

Streptomyces platensis kot naravni vir za biotehnoške aplikacije

Vida Lang

V naravi se skrivajo neštete priložnosti in možnosti za razvoj novih biotehnoških rešitev. Bakterija *Streptomyces platensis*, ki je bila izolirana iz prsti, ponuja eno izmed takšnih priložnosti pri proizvodnji encimov in drugotnih metabolitov. V prispevku opisujemo vlogo *S. platensis*, zlasti pa njenega drugotnega metabolita transglutaminaze, ki obeta izjemne možnosti za biotehnoške aplikacije.

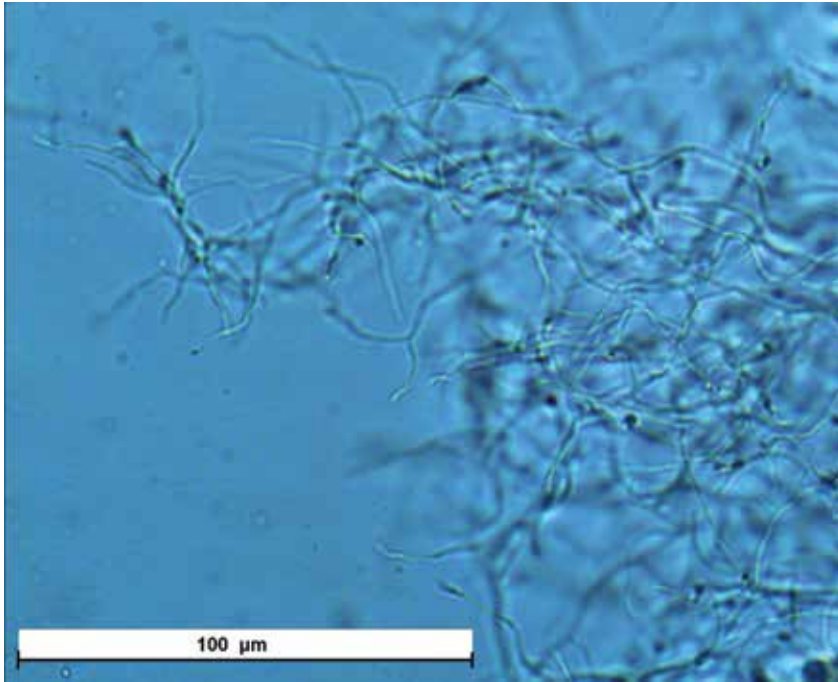
Vloga encimov v bioloških sistemih je nedvomno ključna, saj ti proteinski katalizatorji omogočajo pospeševanje številnih presnovnih procesov v živih organizmih. Njihova visoka katalitična učinkovitost in specifičnost jih postavljata v središče pozornosti v različnih biotehnoških aplikacijah. V industriji, kot so živilska, farmacevtska, kozmetična, tekstilna in papirna, so encimi nepogrešljiv del procesov, ki omogočajo vpeljavo učinkovitih inovativnih načinov izboljšav proizvodov ter samih postopkov njihovega pridobivanja.

Med številnimi viri encimov, ki jih lahko uporabljamo v biotehnoške namene, imajo bakterije in glive pomembno vlogo. Med temi organizmi izstopa *Streptomyces platensis*, ki se nahaja v prsti. Ta bakterija je znana po svoji sposobnosti proizvodnje encimov in drugih drugotnih metabolitov, kar jo postavlja v središče zanimanja raziskovalcev in industrije.

Posebej izstopa encim transglutaminaza, ki ga *S. platensis* izloča zunajcelično. Ta encim ima izjemno pomembno vlogo pri tvorbi prečnih vezi med fibrilarnimi proteini, kar povzroča nastanek netopnih polimernih struktur, kot so krvni strdki, lasje, koža in drugi tkivni elementi. Transglutaminaza je postala predmet številnih raziskav zaradi svoje koristnosti na področjih, kot sta tkivno inženirstvo ter proizvodnja biotehnoških orodij. Zanimivo je, da ta encim ostaja dejaven v širokem razponu pH in temperatur, kar dodatno širi njegove možnosti za industrijsko uporabo.

