat bo katera izmed enot uporabljena pri sintezi, večinoma ni poznan. Sekundarni metabolit sintetiziran s pomočjo PKS tip II je actinorhoidin, ki ga proizvaja *Streptomyces coelicolor*.
- PKS tipa III so strukturno najenostavnejše in najmanjše. Razen dveh tipov PKS, se pri PKS tipa III vse reakcije katalizirajo na istem aktivnem mestu encima. Osnovna gradbena enota je malonil-CoA. Nabor vseh možnih gradbenih enot, ki jih

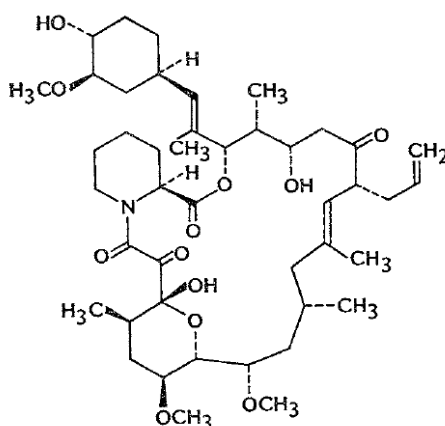
uporabljajo, je širši kot pri ostalih dveh tipih. PKS tip III nima ACP domene, ki bi skrbela za prenos nastajajočega poliketida med aktivnimi domenami. Deluje kot homodimer in si poliketidno verigo enoti podajata med seboj (Baerson in Rimando, 2007).



Slika 6: Primer organiziranosti genskega zapisa oziroma organizacije proteinskih kompleksov vseh treh tipov PKS (Baerson in Rimando, 2007)

2.3.5 Splošno o FK506 (takrolimus)

FK506 oz. takrolimus sintetizira *Streptomyces tsukubaensis*, bakterija izolirana iz predela Tsukuba severne Japonske, leta 1984. Molekulska masa strukture znaša 822 (Kunz in Hall, 1993) z molekularno formulo $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot xH_2O$ (Tanaka in sod., 1987). FK506 pripada skupini makrocikličnih poliketidov in je v vodi praktično netopen, topi pa se v metanolu, etanolu, acetonu, kloroformu ter drugih polarnih topilih. Za razliko od analoga FK520, ki ima na ogljikovem atomu C21 etilno skupino, ima FK506 alilno skupino ($R-CH_2-CH=CH_2$) (Mo in sod., 2011).

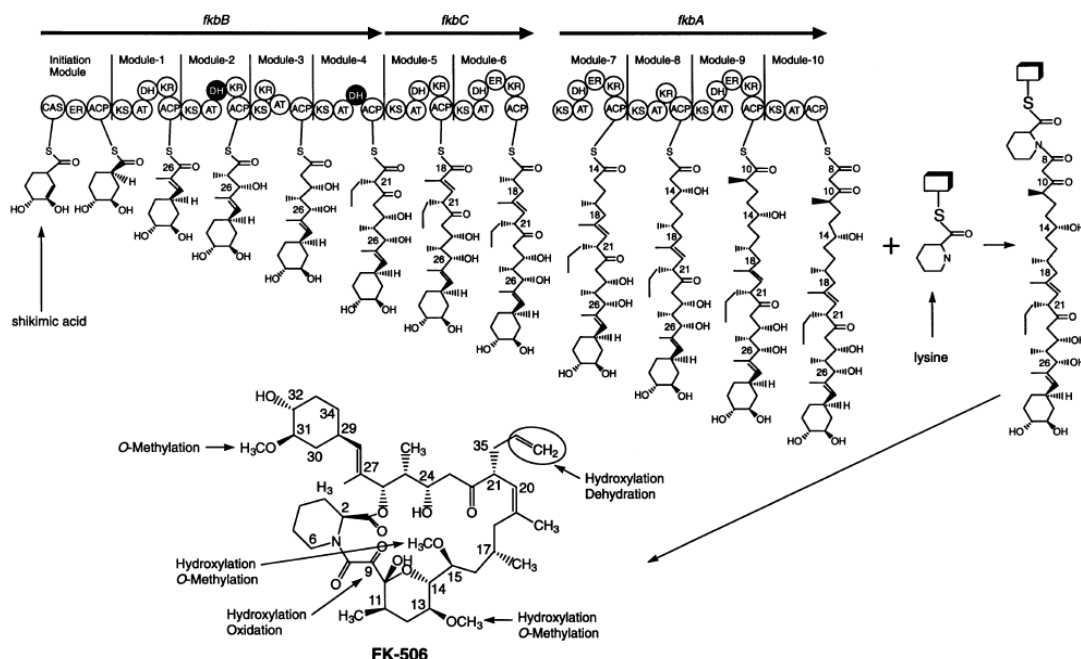


Slika 7: Struktura FK506 (Kino in sod., 1987a)

2.3.6 Biosinteza FK506

Biosinteza makrolaktonskega obroča FK506 vključuje več elongacijskih ciklov, ki so po mehanizmu podobni korakom sinteze maščobnih kislin. S sekvenciranjem DNK fragmenta, ki kodira skupino genov za biosintezo FK506, so odkrili gene za tri velike proteine (*fkbA*, *fkbb* in *fkbc*), ki sestavljajo več-encimski PKS kompleks. Ta encimski kompleks uvrščamo med poliketidne sintetaze tipa I (modularna PKS) (Motamedi in Shafiee, 1998; Motamedi in sod., 1997).

Sinteza FK506 se prične na encimu FkbB, ki je sestavljen iz 21 domen urejenih v 5 modulov, enega iniciacijskega in štirih podaljševalnih modulov. Sestavljen je iz 7540 aminokislin, po velikosti mu sledi FkbA z 6420 ter FkbC z 3592 aminokislinami. Od FkbB sintezo prevzame FkbC z 11 domenami urejenimi v dva podaljševalna modula. FkbA encim pa zajema 19 katalitičnih domen zbranih v zadnje štiri stopnje elongacije (Motamedi in Shafiee, 1998; Motamedi in sod., 1997). Slika 6 prikazuje ta encimski kompleks, ki ima vsega skupaj 51 funkcionalnih domen, s katerimi izvede iniciacijo in rast linearne poliketidne verige (Motamedi in Shafiee, 1998). Ta poteče v desetih korakih, kjer se štiri enote malonil-CoA vpletejo v verigo pri 3., 7., 8. in 10. modulu. Pet metilmalonil-CoA se verigi priključijo v 1., 2., 5., 6. ter 9. modulu, v 4. pa en propilmalonil-CoA (Motamedi in sod., 1997).



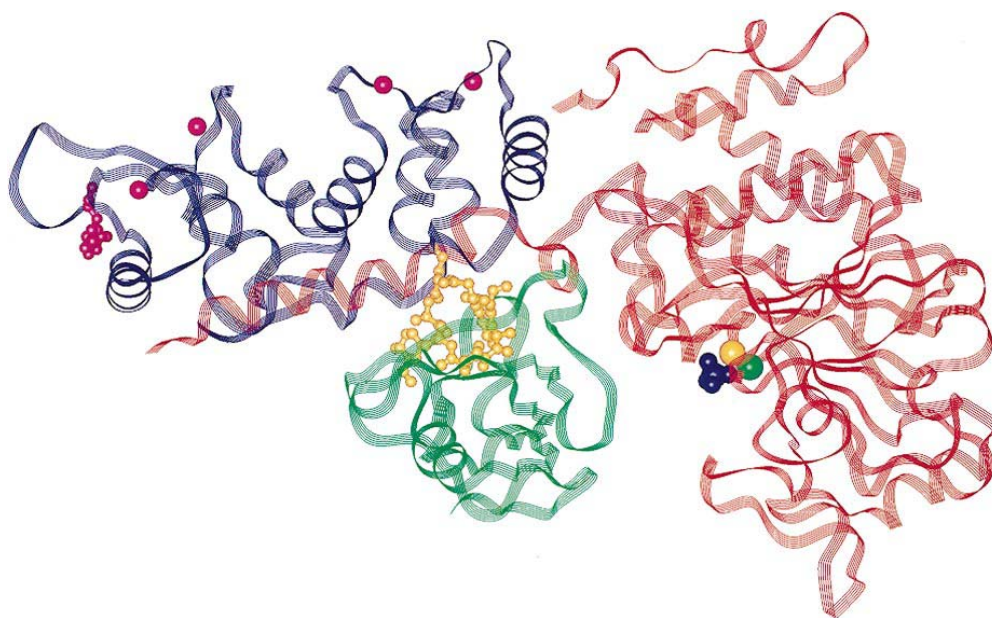
Slika 8: Pot biosinteze FK506 (Motamedi in Shafiee, 1998)

Sama sinteza se prične z izbiro začetne enote dihidro-cikloheksan-karbonil-CoA (šikiminska kislina) na iniciacijskem modulu encima FkbB, zaključi pa s kondenzacijo pipekolatne kisline s FkbP peptidno sintetazo, ki ji sledi ciklizacija makrolidnega obroča (Mo in sod., 2011). Šikiminska kislina nastane s spojitvijo eritroze-4-fosfat in fosfoenol piruvata, pipekolatna kislina pa se tvori iz aminokislina lizin kot kaže slika 6.

2.3.7 Pomen FK506 v medicini

Prva publikacija (Kino in sod., 1987a), ki omenja pomembnost tega sekundarnega metabolita, je izšla leta 1987. Dokazali so, da FK506 zavira imunski sistem tako, da prepreči T-celično aktivacijo oz. proliferacijo na način, da zavre produkcijo interlevkinov (IL-2, IL-3) in interferonov (INF- γ). Dokazali so tudi, da zavira poleg celične (limfociti T) tudi humoralno imunost (proizvodnjo protiteles) in ima večjo aktivnost od ciklosporina, saj deluje pri 100x nižji koncentraciji (Kino in sod., 1987b). Je eden najaktivnejših imunosupresantov tako *in vitro* kot tudi *in vivo*.

Kasnejše raziskave so pokazale, da se v tarčni celici FK506 veže na FKBP (FK506 vezavni protein). Ta kompleks pa se veže na kalcinerum, Ca²⁺/kalmodulin odvisna serin/treonin fosfataza. Sestavljata jo katalitična podenota A in regulatorna podenota B. Ta vezava vpliva na TCR (T celični receptor) signalno transdukcijsko pot, tako da blokira s kalcijem odvisno signalizacijsko pot, ki bi sicer pripeljala do jedrnega transporta NF-AT (nuclear factor of activated T cell) citoplazemske podenote. NF-AT je eden mnogih transkripcijskih faktorjev potrebnih za antigen-inducirano gensko ekspresijo. Na ta način se prepreči nastajanje že omenjenih interleukinov in interferonov, ki sprožijo imunski odziv (Kunz in Hall, 1993).



Slika 9: Kristalna struktura kompleksa obeh podenot kalcineruma ter kompleksa KFB12-FK506 (Klee in sod., 1998). Kalcinerum A je prikazan kot rdeč, kalcinerum B kot vijoličast, FKBP12 je obarvan zeleno, FK506 pa z rumeno ter prikazan s kroglično strukturo

S temi izsledki je dobil FK506 pomembno vlogo pri terapiji po transplantacijah organov (Kino in sod., 1987a). Kot zdravilo so ga registrirali leta 1993 na Japonskem, sedaj pa se ga uporablja v 70 državah, kjer ga uporabljajo po transplantacijah ledvic, jeter, trebušnih slinavk, kostnega mozga in celo srca za preprečevanje zavračanja teh organov. Uporabljajo ga tudi za površinsko zdravljenje resnih imunsko povezanih kožnih boleznih (Bhuvana in sod., 2010). Raziskovalci navajajo, da deluje FK506 tudi protivirusno. Karpas in sodelavci (1992) so dokazali, da bi lahko FK506 uporabili kot protivirusno zdravilo za AIDS, saj naj

bi zmanjšal proizvodnjo HIV-1 s selektivnim zaviranjem replikacije v kronično okuženih T celicah, hkrati pa zaradi nizke doze ne vpliva na zdrave celice. Drug primer protivirusnega učinkovanja navaja članek (Reis in sod., 2006), kjer naj bi FK506 zaviral replikacijo virusov iz družine Ortopoks.