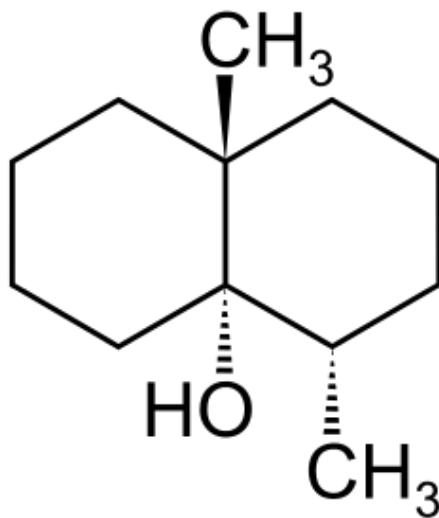
Streptomyces platensis

Streptomyces platensis so bakterije iz rodu *Streptomyces*. V rod *Streptomyces* sodijo nitaste bakterije, ki jih pogosto najdemo v zemeljski prsti. *Streptomyces* je raznolik rod aerobnih, negibljivih, grampozitivnih bakterij, od katerih nekatere vrste proizvajajo antibiotike, nekatere pa so lahko patogene (*Slovenski medicinski slovar*, 2012) (slika1). *Streptomyces* je največji rod aktinobakterij z več kot 550 opisanimi vrstami (Kämpfer, 2006), med katere uvrščamo tudi *S. platensis*. Te bakterije izstopajo po svoji genomski sestavi, ki vključuje visok delež gvanin-citozin baznih parov, ki v povprečju znaša 72,1 odstotka. Posebnost teh organizmov je njihova sposobnost izločanja metabolitov v zunajcelično snov, kar je ključno za številne biološke procese. V naravi se pojavljajo kot saprofiti, pogosto naseljujejo rastlinski material in živalske ostanke. Prav tako sodelujejo s koreninami rastlin, pri čemer bakterije oskrbujejo rastline s hranili in uporabljajo koreninske izločke kot vir hrane. Ta zapleteni proces simbioze temelji na bogatem genskem ozadju (Kieser in sod., 2000). *Streptomyces* prevladujejo v nevtralnih do rahlo alkalnih tleh, ki dobro prepuščajo vodo. V takšnih okoljih predstavljajo do devetdeset odstotkov vseh aktinobakterij in imajo ključno vlogo pri začetnih stopenjah razkrajanja organskega materiala (Schrempf, 2006). Bakterije *S. platensis* so znane po izločanju neprijetnega vonja po zemlji, ki ga povzroča



Slika 1:
Streptomyces platensis
pod optičnim
mikroskopom.
Foto: Lang, 2017.

geosmin, hlapni metabolit. Geosmin, organska spojina, ki jo proizvajajo aktinobakterije, je odgovoren za vonj po zemlji, ki se spro-



Slika 2: Geosmin – hlapni metabolit, ki ga izloča *S. platensis*, in ga zaznamo po dežju kot značilni vonj po zemlji.

sti ob deževju, ko mikroorganizmi odmrjejo (Gerritsen, 2003). Kemijsko je geosmin biciklični alkohol (slika 2), ki se po IUPAC-ovi nomenklaturi imenuje 4,8a-dimethyl-decahydronaphthalen-4a-ol.

Proizvodnja drugotnih metabolitov in njihova vloga v biotehnologiji

Drugotni metaboliti so organske spojine, ki jih mikroorganizmi proizvajajo, čeprav niso bistveni za njihovo osnovno preživetje. Njihova biosinteza se običajno sproži v posebnih fazah rasti ali kot odgovor na določene razmere, ki niso nujno povezane s hitrostjo rasti. Pri *S. platensis* in podobnih organizmih je zanimivo, da je proizvodnja teh metabolitov najvišja, ko primanjkuje hranilnih snovi v gojišču. Proizvodnja drugotnih metabolitov običajno doseže vrhunec proti koncu faze rasti, natančneje v stacionarni fazi, ko se število celic v populaciji ne povečuje več.

Streptomyces platensis in sorodne bakterije so pomembni proizvajalci drugotnih meta-

bolitov, ki imajo možnosti široke uporabe, vključno v biotehnoških in farmacevtskih procesih. Drugotni metaboliti so zanimivi predvsem v industriji, in sicer v proizvodnji antibiotikov, mikotoksinov in pigmentov.