2.4 VPLIV SESTAVIN GOJIŠČA NA PRODUKCIJO FK506

Za mikroorganizme je sinteza sekundarni metabolitov manjšega pomena kot hitrost rasti. Zato sekundarni metabolizem poteče šele, ko je rast omejena z izrabo nutrientov ali pomanjkanja esencialnih hranil. Le-tega skušamo izzvati s tremi glavnimi limitnimi substrati v gojišču, kot so vir, oziroma vrsta vira ogljika, koncentracija dušika ter fosforja. Druga hranila, še posebej minerali kot sta železo in cink, tudi lahko vplivajo na produkcijo, vendar ne vplivajo na to, kdaj bo sekundarni metabolizem potekel (Vining, 1986).

Za povečanje donosa FK506 s streptomycetami so se znanstveniki lotili s pristopi selekcije, optimizacije gojišč in procesov ter gensko manipulacijo. Relativno malo pa je znanega, kako različni viri hranil vplivajo na produkcijo FK506 v kemijsko definiranem gojišču (Yoon in Choi, 1997).

2.4.1 Vpliv vira ogljika na biosintezo FK506

Kot že povedano (poglavje 2.2.1) streptomicete lahko izkoriščajo različne vire ogljika. Yoon in Choi (1997) so določali vpliv topnega škroba, acetata, laktata, glukoze ter drugih sladkorjev. Ugotovili so, da glukoza najbolje spodbuja rast in hkrati daje dobro produkcijo FK506. Tudi na topnem škrobu je rast zadovoljiva, vendar je produkcija za 35 % manjša. Na vseh ostalih testiranih virih ogljika so streptomicete dobro rastle, vendar ni prišlo do povišane produkcije FK506. Poskusi so zajemali tudi hkratno uporabo glukoze in topnega škroba, kar ni imelo večjega vpliva na rast mikroorganizma, je pa povečalo produkcijo FK506 za 45 % (Yoon in Choi, 1997). To nakazuje, da povišane koncentracije glukoze ne zavirajo produkcije FK506, kar se pri večini sekundarnih metabolitov zgodi (Vining, 1986).

2.4.2 Vpliv vira dušika na biosintezo FK506

Dušik je pomemben element v celici, saj je sestavni del ključnih spojin, kot so aminokisliline, beljakovine, nukleinske kisline. Zato je pomembna izbira primerne vira, ki bo dala dobro rast in produkcijo zelenega sekundarnega metabolita. V študiji, ki so jo publicirali Yoon in Choi (1997), so testirali različne vire dušika in dokazali, da je bila rast *Streptomyces* sp. MA6858 (ATCC 55098) najboljša na amonijevem sulfatu, asparaginu in glutaminu. Pri nobenem od teh virov dušika pa ni bila zaznana produkcija FK506. Z višanjem koncentracije amonijevega sulfata se je izboljševala rast mikroorganizma, povečala pa sta se tudi poraba glukoze in fosfata v mediju. Tako je produkcija FK506 inhibirana s presežkom lahko dostopnega dušika v gojišču, kar dokazuje, da povečana rast mikroorganizma in povečana poraba nutrientov zavirata ključne encime v sintezi antibiotikov (Yoon in Choi, 1997).

Ko so dodali laktat (sol organske kisline) v gojišče, ki je vsebovalo amonijev sulfat kot vir dušika, se je produkcija občutno povešala. To nakazuje, da laktat spodbuja produktivnost FK506, ne pa rast mikroorganizma. Laktat v takem gojišču služi kot vir prekursorjev, saj se pretvori v piruvat, ta pa v acetil-CoA (Yoon in Choi, 1997).

2.4.3 Vpliv vira fosforja na biosintezo FK506

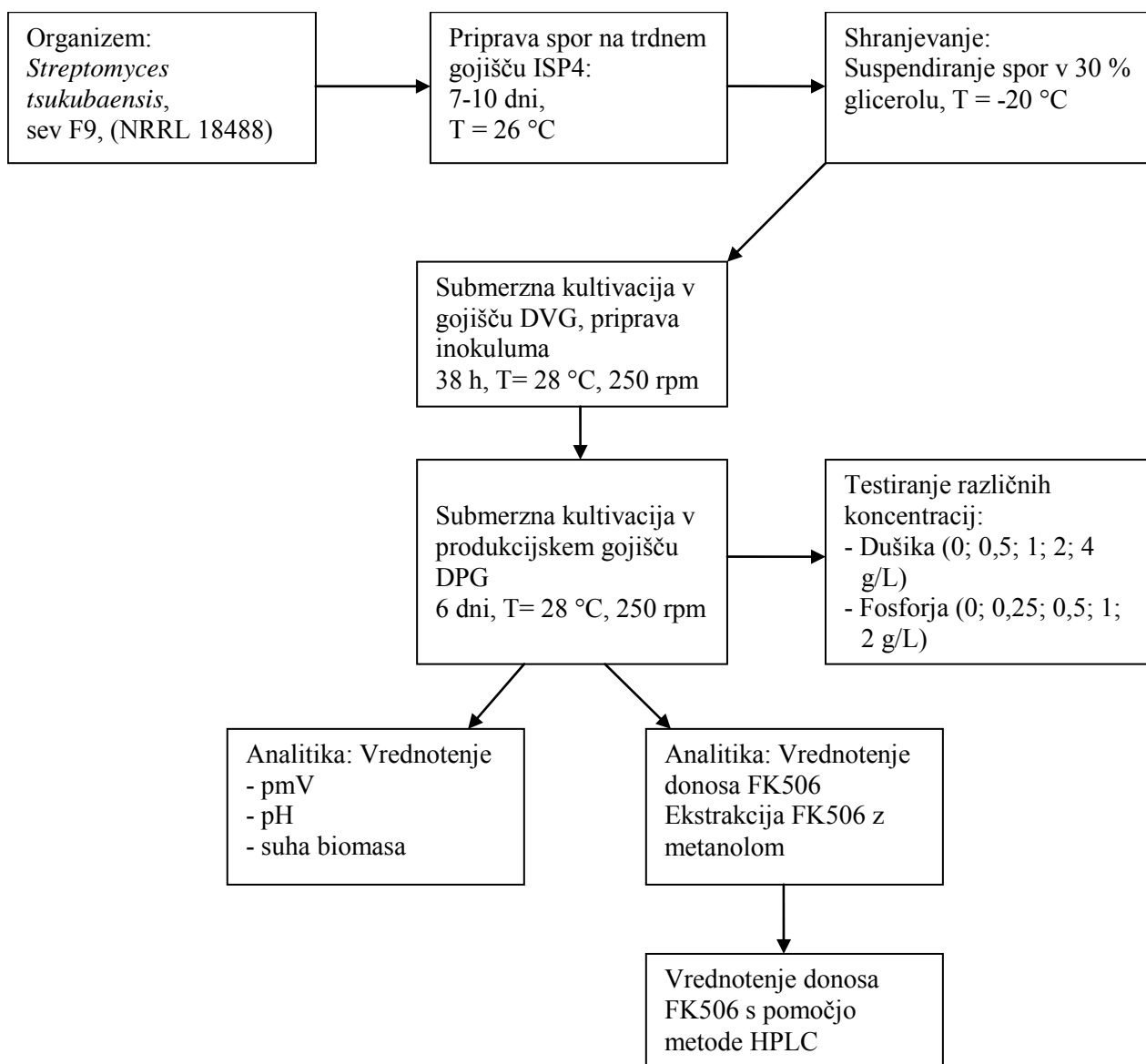
Vse od leta 1970 je bilo objavljenih veliko znanstvenih študij, ki so opisovale negativen vpliv povišanih koncentracij fosfata na produkcijo različnih sekundarnih metabolitov (Martin, 2004). Povišane koncentracije fosfata naj bi zmanjšale sintezo ali aktivnost encimov, ki sodelujejo v sintezi fosforiliranih prekursorjev (fosfotferaz) in/ali povečajo sintezo ali aktivnost encimov z defosforilacijsko aktivnostjo (fosfataz). Fosfat lahko vpliva na raven fosforiliranih nukleotidov v celici s polifosfati (Hütter, 1986). Vsekakor pa so ob povišani koncentraciji fosfata zatrti geni PHO regulona in s tem tudi produkcija sekundarnih metabolitov (White, 1995).

Martin in Demain (1980) trdita, da koncentracija fosfata od 0,3 do 300 mM spodbuja celično rast, medtem ko koncentracija nad 10 mM zavira biosintezo večine antibiotikov. Pri študiji Yoon in Choi (1997) so v osnovno gojišče dodali naslednje koncentracije

fosfata: 2,9; 10; 20; 30; 60; 80 mM. Pokazalo se je, da dodajanje fosfata tja do 60 mM ni vplivalo na rast *Streptomyces* sp. MA6858, povečala se je le specifična izraba fosfata v gojišču. Prav tako se je povečala produkcija FK506 za 45 – 67 %, ko so dodali 10 in 30 mM fosfat. Pri dodatku 60 mM in 80 mM fosfata v gojišče pa se je produkcija znižala. Yoon in Choi (1997) sta dokazala tudi, da se je ob dodatku amonijevega sulfata v medij z 10 in 30 mM fosfata, produkcija FK506 zmanjšala za 53–74 %. Amonijev sulfat kot edini vir dušika še bolj poudari negativni učinek povišane koncentracije fosfata.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA DELA



Slika 10: Shema eksperimentalnega dela v laboratoriju

3.2 MATERIALI

3.2.1 Gojišča

- ISP4 (sporulacijsko gojišče za streptomicete)

Gojišče ISP4 (Shirling in Gottlieb, 1966) smo uporabili za namnožitev spor *Streptomyces tsukubaensis*, sev F9 (NRRL 18488). Pripravili smo ga tako, da smo topni škrob (raztopina I) 20 min kuhali pri 80 °C ter nato dodali 50 mL raztopine II ter 20 g/L bakteriološkega agarja (Biolife). Uravnali smo pH na 7,0 z 1 M NaOH ter avtoklavirali 20 min pri 121 °C na 1,2 bara. Po avtoklaviranju smo steklenice zaprli do konca ter pustili, da so se ohladile do 50 °C. Aseptično smo v brezprašni komori prelili gojišče v označene sterilne petrijeve plošče. Pustili smo jih na pultu, da so se strdile, nato pa shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

Preglednica 2: Sestava ISP4 gojišča - raztopina I

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Topni škrob	10 g	Sigma
d H ₂ O	do 950 mL	

Preglednica 3: Sestava ISP4 gojišča - raztopina II

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
K ₂ HPO ₄	10 g	Merck
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 g	Sigma
NaCl	10 g	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	Merck
CaCO ₃	20 g	Kalcit
Mineralna raztopina ISP4	10 mL	
d H ₂ O	do 500 mL	

*Sterilizacija traja 20 min pri 121 °C na 1,2 bara.

Preglednica 4: Sestava mineralne raztopine ISP4

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,1 g	Merck
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g	Kemika
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g	Merck
d H ₂ O	do 100 mL	

- 2TY ("Tryptone Yeast Extract Media")

Gojišče 2TY (Sambook in sod., 1989) smo uporabili za sledenje potencialnih okužb med bioprosesom. Na to gojišče smo nacepili vzorce *S. tsukubaensis*, za katere smo sumili, da so bili tekom eksperimenta kontaminirani. Gojišče 2TY smo pripravili tako, da smo natehtali vse navedene sestavine v preglednici 5, jim dodali ustrezno količino destilirane vode ter avtoklavirali 20 min pri 121 °C na 1,2 bara. Po avtoklaviranju smo steklenice zatisnili ter ohladili na 50 °C. Aseptično smo v brezprašni komori prelili gojišče v sterilne označene petrijeve plošče. Pustili smo jih na pultu, da so se strdile, nato pa shranili v hladilniku na 4 °C do uporabe.

Preglednica 5: Sestava 2TY gojišča

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Kazein pepton	16 g/L	Biolife
Kvasni ekstrakt	10 g/L	Sigma
NaCl	5 g/L	Mereck
Agar	20 g/L	Biolife

*Sterilizacija traja 20 min pri 121 °C na 1,2 bara.

- VG3 ("Vegetativno gojišče 3")

Vegetativno gojišče 3 (Kumar in sod., 2008) se uporablja za namnožitev sevov *Streptomyces* sp. za industrijsko proizvodnjo FK506. Mi smo ga uporabili za namnožitev *S. tsukubaensis*. Gojišče smo pripravili tako, da smo sojino moko prekuhali v polovični količini destilirane vode, dodali ostale sestavine, dobro premešali ter dolili destilirano vodo do zelenega volumna. Ko so se sestavine popolnoma raztopile smo uravnali pH na 7 z NaOH, prelili v erlenmajerice ter avtoklavirali 20 min pri 121 °C na 1,2 bara.

Preglednica 6: Sestava gojišča VG3

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Sojina moka	2,5 g/L	Krka
Dekstrini	10 g/L	Krka
Glukoza	1 g/L	Merck
Kvasni ekstrakt	5 g/L	Biolife
Kazein hidrolizat	7 g/L	Merck
KH ₂ PO ₄	0,02 g/L	Merck
NaCl	0,5 g/L	Merck
Mineralna raztopina VG3	1 mL/L	

*Sterilizacija traja 20 min pri 121 °C na 1,2 bara.

Preglednica 7: Sestava mineralne raztopine VG3

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,5 g	Merck
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,5 g	Kemika
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	0,1 g	Merck
MgSO ₄ x 4 H ₂ O	0,5 g	Sigma
CaCl ₂	2,0 g	Kemika
d H ₂ O	do 100 mL	

- PG3 ("Produksijsko gojišče 3")

Produksijsko gojišče 3 (Kumar in sod., 2008) smo uporabili za produkcijo FK506. Po namnožitvi v VG3 se 10 % inokuluma prenese v produksijsko gojišče PG3, s katerim spodbudimo nastajanje imunosupresorja FK506. Gojišče smo pripravili tako, da smo sprva sojino moko prekuhali v polovični količini destilirane vode, dodali ostale sestavine ter destilirano vodo do zelenega volumna. Ko so se sestavine popolnoma raztopile, smo naravnali pH na 6,5 z NaOH, nalili gojišče v erlenmajerice ter avtoklavirali 20 min pri 121 °C na 1,2 bara.

Preglednica 8: Sestava gojišča PG3

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Dekstrini	90 g/L	Krka
Glukoza	5 g/L	Merck
Sojina moka	10 g/L	Krka
Sojin pepton	10 g/L	Biolife
Glicerol	10 g/L	Kemika
KH ₂ PO ₄	1 g/L	Merck
CaCO ₃	1 g/L	Merck
Polietilen glikol	1 g/L	Fluka
Lizin	2,5 g/L	Sigma

*Sterilizacija traja 20 min pri 121 °C na 1,2 bara.

- DVG ("Definirano vegetativno gojišče")

Definirano vegetativno gojišče (modificirano po Yoon in Choi, 1997) se uporablja za namnožitve *S. tsukubaensis*. Gojišče smo pripravili tako, da smo topni škrob kuhali 20 min v polovični količini vode, nato dodali ostale sestavine ter destilirano vodo, naravnali pH na 7,00 z NaOH ter prelili v erlenmajerice po 96 mL gojišča avtoklavirali 20 min pri 121 °C na 1,2 bara. Ko se je gojišče ohladilo smo dodali sterilno 50 % raztopino glukoze in sicer 4 mL v 96 mL gojišča.

Preglednica 9: Sestava gojišča DVG

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Topen škrob	20 g/L	Sigma
Glukoza	20 g/L	Merck
Kvasni ekstrakt	20 g/L	Biolife
NaCl	0,5 g/L	Merck
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/L	Sigma
KNO ₃	1 g/L	Sigma
Mineralna raztopina DVG	1 mL/L	

*Sterilizacija traja 20 min pri 121 °C na 1,2 bara.

Preglednica 10: Sestava mineralne raztopine DVG

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g	Kemika
MnSO ₄ x H ₂ O	0,1 g	Merck
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g	Merck
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,4 g	Merck
d H ₂ O	do 20 mL	

- DPG ("Definirano produktivno gojišče")

Gojišče DPG (modificirano po Yoon in Choi, 1997) smo pripravili tako, da smo topni škrob kuhali 20 min v dveh tretjinah končnega volumna destilirane vode, nato dodali ostale sestavine ter destilirano vodo do zelenega volumna, naravnali pH na 6,80 z 1M NaOH, prelili v erlenmajerice po 49 mL gojišča ter avtoklavirali 20 min pri 121 °C na 1,2 bara. Ko se je gojišče ohladilo, smo dodali sterilno 50 % raztopino glukoze, in sicer 1 mL v 49 mL gojišča.

Preglednica 11: Sestava gojišča DPG

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
Topen škrob	60 g/L	Sigma
Glukoza	10 g/L	Merck
L-levcin	2,624 g/L	Fluka
Na- laktat (60%)	5,6 g/L	Sigma
MOPS	10 g/L	Sigma
NaCl	0,5 g/L	Merck
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/L	Sigma
Lizin	2,5 g/L	Sigma
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,025 g/L	Kemika
Mineralna raztopina DPG	1mL/L	

*Sterilizacija traja 20 min pri 121 °C na 1,2 bara.

Preglednica 12: Sestava mineralne raztopine DPG

Sestavina	Koncentracija v gojišču	Proizvajalec
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,5 g	Merck
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g	Merck
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,3 g	Sigma
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,3 g	Sigma
d H ₂ O	do 100 mL	

3.2.2 Raztopine

- Raztopina amonijevega sulfata

Amonijev sulfat smo uporabili kot dodaten vir dušika in v ta namen pripravili 1 molarno raztopino. Za pripravo 50 mL raztopine smo natehtali 6,605 g amonijevega sulfata ((NH₄)₂SO₄) z molekulsko težo 132,02 g/mol. Da bi v posamezni erlenmajerici dosegli

želeno koncentracijo amonijevega sulfata, smo dodali različne volumne raztopine amonijevega sulfata (preglednica 13). Volumen gojišča je 50 mL.

Preglednica 13: Volumen dodanega amonijevega sulfata glede na želeno koncentracijo

Želena koncentracija (g/L)	Molarna koncentracija (mM)	Volumen 1M raztopine (mL)
0,5	3,7	0,189
1	7,6	0,379
2	15,1	0,757
4	30,3	1,514

- Fosfatni pufer

Raztopino fosfatnega pufera smo uporabili kot dodaten vir fosforja tako, da smo različne volumne fosfatnega pufera dodajali v poskusne erlenmajerice. Fosfatni pufer smo pripravili iz kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) in dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4). Proizvajalec obeh kemikaliji je Merck. Ker nas zanima koncentracija fosfatnih ionov (PO_4^{3-}), smo to izrazili z molarostjo, in sicer smo pripravili 331,6 mM raztopino fosfatnih ionov. Za pripravo 1 L smo za natehtali 27,92 g KH_2PO_4 in 22,08 g K_2HPO_4 . Tako razmerje teh sestavin nam da želen pH in sicer 6,8. Preglednica 14 kaže volumen dodanega fosfatnega pufera za 50 mL končnega volumen gojišča.

Preglednica 14: Volumen dodanega fosfatnega pufera glede na želeno koncentracijo

Želena koncentracija (g/L)	Molarna koncentracija (mM)	Volumen fosfatnega pufera (mL)
0,25	2,6	0,397
0,5	5,3	0,794
1	10,5	1,588
2	21,1	3,175

- Raztopina glukoze

Glukozo smo dodajali po avtoklaviranju, saj smo ugotovili, da po sterilizaciji zelo zniža pH v bioproceni brozgi. Pripravili smo 50 mL 50 % raztopine glukoze tako, da smo raztopili 25 g glukoze v 20 mL destilirane vode. Ko se je glukoza popolnoma raztopila, smo dodali vodo do 50 mL. Tako raztopino smo nato ob ognju prefiltrirali v sterilno falkon centrifugirko in do uporabe shranili v hladilniku.

- 30 % raztopina glicerola

Raztopino glicerola (Kemika) smo uporabili za shranjevanje spor *S. tsukubaensis*, sev F9 (NRRL 18488) v zamrzovalniku na -20 °C. Za pripravo 200 mL 30 % glicerola potrebujemo 60 mL glicerola. Ker pa je precej viskozen, smo ga natehtali in njegovo maso določili glede na njegovo gostoto (1,26 kg/L - navaja proizvajalec) ter dodali vodo do končnega volumna. Avtoklavirali smo ga na 121 °C, 1,2 bara, 20 min.

- Fiziološka raztopina

Uporabili smo jo za spiranje biomase pri postopku priprave suhe biomase. Koncentracija NaCl (Merck) v raztopini je 9 mg/mL. Raztopino smo avtoklavirali na 121 °C, 1,2 bara, 20 min ter hranili v hladilniku.

- Metanol

Uporabili smo ga za ekstrakcijo FK506 iz procesne brozge. Proizvajalec je Merck.

3.2.3 Aparature

- Avtoklav Sutjeska
- Avtomatske pipete Gilson
- Brezprašna komora Iskra PIO
- Centrifuga Tehnica
- Mikrocentrifuga Beckman coulter
- Digestorij Med-lab Rauh
- Hladilnik (4 °C) Gorenje
- Inkubator Sutjeska
- Magnetno mešalo Ika works in Tehnica
- Mikroskop Motic
- Mikrovalvna pečica Sayo
- pH meter Mettler Toledo Sevenmulti
- Plinski gorilnik
- Stresalnik HT Infors Multitron
- Sušilnik Elektromedicina

- Sušilna omara Elektreomedicina
- Tehnica Sartorius excellence
- Analitska tehnica Sartorius TE2145
- Vrtinčnik Ika

3.2.4 Steklovina in ostali potrošni material

- Erlenmajerjeve steklenice (500 mL, 250 mL)
- Čaše (1500 mL, 500 mL, 50 mL)
- Merilni valj (1000 mL, 500 mL, 100 mL)
- Nastavki za avtomatske pipete (10 mL, 1 mL, 100 μ L)
- Serumske epruvete
- Falkon kivete
- Plastične petrijevke Golias
- Steklene vijale za HPLC Supleco
- Mikrokivete Eppendorf (2 mL)
- Eze za enkratno uporabo
- Steklene hokejke

3.3 METODE DELA

3.3.1 Priprava osnovne suspenzije spor *S. tsukubaensis*

Pri poskusu smo delali s *Streptomyces tsukubaensis*, sev F9 (NRRL 18488). Sev je prispevalo podjetje Acies Bio d.o.o.. Sprva smo izvedli redčitve spor za določanje CFU/mL in za preverjanje sterilnosti. Pripravili smo si tudi zalogo spor za nadaljnje delo. Redčitve smo konfluentno razmazali na gojišče ISP4 in inkubirali 10 dni na 26 °C. Nato smo v brezprašni komori v petrijevke z redčitvijo 10^{-3} dodali 2 mL 30 % glicerola ter s cepilno zanko sprostili spore in jih s Pasteurjevo pipeto prenesli v sterilno falkon kiveto. Spore smo nato centrifugirali pri 3.000 rpm 10 min, odstranili supernatant ter dolili svež 30 % glicerol do istega volumna, resuspendirali ter prenesli po 1 ml v mikrokivete. Primerno označene smo nato zamrznili.

3.3.2 Razvoj laboratorijskega bioprocasa

Poskus je bil razdeljen na tri dele. Prvi del je zajemal gojitev seva F9 v VG3 in PG3 (glej poglavje 3.2.1), s katerim smo želeli preveriti produkcijo FK506 v kompleksnem gojišču. V drugem in tretjem delu poskusa smo želeli testiranemu definiranemu produktivnemu gojišču (DPG) še povišati produktivnost z dodajanjem izbranih virov dušika in fosforja. Tako je drugi del poskusa zajemal definirano produktivno gojišče (DPG) (glej poglavje 3.2.1), kateremu smo dodajali različne koncentracije amonijevega sulfata, v tretjem delu poskusa pa smo definiranemu produktivnemu gojišču (DPG) dodali različne koncentracije fosfatnega pufra. Priprava obeh raztopin je opisana v poglavju 3.2.2.

3.3.3 Priprava gojišč

- Industrijsko gojišče VG3 in PG3

Pripravili smo dve 500 ml erlenmajerici z 100 mL vegetativnega gojišča VG3 ter po inokulaciji postavili na stresalnik 220 rpm, na 28 °C za 30 h. Po enodnevni inkubaciji smo vsako erlenmajerico vzorčili za spremljanje pmV, pH ter ostanka suhe biomase. 5 mL VG3 smo nato inokulirali v 50 mL PG3 ter nadaljevali stresanje na 220 rpm, na 28 °C za 6 dni. Na ta dan smo ponovno vzorčili, izvedli pa smo tudi ekstrakcijo FK506 z metanolom.