Razumevanje mehanizmov, ki sprožijo proizvodnjo teh metabolitov, je ključno za nadaljnji razvoj v biotehnologiji, genetiki in inženirstvu proteinov ter pri raziskavi novih antibiotikov, ki lahko pomagajo v boju proti bakterijskim okužbam dihal.

Streptomyces platensis je znana po svoji sposobnosti izločanja zunajceličnih encimov, ki so ključni za številne industrijske procese. Ti encimi delujejo kot biokatalizatorji pri kemijskih reakcijah in so nepogrešljivi pri metaboličnih procesih (Akst, 2014). Poleg encimov ta bakterija proizvaja raznovrstne drugotne metabolite, med katerimi izstopata platensimicin in platenim. Oba navedena metabolita sta nedavno odkrita naravna proizvoda, ki služita kot pomembna antibiotika (Akst, 2014) z delovanjem, ki ga trenutna zdravila ne uporabljajo. Obe spojini sta močna zaviralca bakterijske sinteze maščobnih kislin. Platensimicin in platenim sta učinkovita proti širokemu spektru grampozitivnih patogenov, vključno z vrsto patogenih stafilokokov *Staphylococcus aureus*, odporno proti metilinu, in enterokoki, odpornimi proti vankomicinu. Ne kažeta

navzkrižne odpornosti z drugimi komercialno dostopnimi antibiotiki (Wang in sod., 2007). Navzkrižna odpornost (cross-resistance) je pojav, ko organizmi postanejo odporni proti več različnim zdravilom ali antibiotikom, ker so razvili mehanizme odpornosti, ki delujejo proti več različnim učinkovinam.

Transglutaminaza

Zgodovina raziskav transglutaminaze sega v leto 1959, ko so raziskovalci prvič prepoznali ta encim v jetrih morskih prašičkov. Vendar so bili postopki čiščenja in pridobivanja transglutaminaze zahtevni in dragi, kar je vplivalo na ceno končnih izdelkov. To je spodbudilo raziskovalce k iskanju drugačnih virov tega encima.

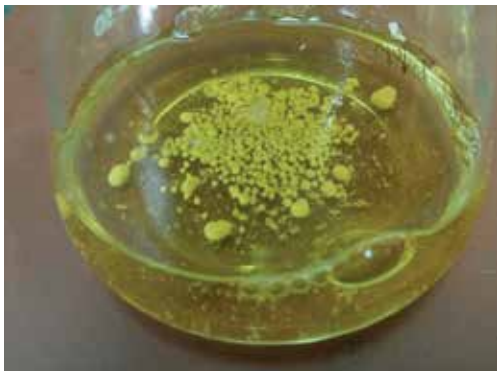
Leta 1989 so raziskovalci odkrili, da je mogoče transglutaminazo pridobiti iz bakterije *Streptomyces* sp. Od takrat so transglutaminazo prepoznali v različnih organizmih, tudi v živalskih in rastlinskih tkivih ter mikroorganizmih (Iancu in sod., 2009). Do leta 2011 so kot vire transglutaminaze prepoznali bakterije, kot so *Streptomyces lividans*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, in metilotropske kvasovke (Liu in sod., 2011).

Bakterije rodu *Streptomyces* izločajo transglutaminazo v obliki neaktivnega proencima (cimogen). Ta se aktivira ob biokemijskih spremembah, ki razkrivajo njeno aktivno mesto. Preoblikovanje iz neaktivne v aktivno obliko je doseženo z uporabo signalnega peptida (Liu in sod., 2011). Transglutaminaza katalizira tvorbo prečnih vezi med fibrilarnimi proteini (*Slovenski medicinski slovar*, 2012).

Transglutaminaza katalizira tvorbo izopeptidnih vezi med prosto aminoskupino in acilno skupino, pri čemer kot produkt nastane še amonijak. Osnovni produkt teh reakcij so trirazsežnostne proteinske mreže, ki imajo pomembno vlogo pri tvorbi različnih bioloških struktur, kot so krvni strdki, lasje in koža. Biokemijske reakcije transglutaminaze

Slika 3: *Streptomyces platensis* v tekočem gojišču.