- Testirano gojišče DVG in DPG

Za vsak poskus smo pripravili dve 500 mL erlenmajerici z 100 mL vegetativnega gojišča DVG. Vsako smo inokulirali z 1 mL spor in dodali sterilno raztopino glukoze (glej poglavje 3.2.1 za natančnejši opis priprave gojišč). Erlenmajerici smo označili ter jih stresali na stresalniku z 220 rpm, pri 28 °C za 36 h. Po inkubaciji smo obe erlenmajerici vzorčili za spremljanje pmV, pH ter ostanka suhe biomase. Pred inokulacijo v produkcijsko gojišče smo vsebino obeh erlenmajeric združili. Poizkus smo nadaljevali z 50 mL produkcijskega gojišča v 250 mL erlenmajericah, v katere smo dodali 5 mL inokuluma. Vsak poskus je zajemal 5 ponovitev s 5 različnimi koncentracijami amonijevega sulfata oz. fosfatnega pufra. Produktivnemu gojišču smo dodajali različne volumne amonijevega sulfata oz. fosfatnega pufra, da smo dosegli želene koncentracije (glej poglavje 3.2.2). Vsaki erlenmajerici smo po avtoklaviranju dodali 5 mL inokuluma ter 1 mL sterilne raztopine glukoze (1 mL v 49 mL gojišča) ter jih postavili na stresalnik z

220 rpm, na 28 °C za 6 dni. Šesti dan kultivacije smo ponovno vzorčili in iz gojišča ekstrahirali FK506.

3.3.4 Določanje vsebnosti FK506

Po končani inkubaciji smo vzorčili v paralelkah z volumnom 5 mL ter vsakemu vzorcu dodali enak volumen metanola (5 mL). Vzorce smo stresali na stresalniku 1 h na 220 rpm, pri 28 °C. Ko se je vsebina posedla, smo s Pasteurjevo kapalko prenesli 1,5 mL zgornje faze v mikrokivete. Centrifugirali smo jih na 14.000 rpm 10 min ter prenesli 700 µL supernatanta v vijale za HPLC. Do analize smo jih shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

3.3.5 Določanje bioprocenih parametrov

Za spremljanje rasti celic ter poteka bioprocasa smo spremljali naslednje osnovne parametre:

- pH vrednost

Po zaključku vsakega bioprocasa smo izmerili pH vrednost brozge s pH metrom.

- pmV

Rast micelija oz. biomase smo izrazili s hitro metodo pmV (packed mycelial volume) kot navaja Yoon in Choi (1997). Odvzeli samo 10 mL vzorca brozge in prenesli v označene serumske epruvete, jih zamašili ter centrifugirali na 3.000 rpm 10 min. Takoj po zaključku centrifugiranja smo odčitali volumen celic, ki so se usedle na dno epruvete. Ta parameter je predstavljen kot % celične biomase.

- Suhi ostanek biomase

Za določanje suhega ostanka biomase smo mikrokivete stehtali. Vzorčili smo po 1 mL brozge. Ostanke gojišča smo 2x sprali tako, da smo po centrifugiranju supernatant odstranili, dodali fiziološko raztopino, resuspendirali ter ponovno centrifugirali na 8.000 rpm, 10 min. Tako pripravljene vzorce smo sušili 48 h na 80 °C ter jih po končanem sušenju ponovno stehtali. Maso suhega ostanka biomase smo dobili iz razlike med maso mikrokivet po sušenju in maso mikrokivet pred sušenjem.

3.3.6 Določanje vsebnosti FK506 s pomočjo metode HPLC

HPLC vzorce smo analizirali na Acies Bio d.o.o.. Za analizo smo uporabili HPLC aparaturo Nucleosil EC100-3 C18 (150x4 mm, 3 μ m, Machery-Nagel, Nemčija), s kolono z reverzno fazo. Za mobilno fazo smo uporabili acetonitril. Valovna dolžina za detekcijo FK506 je bila nastavljena na 210 nm, pretok pa na 1,5 mL/min. Pik FK506 smo prepoznali s pomočjo zunanega standarda FK506, (Lek d.d.). Za obdelavo podatkov smo uporabili program ChromeQuest.

3.3.7 Statistična obdelava

Razlike med kontrolnimi (gojišča brez dodanega amonijevega sulfata oz. fosfatnega pufra) in eksperimentalnimi skupinami, smo statistično obdelali s Studentovim T-testom s pomočjo spletnega orodja (Student's T-Test, 2011). Kot statistično značilne smo smatrali razlike pri katerih je bila p vrednost manjša od 0,05 ($p < 0,05$). Pri obdelavi podatkov smo izbrali skupino z neenakimi variancami ter eno repni t-test. Vrednosti zbrane v tabelah, ki so v prilogi.

4 REZULTATI

Namen diplomske naloge je bil razviti in optimizirati kemijsko-definirano gojišče, ki bo vsebovalo popolnoma topne surovine in bo hkrati še vedno omogočalo zadovoljive donose FK506. Pri poskusu smo uporabili mikroorganizem *Streptomyces tsukubaensis* (NRRL 18488).

Industrijska gojišča za proizvodnjo FK506 so kompleksna, saj so viri dušika in fosforja kompleksne surovine, kot npr. sojina moka in različni proteinski hidrolizati. Te surovine se ne raztapljajo popolnoma, zaradi česar je gojišče viskozno z netopnimi delci. Le-ti bistveno vplivajo na dobljene rezultate s spektrofotometričimi metodami ter metodo PCR v realnem času, ki se pogosto uporabljajo pri raziskavah na področju razumevanja izražanja ciljnih genov. Kompleksne vire dušika in fosforja smo tako odstranili in zamenjali z anorganskimi, v vodi popolnoma topnimi viri.

Pri poskusu smo želeli določiti koncentracijo anorganskega dušika in fosforja, ki bo omogočil najboljšo produkcijo FK506. Za vir dušika smo uporabili amonijev sulfat, kot vir fosforja pa fosfatni pufer. Sprva smo preverili donos FK506 v industrijskem gojišču (PG3); takšnemu donosu smo se želeli približati tudi v definiranem gojišču. Nato smo nadaljevali s testiranjem različnih koncentracij dušika in fosforja v definiranem gojišču DPG modificiranem po Yoon in Choi (1997).

4.1 PRODUKCIJA FK506 V KOMPLESNEM GOJIŠČU

Poskus smo pričeli s testiranjem donosa seva v industrijskem gojišču PG3 za proizvodnjo FK506 (Kumar in sod., 2008). Najprej smo kulturo *S. tsukubaensis* namnožili v gojišču VG3 (poglavje 3.2.1) in nato 10 % kulture inokulirali v produkcijsko gojišče PG3. Poskus v erlenmajericah smo izvedli dvakrat, prvič v štirih ponovitvah, drugič le v eni. Vsi rezultati so zbrani v preglednici 15. S poskusom smo dosegli donos FK506 okoli 35,1 mg/L s standardnim odklonom 9,5.

Preglednica 15: Rezultati parametrov bioprocesa vodenega v erlenmajerjevih steklenicah z industrijskim gojiščem (PG3)

Poskus	HPLC rezultati - c (FK506) (mg/L)	Suha biomasa (mg/mL)	pmV (%)	pH
1.	32,0	24,5	24	6,37
1.	39,6	26,9	18	6,31
1.	44,6	26,0	24	6,00
1.	39,1	25,0		6,24
2.	20,0		24	
Povprečje	35,1	25,6	23	6,23
Standardni odklon	9,5	1,1	3,0	0,2

Izvedli smo tudi dva poskusa v falkon kivetah in sicer prvič v osmih ponovitvah, drugič v sedmih ponovitvah. Vsi rezultati so zbrani v preglednici 16. Produkcija FK506 je v falkon kivetah povprečno znašala 45,1 mg/L s standardnim odklonom 9,9.

Preglednica 16: HPLC rezultati bioprocesa vodenega v falkon kivetah z industrijskim gojiščem (PG3)

Poskus	c (FK506) (mg/L)	
	1.	2.
Rezultati HPLC	46,6	29,7
	46,7	34,0
	47,6	34,2
	48,3	35,9
	49,1	38,5
	57,1	39,1
	58,6	46,4
	64,6	
Povprečje (mg/L)	45,1	
Standardni odklon	9,9	

Kot je razvidno iz rezultatov, PG3 gojišče omogoča zadovoljive in reproducibilne donose. Vendar je glede na naravo kompleksnega gojišča, ki vsebuje netopne komponente, zelo težko separirati nastalo biomaso od netopnih komponent gojišča. Zato smo v nadaljevanju poskusili izločiti iz sestave gojišča tiste komponente, ki so netopne, kar pa vključuje sojino moko, kvasni ekstrakt, hidrolizat kazeina in kalcijev karbonat.

4.2 VPLIV DUŠIKA NA PRODUKCIJO FK506

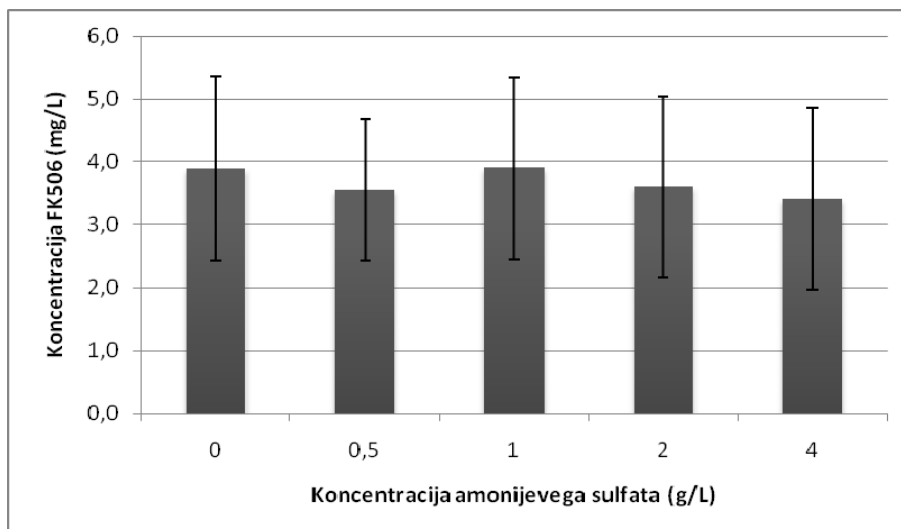
Vpliv dušika na produkcijo FK506 smo izvedli na modificiranem gojišču DPG po Yoon in Choi (1997). Kompleksne vire hranil kot so sojina moka, kvasni ekstrakt, hidrolizat kazeina smo zamenjali s kemijsko definiranimi viri. Tako sta bila vir ogljika topen škrob in glukoza, vir dušika pa amonijev sulfat.

Z dodatkom anorganskega vira dušika smo poskusili spodbuditi tvorbo biomase in posledično tudi donos FK506. Preverili smo, katera koncentracija amonijevega sulfata najbolj vpliva na rast in produkcijo. Tako smo testirali naslednje koncentracije amonijevega sulfata: 0; 0,5; 1; 2 ter 4 g/L.

4.2.1 **Produkcija FK506 z izbranim virom dušika**

Po vsakem zaključenem biosinteznem procesu smo procesno brozgo obdelali z dodatkom metanola (poglavje 3.3.4) in s pomočjo HPLC metode določili vsebnost FK506, kot je opisano v poglavju 3.3.6.

Na sliki 11 je prikazana produkcija FK506 glede na koncentracijo amonijevega sulfata. V testnem gojišču (brez amonijevega sulfata) je le ta znašala 3,9 mg/L v ostalih vzorcih pa bil razpon med 3,4 in 3,6 g/L, kar je občutno manj kot v kompleksnem gojišču. Dodatek amonijevega sulfata ni vplival na donos imunopresanta, ne glede na koncentracijo dodanega amonijevega dušika, kar smo tudi statistično dokazali. P-vrednost je pri vseh poskusih večja od 0,05 ($0,073 \leq p \leq 0,497$), kar pomeni, da ni statistično značilno.



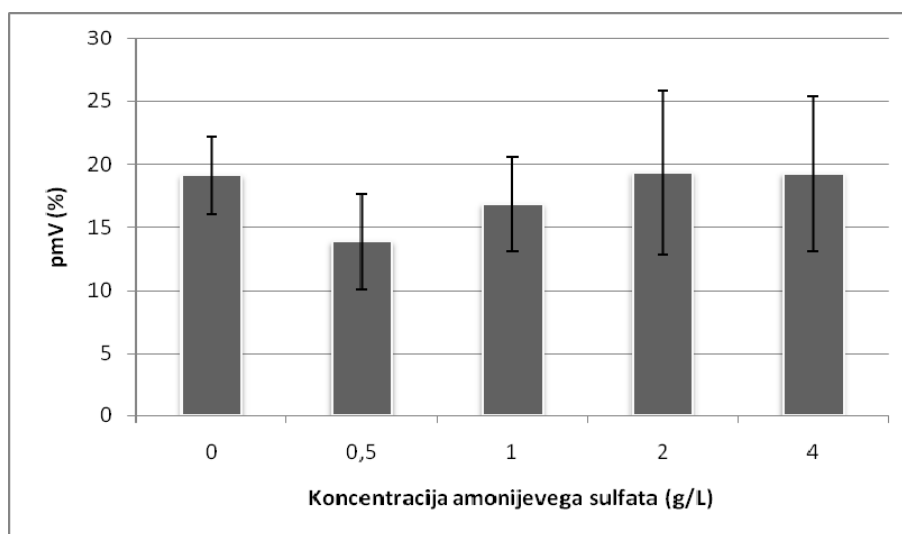
Slika 11: Produkcija FK506 glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

4.2.2 Vpliv izbranega vira dušika na tvorbo biomase

- Vpliv koncentracije izbranega vira dušika na pmV vrednosti ob koncu biosinteznega procesa (vsebnost mokre biomase)

Po vsaki ponovitvi biosinteznega procesa smo odvzeli 10 mL brozge ter določili vsebnost celične biomase (poglavje 3.3.5). Ta parameter (mokra biomasa) nam je omogočil hitro (manj kot 30 min) ovrednotenje tvorbe biomase v primerjavi z merjenjem suhe biomase.

Na sliki 12 je prikazana pmV vrednost glede na koncentracijo amonijevega sulfata. V testnem gojišču (brez amonijevega sulfata) je pmV 19 %. Pri mokri biomasi sta poskusa z višjima koncentracijama amonijevega sulfata statistično neznačilna ($p = 0,468$ in $0,475$). Poskusa z nižjima koncentracijama sta statistično značilna (manj kot 0,05), vendar sta v primerjavi z osnovnim gojiščem vrednosti pmV nižji, kar pomeni, da z dodatkom amonijevega sulfata nismo izboljšali tvorbo biomase.

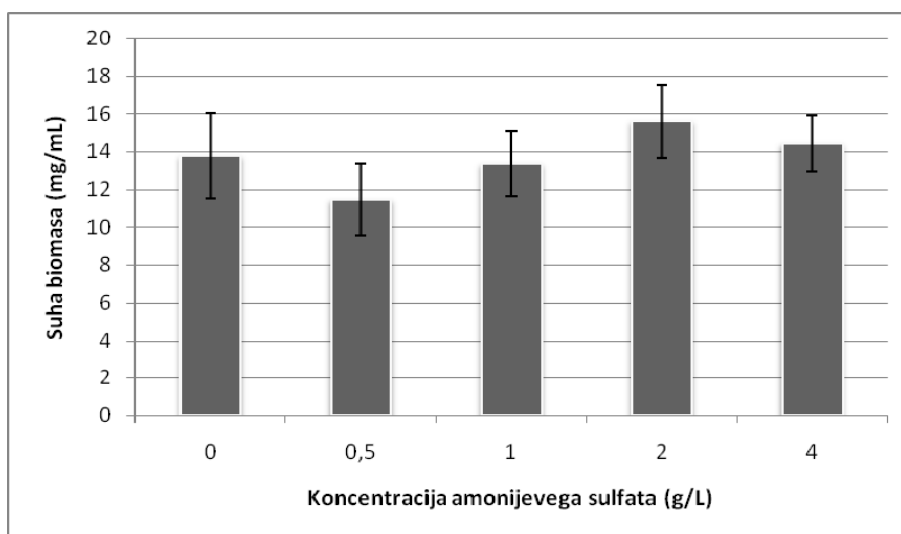


Slika 12: Vsebnost pmV (mokre biomase) glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

- Vpliv koncentracije izbranega vira dušika na suho biomaso ob koncu biosinteznega procesa

Postopek določitve suhe biomase je dolgotrajnejši, saj so rezultati znani po dveh dnevih. Postopek omogoča bolj realne meritve biomase, saj z izpiranjem odstranimo neželene produkte iz supernatanta. Zato nam je suha biomasa služila za primerjavo z vrednostjo mokre biomase (pmV).

Na sliki 13 je prikazana vsebnost suhe biomase glede na koncentracijo amonijevega sulfata po končani kultivaciji. V osnovnem gojišču (brez amonijevega sulfata) je suha biomasa 13,8 mg/mL. Poskusa s koncentracijo 1 in 4 g/L amonijevega sulfata sta statistično neznačilna ($p = 0,166$ in $0,152$), kar pomeni da z dodatkom le-tega nismo spodbudili tvorbo biomase. Poskusa z 0,5 in 2 g/L amonijevega sulfata pa sta statistično značilna ($p < 0,05$), vendar je v obeh primerih tvorba biomase v primerjavi z osnovnim gojiščem nekoliko manjša.



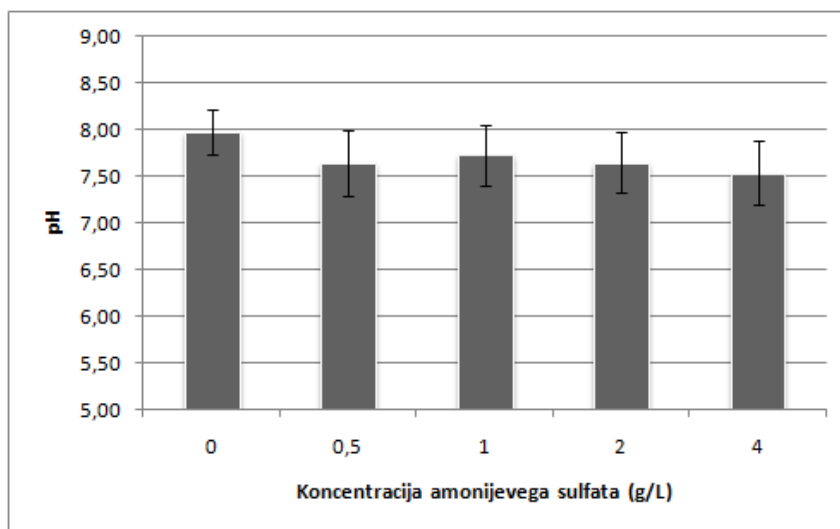
Slika 13: Končna vsebnost suhe biomasa glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

Iz slik 12 in 13 je razvidno, da sta vrednosti mokre (pmV) in suhe biomase primerljivi. Zato lahko zaključimo, da dodatek amonijevega sulfata nima signifikantnega vpliva na tvorbo biomase.

4.2.3 Regulacija pH vrednosti gojišča z uporabo puferskega sistema

pH vrednost brozge v času biosinteznega procesa lahko vpliva na končni donos FK506. V eksperimentih, ki se izvajajo v erlenmajerjevih steklenicah na stresalniku, je težko regulirati pH vrednost v času biosinteznega postopka. Industrijska gojišča v ta namen vsebujejo CaCO_3 . Z njegovo odstranitvijo v testnem gojišču, smo uravnavanje pH vrednosti še dodatno onemogočili. Zato smo za potrebe uravnavanja puferskega sistema v sestavo gojišča uvedli dodatek MOPS (3-N-morpholine propanesulfonic acid). Ta naj bi preprečeval preveliko nihanje pH med samim bioprosesom ter tako omogočil nemoteno rast našemu mikroorganizmu.

Po končani kultivaciji je pH osnovnega gojišča 7,98. Pri poskusih z dodanim amonijevim sulfatom so končni pH nižji in ne presežejo 7,73. Pomembno je, da so vse pH vrednosti še vedno v nevtralnem pH območju. Previsok pH bi lahko povzročil razpad FK506, kar bi vodilo v napačne rezultate o vsebnosti FK506 v bioproceni brozgi.



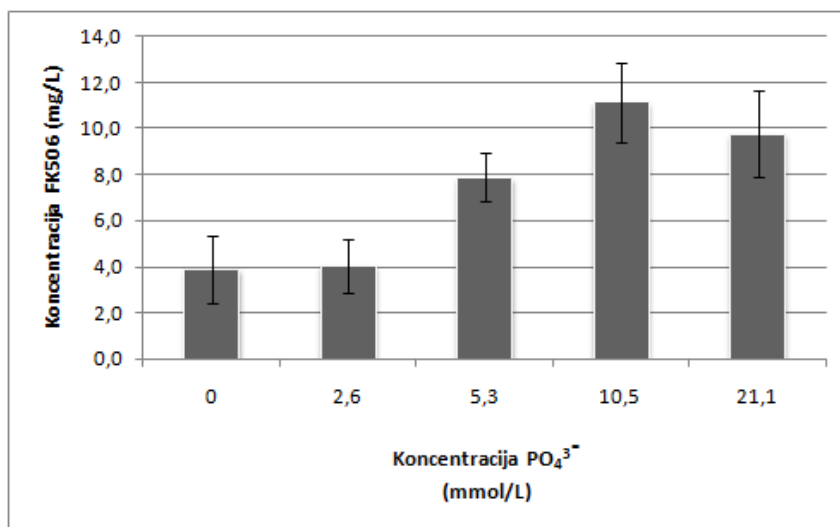
Slika 14: pH vrednost brozge z dodanim MOPS pri različnih koncentracijah amonijevega sulfata po 6. dnevih kultivacije

4.3 VPLIV FOSFORJA NA PRODUKCIJO FK506

Fosfor je pomemben sestavni del celičnih komponent. Zato smo se odločili, da testiramo vpliv dodatnega vira fosforja (anorganski vir), in sicer v obliki fosfatnega pufra, kar naj bi hkrati tudi vplivalo na pH vrednost brozge v času biosinteznega procesa. pH vrednost fosfatnega pufra znaša 6,80, podobno kot začetna pH vrednost same brozge. Za pripravo fosfatnega pufra smo uporabili puferski sistem kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) in dikalijevega hidrogen fosfata (K_2HPO_4). Ker nas je zanimal vpliv fosfatnih ionov na produkcijo FK506 in vpliv na ostale parametre biosinteznega procesa, smo koncentracijo le-teh izrazili v mM. Tako so testirane koncentracije naslednje: 0; 2,6; 5,3; 10,5 ter 21,1 mmol/L fosfatnih ionov.

4.3.1 **Produkcija FK506 z izbranim virom fosforja**

Po vsakem končanem biosinteznem procesu smo vzorec fermentacijske brozge obdelali z metanolom in vsebnost FK506 ovrednotili s pomočjo HPLC metode. Dodatek fosfatnih ionov pozitivno vpliva na končni donos FK506 in razlike med pridobljenimi količinami FK506 so statistično značilne ($p < 0,05$) razen pri eksperimentalni varianti z 2,6 mmol/L fosfatnih ionov, ki se ni statistično značilno razlikovala od kontrole ($p = 0,208$). Optimalen donos FK506 smo tako dosegli pri 10,5 mM koncentraciji fosfatnih ionov, ko smo prvič uspeli preseči mejo vsebnosti 10 mg/L FK506, in sicer 11,2 mg/L. Produkcija je visoka tudi pri koncentraciji 21,1 mM fosfatnih ionov, ko le-ta znaša 9,8 mg/L.

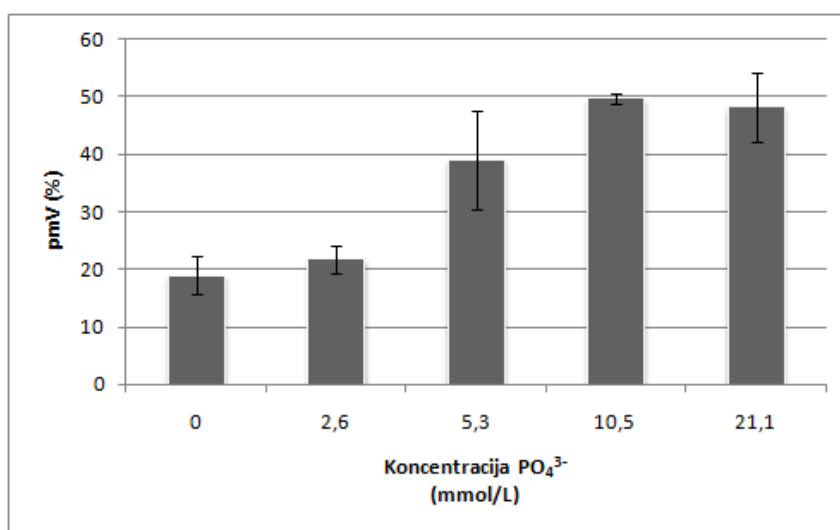


Slika 15: Produkcija FK506 glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

4.3.2 Vpliv koncentracije fosfatnega iona na tvorbo biomase

- Vpliv koncentracije fosfatnega iona na pmV vrednost ob koncu biosinteznega procesa (vsebnosti mokre biomase)

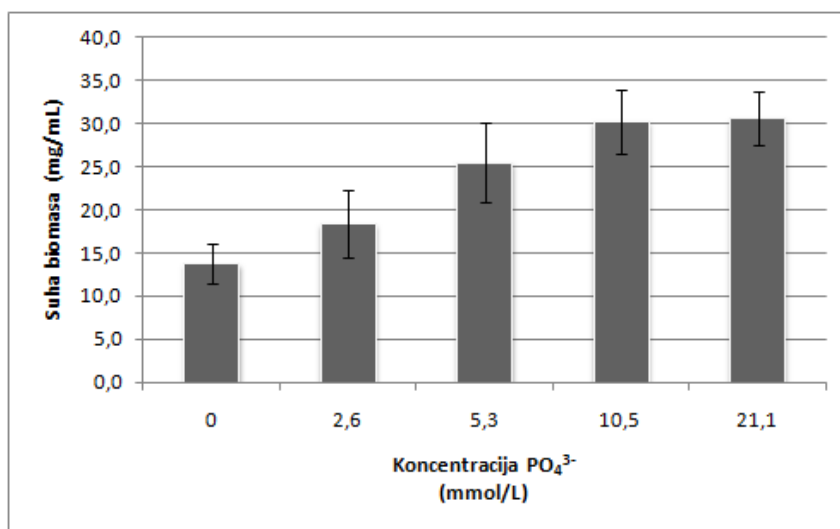
Tudi pri teh poskusih smo določili pmV vrednost ob koncu bioprocasa. Na sliki 16 je razvidno, da je vsebnost biomase (pmV) ob koncu procesa naraščala z višjo koncentracijo fosfatnega iona. Najvišja pmV vrednost je dosežena pri dodatku fosfatnega pufra nad 5,3 mmol/L. Pri tej vrednosti je tudi donos FK506 ob koncu procesa najvišji.



Slika 16: Vsebnost mokre biomase (pmV) glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

- Vpliv koncentracije fosfatnega iona na suho biomaso ob koncu biosinteznega procesa

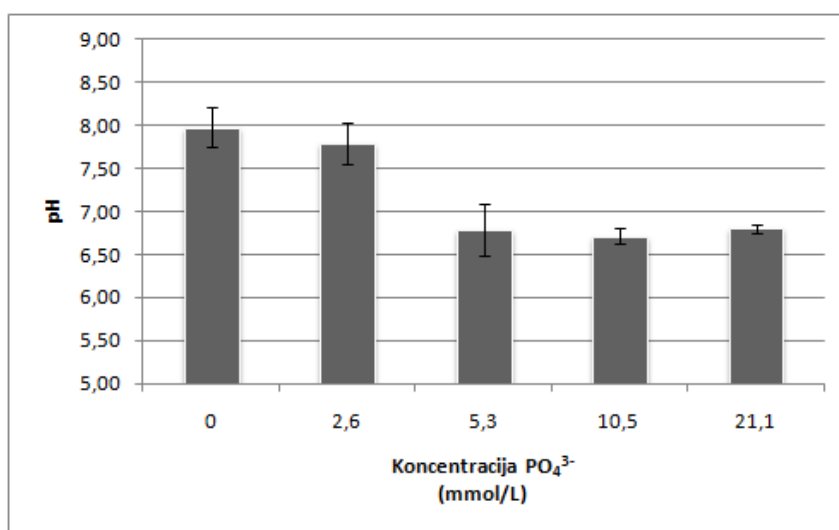
Parametra za suho biomaso in vsebnost pmV sta primerljiva (slika 17). Z višanjem koncentracije fosfatnih ionov se vsebnost suhe kot tudi mokre biomase (pmV) povečuje.



Slika 17: Končna vsebnost suhe biomase glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

4.3.1 Regulacija pH vrednosti gojišča z uporabo puferskega sistema

pH vrednost brozge ob koncu procesa v gojišču z višjo vrednostjo fosfatnega iona je nekoliko nižja, kar kaže na povečanje aktivnosti metabolnih procesov. Vendar je dodatek biološkega pufra MOPS še vedno uspešno uravnaval pH vrednost gojišča z povišano koncentracijo fosfatnih ionov, da so se končne vrednosti pH še vedno gibale v nevtralnem pH območju, kot je razvidno iz slike 18.



Slika 18: pH vrednost brozge z dodanim MOPS pri različnih koncentracijah fosfatnega iona po 6. dnevih kultivacije

5 RAZPRAVA

Poglavitni namen diplomske naloge je bila optimizacija definiranega gojišča, ki vsebuje popolnoma topne surovine in bi hkrati še vedno omogočalo relativno visoke donose FK506. FK506 oz. takrolimus je imunosupresant z velikim pomenom v medicini (Kino in sod., 1987a; Bhuvana in sod., 2010; Karpas in sod., 1992). Zaradi tega so raziskave na področju razumevanja izražanja ciljnih genov, ki so vpleteni v regulacijo in sintezo FK506, zelo pomembne. V ta namen bi naše optimizirano gojišče, ki vsebuje le topne komponente, omogočilo bolj optimalne postopke pri izvedbi študij, v katerih se uporabljajo spektrofotometrične metode ter metode PCR v realnem času, hkrati pa bo omogočilo boljše razumevanje biosinteznega procesa za produkcijo FK506 s pomočjo produkcijskega seva *S.tsukubaensis*.

5.1 INDUSTRIJSKO GOJIŠČE

Industrijsko gojišče je kompleksno, saj vsebuje vire hranil, katerim ne moremo natančno določiti sestavo. V našem primeru sta to sojina moka in sojin pepton. Industrijsko gojišče pa vsebuje še netopne komponente (npr. CaCO_3), ki tudi pogosto motijo pri izolaciji mRNA in meritvah različnih parametrov. *Streptomyces tsukubaensis*, F9 (NRRL 18488), v industrijskem gojišču omogoča reproducibilnost in končne donose okoli 35 mg/L. Kot že povedano smo nekaj poskusov v kompleksnem gojišču izvedli tudi v falkon kivetah, v katerih je produkcija znašala 45,1 mg/L, ker je za več kot 10 % boljše od produkcije v erlenmajericah. Boljša aeracija in večja izguba vode (izparevanje), je verjetno tudi še dodaten razlog za nekoliko višje donose v falkonovih kivetah.

5.2 ZAMENJAVA KOMPLEKSNEGA VIRA DUŠIKA (SOJINE MOKE) Z AMONIJEVIM SULFATOM IN VPLIV KONCENTRACIJE AMONIJEVEGA SULFATA NA PRODUKCIJO FK506

Kompleksne, slabo topne vire dušika (sojina moka in sojin pepton) smo zamenjali z anorganskim virom dušika, in sicer z amonijevim sulfatom. Testirali smo, katera koncentracija amonijevega sulfata bistveno vpliva na produkcijo FK506. Uporabili smo naslednje štiri koncentracije in sicer 0,5, 1, 2 in 4 g/L. Rezultati so pokazali, da je povprečna produkcija osnovnega gojišča, ki ne vsebuje amonijevega sulfata, okrog 3,9 mg/L, kar je glede na donose dobljene z industrijskim gojiščem zelo nizko. Z dodajanjem različnih koncentracij amonijevega sulfata ni bilo vidnejših sprememb v produkciji. Pri koncentraciji amonijevega sulfata v vrednosti 1 g/L je produkcija enaka gojišču brez amonijevega sulfata. Z višanjem koncentracije dodatnega vira dušika nismo izboljšali produkcije.

Amonijev sulfat je po literaturi sodeč dober spodbujevalec tvorbe biomase (Yoon in Choi, 1997). V našem gojišču, modificiranem po tem članku, pa lahko trdimo, da to ni tako. Z dodatkom amonijevega sulfata pri koncentraciji 2 g/L lahko glede na naše rezultate ugotovimo pozitiven učinek na tvorbo biomase, kjer je tvorba biomase veliko boljša. Pri ostalih koncentracijah pa ni videti, da bi povečana koncentracija amonijevega sulfata spodbujala tvorbo biomase. Sklepamo lahko, da je tvorba biomase slaba zaradi odsotnosti vira fosforja ali pa je v osnovnem gojišču že zadostna koncentracija dušika. Enako kot za biomaso velja tudi za donos FK506. Višje koncentracije amonijevega sulfata niso omogočale višjega donosa FK506.

Pri bioprocesu smo določali tudi pH gojišča, s katerim smo želeli spremljati potek bioprocasa. Pri osnovnem procesu je vrednost končnega pH 7,98, pri ostalih koncentracijah nekoliko nižji, okrog 7,64. Poskusi so pokazali, da pH vrednost od začetne vrednosti 6,8 skozi cel bioproces narašča. Po literaturi (Kino in sod., 1987a) končni pH preseže začetno pH vrednost, kar je v skladu z našimi rezultati. Po literaturi pa končni pH ne preseže za 1 vrednost, kakor pri naših rezultatih. Višji pH je lahko pokazatelj slabega delovanja puferskega sistema ali pa znižane aktivnosti metabolnih procesov, kar bi sovpadalo z nizko vsebnostjo FK506 in nizko koncentracijo biomase.

Torej, lahko zaključimo, da povečevanje vsebnosti anorganskega dušika ne deluje pozitivno na donos FK506. Torej, dušik verjetno ni limitirajoč faktor pri razvoju tega bioprocasa v danih pogojih gojenja.

5.3 VPLIV FOSFATNEGA IONA NA PRODUKCIJO FK506

Martin in Demain (1980) trdita, da koncentracija fosfata nad 10 mM zavira biosintezo večine antibiotikov, vendar to ne velja za FK506. Yoon in Choi (1997) sta dosegla najboljšo produkcijo FK506 z dodatkom 10 in 30 mM fosfatnih ionov, kar smo dokazali tudi mi, saj smo zabeležili najboljšo produkcijo, 11,2 mg/L, pri dodatku 10,5 mM fosfatnih ionov. Že z dodatkom fosfatnih ionov v koncentraciji 5,3 mM, se je produkcija FK506 povečala za več kot 100 %. Tako lahko trdimo, da uporaba višje koncentracije fosfatnega iona v gojišču pozitivno vpliva na produkcijo FK506, saj v osnovnem gojišču ni bilo dodatnih virov fosforja.

Martin in Demain (1980) trdita tudi, da koncentracija fosfata od 0,3 do 300 mM spodbuja celično rast. V našem primeru je dodatek fosfatnega pufra bistveno povečala tvorbo biomase, kar je nekoliko v nasprotju s člankom Yoon in Choi (1997), kjer dodatek fosfata tja do 60 mM ne vpliva na tvorbo biomase. Največji donos biomase dosežemo pri koncentraciji fosfatnih ionov 10,5 mM, kar se tudi popolnoma ujema z najvišjim donosom

FK506. To je lepo razvidno iz rezultatov meritev suhe biomase, kot tudi iz mokre biomase (pmV).

Dvig koncentracije fosfatnega iona je v danih pogojih bistveno dvignil donos FK506, iz česar lahko sklepamo, da je fosfor pomemben za produkcijo, kot tudi za samo rast. Torej je verjetno poglavitni razlog za donos FK506 v naših eksperimentih izboljšana tvorba biomase. Tudi pH vrednost je v gojišču z višjo vrednostjo fosforja ob koncu bioprocesa nižja, kar kaže na povečano metabolno aktivnost, na račun katere je prišlo do dviga tvorbe biomase.

6 SKLEPI

- Dodatek amonijevega sulfata k definiranemu produkcijskemu gojišču (DPG) ne deluje pozitivno na tvorbo biomase in produkcijo FK506, kar je v nasprotju z literaturnimi podatki.
- Dodatek fosforja k definiranemu produkcijskemu gojišču (DPG) poveča donos biomase in donos FK506.
- Donos v DPG gojišču je bil najboljši (11,2 mg/L) ob dodatku 10,5 mmol/L fosfatnih ionov.

7 POVZETEK

Streptomicete so pomembna skupina bakteriji, saj so 50 % vsem izoliranim vrstam dokazali sposobnost biosinteze sekundarnih metabolitov (Madigan in sod., 2006). So izjemno pomemben vir biološko aktivnih snovi tudi v moderni medicini, kjer je potreba po zdravilnih učinkovinah vse večja. Eden od pomembnih sekundarnih metabolitov so tudi imunosupresanti, spojine, ki zavirajo imunski sistem in s tem omogočajo uspešne presaditve organov. V diplomski nalogi smo se posvetili imunosupresantu FK506 (tacrolimus), ki je v medicini pogosto uporabljen. Z raziskovanjem se njegovo področje ne omejuje več le na post operativno terapijo, ampak tudi na zdravljenje nekaterih avtoimunskih bolezni, mogoča bi bila tudi zdravljenja virusnih obolenj (Bhuvana in sod., 2010; Karpas in sod., 1992; Reis in sod., 2006)

Z diplomskim delom smo želeli optimizirati definirano gojišče, ki bi vsebovalo popolnoma topne surovine in bi hkrati še vedno omogočalo visoke donose FK506. Njegova uporaba bi za spektrofotometrične metode ter metode PCR v realnem času omogočale boljšo analizo v primerjavi s tistimi, narejenimi na kompleksih gojiščih. S tem bi bistveno povečali kakovost raziskav na področju razumevanja izražanja ciljnih genov, ki so vpleteni v regulacijo in biosintezo FK506.

Pri poskusih smo uporabili *S. tsukubaensis*, sev F9 (NRRL 18488). Sprva smo testirali donosnost v industrijskem gojišču, nato pa smo poskušali izboljšati definirano gojišče z dodatkom različnih koncentracij amonijevega sulfata in fosfatnega pufra. Po končani inkubaciji in ekstrakciji FK506, smo njegovo vsebnost določili s HPLC metodo, za spremljanje poteka bioprocasa pa smo določali še mokro (pmV) in suho biomaso ter pH gojišča.

Ugotovili smo, da dodatek amonijevega sulfata ne spodbuja tvorbe biomase in biosintezo FK506 in nasploh nima večjega vpliva na rast mikroorganizma. Sklepamo lahko, da je tvorba biomase slaba zaradi odsotnosti vira fosforja ali pa je v osnovnem gojišču že zadostna koncentracija dušika. Po drugi strani pa smo ugotovili, da smo z dodajanjem

fosfatnih ionov spodbudili tako rast kakor tudi produkcijo FK506 (takrolimusa). Določili smo optimalno koncentracijo fosfatnega iona, ki znaša 10,5 mmol/L in omogoča končne donose FK506 okoli 11,2 mg/L, kar že zadostuje za potrebe študij izražanja genov pri sevu *S. tsukubaensis*.

8 VIRI

- Baerson S. R., Rimando A. 2007. A plethora of polyketides: structures, biological activities and enzymes. V: Polyketides. Rimando A., Baerson S. R. (eds.). ACS Symposium series, Vol. 955. Washington, American Chemical Society: 2–14
- Bhuvana K., Sarala N., Gurcharan S., Kumar T. N. 2010. Topical tacrolimus: Pharmacological aspects. International Journal of Biology and Medical Research, 1, 4: 337–340
- Bibb M. J. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Microbiology, 142: 1335–1344
- Bibb M. J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. Current Opinion in Microbiology, 8: 208–215
- Chakraburttty R., Bibb M. J. 1997. The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. Journal of Bacteriology, 179: 5854–5861
- Challis G. L., Hopwood D. A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 100, Suppl. 2: 14555 –14561
- Demain A. L. 1992. Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. Ciba Foundation Symposium, 171: 3–16
- Döhren H., Gräfe U. 1997. General aspect of secondary metabolism. V: Biotechnology: a multi - volume comprehensive treatise. 2nd. Vol. 7: Products of secondary metabolism. Rehm H.-J., Reed G. (eds.). Weinheim, VCH: 1–55
- Eikelboom D. H. 2000. Process control of activated sludge plants by microscopic investigation. London, IWA Publishing: 110–110

- Hanson J. R. 2003. Natural products: the secondary metabolites. Cambridge, Royal Society of Chemistry: 2–2
- Hesketh A., Sun J., Bibb M. J. 2001. Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 39: 136–144
- Heuslera K., Pletscherb A. 2001. The controversial early history of cyclosporin. *Swiss Medical Weekly*, 131: 299–203
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (eds.). 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins: 668–668
- Hopwood D. A. 2002. *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 468–471
- Hütter R. 1986. Overproduction of microbial metabolites. V: *Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes. Vol. 4 : Microbial products II*. Pape H., Rehm H. J. (eds.). Weinheim, VCH: 4–17
- Ingram C., Delic I., Westpheling J. 1995. ccrA1: a mutation in *Streptomyces coelicolor* that affects the control of catabolite repression. *Journal of Bacteriology*, 177, 12: 3579–3586
- Kämpfer P. 2006. The family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. V: *The prokaryotes. Vol 3. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycestes*. Dworkin M. (ed). 3rd ed. New York, Springer: 538–604
- Karpas A., Lowdell M., Jacobson S. K., Hill F. 1992. Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506. *Medical Science*, 89: 8351–8355

- Kato J. Y., Miyahisa I., Mashiko M., Ohnishi Y., Horinouchi S. 2004. A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*, 184, 7: 2206–2211
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. Norwich, The John Innes Foundation: 2–33
- Kino T., Hatanaka H., Hashimoto M., Nishiyama M., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H. 1987a. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*; I. Fermentation, isolation, physico-chemical and biological characteristics. *Journal of Antibiotics*, 40, 9: 1249–1255
- Kino T., Hatanaka H., Miyata S., Inamura N., Nishiyama M., Yajima T., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., Ochiai T. 1987b. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*; II. Immunosuppressive effect of FK506 *in vitro*. *Journal of Antibiotics*, 40, 9: 1256–1265
- Klee C. B., Ren H., Wang X. 1998. Regulation of the calmodulin – stimulated protein phosphatase, calcinerum. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 22: 13367 –13370
- Kontro M., Lignell U., Hirvonen M.-R., Nevalainen A. 2005. pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 32–38
- Kumar P., Sharma S., Shukla A., Kumar S., Maurya R. K., Katial V., Mitra A., Gigras P. 2008. Production of tacrolimus (FK-506) using new *Streptomyces* species. European Patent Office EP1751272 (B1): 14 str
- Kunz J., Hall M. N., 1993. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *TIBS: Trends in Biochemical Sciences*, 18: 334–338
- Kuščer E., Raspor P., Petković H. 2005. Rational design of polyketide natural products. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 4: 403–410

- Lechevalier M. P., Lechevalier H. 1970. Chemical composition as a criterion in classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20: 435–443
- Madigan M. T., Martinko M. J. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. New Jersey, Prentice-Hall: 390–393, 946–946
- Martin J. F., Denain A. L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 44, 2: 230–251
- Martin J. F. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *Journal of Bacteriology*, 186, 16: 5197–5201
- Martin J. F., Casqueiro J., Liras P. 2005. Secretion system for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 282–293
- Mo S., Kim D. H., Lee J. H., Park J. W., Basnet D. B., Ban Y. H., Yoo Y. J., Chen S., Park S. R., Choi E. A., Kim E., Jin Y. Y., Lee S. K., Park J. Y., Liu Y., Lee M. O., Lee K. S., Kim S. J., Kim D., Park B. C., Lee S., Kwon H. J., Suh J. W., Moore B. S., Lim S. K., Yoon Y. J. 2011. Biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit for the FK506 polyketide synthase proceeds through a dedicated polyketide synthase and facilitates the mutasynthesis of analogues. *Journal of American Chemical Society*, 133: 976–985
- Motamedi H., Shafiee A., 1998. The biosynthetic gene cluster for macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry*, 256: 528–534
- Motamedi H., Cai S.-J., Shafiee A., Elliston K. O. 1997. Structural organization of multifunctional polyketide synthase involved in biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry*, 244: 74–80
- Ohnishi Y., Seo J.-W., Horinouchi S. 2002. Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 216: 1–7

- Petechuk D. 2006. Organ transplantation: health and medical issue today. Westport, Greenwood Press: 11–12
- Reis S. A., Moussatché N., Damaso C. R. A. 2006. FK506, a secondary metabolite produced by *Streptomyces*, presents a novel antiviral activity against Orthopox virus infection in cell culture. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 1364–1380
- Sambook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1659–1659
- Schrempfe H. 2006. The family *Streptomycetaceae*, Part II: Molecular biology. V: The prokaryotes. Vol 3. *Archea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycestes*. Dworkin M. (ed). 3rd ed. New York, Springer: 538–604
- Shirling E. B., Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16: 313–340
- Sola-Landa A., Moura R. S., Martin J. F. 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10: 6133–6138
- Student's T-Test. 2011. Free on-line t-Test calculator
<http://www.studentsttest.com> (november 2012)
- Tanaka H., Kuroda A., Marusawa H., Hatanaka H., Kino T., Goto T., Hashimoto M. Taga T. 1987. Structure of FK506: A novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *Journal of the American Chemical Society*, 109: 5031–5033
- Uchida K., Seino A. 1997. Intra- and intergeneric relationships of various *Actinomycete* strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate test. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1: 182–190

- Vining L. C. 1986. Secondary metabolism. V: Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 volumes. Vol. 4 : Microbial products II. Pape H., Rehm H. J. (eds.). Weinheim, VCH: 20–38
- Waksman S. A., Henrici A. T. 1943. The nomenclature and classification of the *Actinomycetes*. *Journal of Bacteriology*, 46: 337–341
- White D. 1995. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2nd ed. New York, Oxford, Oxford University Press: 224–230
- Wohlleben W., Mast Y., Reuther J. 2011. Regulation of nitrogen assimilation in *Streptomyces* and other *Actionbacteria*. V: *Streptomyces: Molecular biology and biotechnology*. Dyson P. (ed.). Norfolk, UK, Caister Academic Press: 125–136
- Yoon J. Y., Choi C. Y. 1997. Nutrient effects on KF-506, a new immunosuppressant. Production by *Streptomyces* sp. in a defined medium. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 6: 599–603

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Hrvoje Petkoviću za vodenje, pomoč in strokovne popravke pri izdelavi diplomskega dela ter recenzentki prof. dr. Ines Mandić Mulec za temeljito recenzijo.

Zahvaljujem se tudi delovnemu mentorju Marku Blažiču za pomoč in vodenje pri izvedbi praktičnega dela ter za pomoč pri iskanju literature. Zahvalila bi se tudi podjetju Acies Bio d.o.o. za prispevanje delovnega seva in dr. Jaki Horvatu za obdelavo vzorcev.

Posebna zahvala pa gre moji mami Suzani, ki mi je omogočila študij in me je v vseh teh letih podpirala. Hvala tudi mojemu možu Borutu in sinu Gabrielu za potrpežljivost pri zaključku diplome.

Hvala vam!

PRILOGE

Priloga A: Produkcija FK506 glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

Koncentracija amonijevega sulfata	0	0,5	1	2	4	g/L
Rezultati HPLC - koncentracija FK506	1,6 3,9	2,2 3,4	2,9 3,3	2,5	1,5 3,6	mg/L
	1,7 3,9	2,2 3,5	2,9 3,3	2,7	1,5 3,8	
	1,8 4,1	2,5 3,6	2,9 3,3	2,7	1,5 3,8	
	1,8 4,5	2,5 3,7	3,0 3,4	2,7	1,6 3,8	
	1,9 4,8	2,5 3,7	3,0 3,5	2,8	1,6 3,9	
	2,1 4,8	2,6 3,9	3,0 3,6	3,0	1,7 4,0	
	2,1 4,9	2,6 4,0	3,0 4,0	3,0	2,1 4,1	
	2,3 5,0	2,6 4,1	3,0 5,8	3,0	2,1 4,5	
	2,4 5,1	2,6 4,2	3,0 6,0	3,1	2,4 5,1	
	2,4 5,2	3,1 4,9	3,1 6,8	3,1	2,5 5,5	
	2,4 5,2	3,2 5,2	3,2 7,0	3,2	2,8 5,7	
	2,5 5,2	3,3 6,2	3,2 7,2	3,3	3,0 5,8	
	2,7 5,2	3,4 6,5		5,6	3,3 6,2	
	2,7 5,4			6,4	3,4	
	2,8 5,6			6,9		
	2,8 5,6					
	3,3 5,8					
	3,4 5,9					
	3,5 5,9					
	3,5 6,0					
3,7 6,0						
3,7 6,0						
Povprečje	3,9	3,5	3,9	3,6	3,4	mg/L
Standardni odklon	1,5	1,1	1,5	1,4	1,5	
p vrednost*		0,139	0,497	0,255	0,073	

*Primerjava kontrolne (gojišče brez dodanega amonijevega sulfata) skupine s testno skupino

Priloga B: Končna mokra biomasa (pmV) glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

Koncentracija amonijevega sulfata	0	0,5	1	2	4	g/L	
Rezultati pmV	14	20	9	13	10	10	%
	14	20	9	14	12	12	
	14	20	9	14	14	22	
	14	22	10	14	14	24	
	15	22	10	14	15	24	
	15	22	10	14	15	24	
	16	22	11	15	16	24	
	17	22	12	16	16	24	
	17	22	12	19	18		
	18	22	12	19	20		
	18	22	12	20	22		
	20	22	12	20	22		
	20	22	13	20			
	20	22	13	22			
	20						
Povprečje	19	14	17	19	19	%	
Standardni odklon	3,0	3,8	3,7	6,5	6,1		
p vrednost*		< 0,001	0,013	0,468	0,475		

*Primerjava kontrolne (gojišče brez dodanega amonijevega sulfata) skupine s testno skupino

Priloga C: Končna suha biomasa glede na koncentracijo amonijevega sulfata v gojišču

Koncentracija amonijevega sulfata	0	0,5	1	2	4	g/L
Rezultati suhe biomase	10,7 13,9	9,2 11,4	10,9	12,5	11,9	mg/mL
	10,7 14,0	9,2 11,8	11,0	13,2	12,9	
	10,7 14,3	9,2 12,1	11,5	14,1	13,6	
	11,0 14,4	9,5 12,3	12,5	14,9	14,1	
	11,0 14,8	9,6 12,4	12,7	15,2	14,2	
	11,0 14,8	10,0 12,7	12,8	15,9	15,1	
	11,1 14,8	10,2 13,0	12,8	15,9	15,7	
	11,1 15,0	10,4 13,1	12,9	16,3	15,9	
	11,2 15,5	10,6 13,3	13,3	16,9	16,4	
	11,9 15,8	10,8 13,8	13,6	17,8		
	12,2 16,5	10,9 17,3	14,3	19,0		
	12,5 16,7	11,0	16,3			
	12,9 16,7		16,4			
	13,0 16,9					
	13,4 16,9					
13,5 17,5						
13,8 17,6						
Povprečje	13,8	11,5	13,2	15,6	14,4	mg/mL
Standardni odklon	2,2	1,9	1,7	1,9	1,5	
p vrednost		< 0,001	0,166	0,007	0,152	

*Primerjava kontrolne (gojišče brez dodanega amonijevega sulfata) skupine s testno skupino

Priloga D: pH vrednost brozge z dodanim MOPS pri različnih koncentracijah amonijevega sulfata po 6. dnevih kultivacije

Koncentracija amonijevega sulfata	0	0,5	1	2	4	g/L
Rezultati pH	7,59 8,07	7,22 7,52	7,37 8,15	7,40	7,23	
	7,60 8,07	7,27 7,53	7,39 8,16	7,28	7,15	
	7,61 8,14	7,28 7,58	7,42 8,18	7,29	7,15	
	7,62 8,15	7,29 7,58	7,43 8,18	7,29	7,17	
	7,63 8,15	7,30 7,60	7,43 8,18	7,29	7,18	
	7,64 8,15	7,30 7,85	7,44 8,20	7,31	7,19	
	7,65 8,16	7,32 7,85	7,47 8,22	7,36	7,20	
	7,65 8,16	7,32 7,86	7,48	7,60	7,46	
	7,67 8,16	7,33 7,89	7,52	7,62	7,47	
	7,68 8,18	7,35 7,89	7,54	7,62	7,51	
	7,78 8,19	7,36 7,89	7,55	7,63	7,51	
	7,83 8,20	7,47 8,20	7,57	7,63	7,66	
	7,97 8,21	7,48 8,22	7,58	8,03	7,90	
	7,99 8,21	7,49 8,28	7,59	8,04	7,96	
	7,99 8,22	7,50 8,29	7,80	8,05	7,97	
	8,00 8,22	7,51 8,29	7,80	8,06	7,97	
	8,05 8,24	7,51 8,29	7,80	8,07	7,98	
8,06 8,25			8,07	7,98		
8,06						
Povprečje	7,98	7,64	7,73	7,65	7,54	
Standardni odklon	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	
p vrednost		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

*Primerjava kontrolne (gojišče brez dodanega amonijevega sulfata) skupine s testno skupino

Priloga E: Produkcija FK506 glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

Koncentracija PO ₄ ³⁻	0	2,6	5,3	10,5	21,1	mmol/L				
Rezultati HPLC - koncentracija FK506	1,6	3,9	2,5	3,7	5,2	8,0	8,8	7,4	9,1	mg/L
	1,7	3,9	2,5	3,8	5,6	8,0	8,9	7,7	9,1	
	1,8	4,1	2,6	3,8	6,1	8,1	9,1	7,7	9,1	
	1,8	4,5	2,6	4,2	6,6	8,1	9,5	7,8	9,2	
	1,9	4,8	2,9	4,2	7,1	8,3	9,6	8,1	9,5	
	2,1	4,8	3,1	4,4	7,3	8,4	9,8	8,3	9,6	
	2,1	4,9	3,1	4,8	7,4	8,4	10,0	8,3	10,1	
	2,3	5,0	3,3	5,4	7,6	8,5	10,3	8,6	10,6	
	2,4	5,1	3,3	5,4	7,6	8,5	10,4	8,7	11,3	
	2,4	5,2	3,3	5,4	7,7	8,6	10,6	8,8	11,8	
	2,4	5,2	3,4	5,6	7,7	8,8	11,6	8,8	12,0	
	2,5	5,2	3,4	5,7	7,7	8,8	11,7	8,9	12,3	
	2,7	5,2	3,4	5,8	7,7	8,9	11,9	8,9	12,9	
	2,7	5,4	3,4	5,9	7,9	9,8	12,0	9,0	13,2	
	2,8	5,6	3,4	5,9	7,9	9,9	12,3	9,0	13,4	
	2,8	5,6	3,5	6,5			13,6	9,0	14,3	
	3,3	5,8	3,7				13,8			
	3,4	5,9					14,4			
	3,5	5,9								
	3,5	6,0								
3,7	6,0									
3,7	6,0									
Povprečje	3,9	4,1	7,9	11,2	9,8	mg/L				
Standardni odklon	1,5	1,2	1,0	1,7	1,9					
p vrednost		0,208	< 0,001	< 0,001	< 0,001					

*Primerjava kontrolne (gojišče brez dodanega fosfatnega iona) skupine s testno skupino

Priloga F: Končna mokra biomasa (pmV) glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

Koncentracija PO ₄ ³⁻	0	2,6	5,3	10,5	21,1	mmol/L			
Rezultati pmV	13	20	19	22	28	46	50	26	%
	13	20	20	22	30	50	50	50	
	14	20	20	22	30	50	50	50	
	14	22	20	22	36	50	50	50	
	14	22	20	22	40	50	50	50	
	14	22	20	22	42	50	50	50	
	15	22	20	22	46	50	50	50	
	15	22	20	24	50	50	50	50	
	16	22	22	25	50	50	50	50	
	17	22	22	30		50	50	50	
	17	22						50	
	18	22						50	
	18	22						50	
	20	22						50	
	20	22						50	
	20	22						50	
20	22						50		
Povprečje	19,0	22	39	50	48	%			
Standardni odklon	3,3	2,4	8,6	0,9	6,0				
p vrednost		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001				

*Primerjava kontrolne (gojišče brez dodanega fosfatnega iona) skupine s testno skupino

Priloga G: Končna suha biomasa glede na koncentracijo fosfatnega iona v gojišču

Koncentracija PO ₄ ³⁻	0	2,6	5,3	10,5	21,1	mmol/L
Rezultati suhe biomase	10,7 13,9	12,1 18,3	16,1 27,5	24,5 30,5	24,9 31,0	mg/mL
	10,7 14,0	13,7 19,1	16,3 27,5	25,0 30,6	26,4 32,0	
	10,7 14,3	15,2 19,2	23,4 27,7	25,4 31,2	27,4 32,5	
	11,0 14,4	15,3 19,5	26,9 28,4	26,9 31,3	27,9 32,8	
	11,0 14,8	15,5 19,5	27,1 28,5	28,3 31,8	28,3 32,9	
	11,0 14,8	15,7 20,8	27,4 29,5	28,7 32,3	28,4 33,5	
	11,1 14,8	16,3 21,0		29,6 32,9	29,0 33,6	
	11,1 15,0	16,6 22,6		30,1 36,3	29,7 35,4	
	11,2 15,5	16,7 27,0		30,4 39,1	30,0 35,7	
	11,9 15,8	17,1 27,2				
	12,2 16,5					
	12,5 16,7					
	12,9 16,7					
	13,0 16,9					
	13,4 16,9					
	13,5 17,5					
13,8 17,6						
Povprečje	13,8	18,4	25,5	30,3	30,6	mg/mL
Standardni odklon	2,2	3,9	4,6	3,7	3,1	
p vrednost		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

*Primerjava kontrolne (gojišče brez dodanega fosfatnega iona) skupine s testno skupino

Priloga H: pH vrednost brozge z dodanim MOPS pri različnih koncentracijah fosfatnega iona po 6. dnevih kultivacije

Koncentracija PO ₄ ³⁻	0	2,6	5,3	10,5	21,1	mmol/L
Rezultati pH	7,59 8,07	6,98	6,57	6,58 6,78	6,71 6,82	
	7,60 8,07	7,48	6,61	6,58 6,79	6,72 6,82	
	7,61 8,14	7,75	6,67	6,58 6,80	6,72 6,82	
	7,62 8,15	7,76	6,67	6,59 6,80	6,72 6,83	
	7,63 8,15	7,76	6,68	6,59 6,80	6,73 6,83	
	7,64 8,15	7,77	6,68	6,67 6,80	6,79 6,83	
	7,65 8,16	7,78	6,70	6,67 6,80	6,80 6,84	
	7,65 8,16	7,78	6,77	6,67 6,80	6,81 6,84	
	7,67 8,16	7,83	6,77	6,67 6,80	6,81 6,86	
	7,68 8,18	7,87	6,78	6,69 6,81	6,82 6,90	
	7,78 8,19	7,88	6,78			
	7,83 8,20	7,90	6,78			
	7,97 8,21	7,94	7,79			
	7,99 8,21	7,95				
	7,99 8,22	7,95				
	8,00 8,22	7,96				
	8,05 8,24	7,96				
8,06 8,25	7,99					
8,06						
Povprečje	7,98	7,79	6,79	6,71	6,80	
Standardni odklon	0,24	0,24	0,31	0,09	0,05	
p vrednost		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

*Primerjava kontrolne (gojišče brez dodanega fosfatnega iona) skupine s testno skupino