Foto: Lang, 2017.



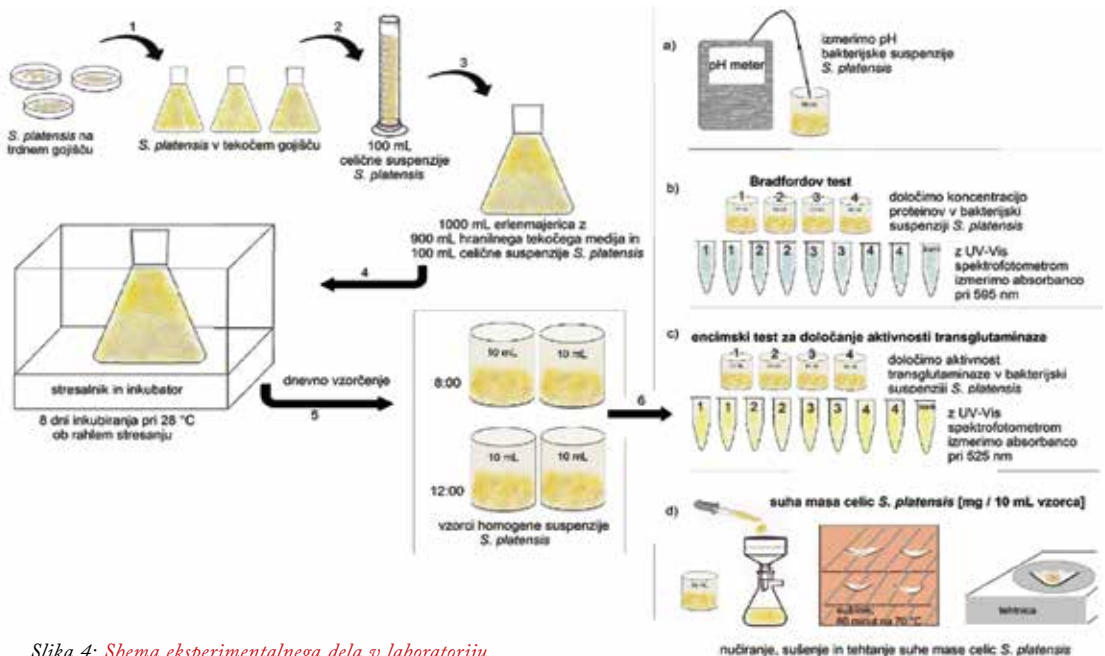
so odvisne od različnih dejavnikov, predvsem pa od vrednosti pH in temperature. Pomanjkanje transglutaminaze ali dejavnika XIII povzroči redko genetsko motnjo, ki vpliva na proces strjevanja krvi. V takih primerih je treba bolnikom dodajati transglutaminazo, da strjevanje krvi normalizira. Encim transglutaminaza je pritegnil veliko pozornost predvsem zaradi velikih možnosti v industriji. Uporaba transglutaminaze v prehrabeni industriji je potrjena s številnimi primerjalnimi študijami, ki so pokazale, da dodatki transglutaminaze izboljšajo funkcionalne lastnosti živil. Uporaba transglutaminaze na primer v pekarstvu izboljšuje kakovost moke, posledično pa tudi teksturo in volumen kruha, saj encim učinkovito katalizira tvorbo beljakovinskih navzkrižnih povezav. To ugodno prispeva tudi k obstojnosti pekovskih izdelkov, izboljšuje reološke (tekočnostne) lastnosti ter prispeva k podalšanju roka uporabnosti pekovskih izdelkov. Encim transglutaminaza je uporaben tudi v mlečni industriji. Mlečne beljakovine (na

primer kazein) uporabljajo kot substrat za izboljšanje lastnosti penjena, emulgiranja in želiranja različnih živil. V jogurtih se na primer uporablja za preprečevanje sinereze in za utrjevanje ali mehčanje struktur. Sinereza se zgodi, ko se v jogurtu loči voda in nastanejo grudice. Transglutaminaza pa prepreči, da bi se voda ločila, tako da jogurt ostane gladek in kremast.

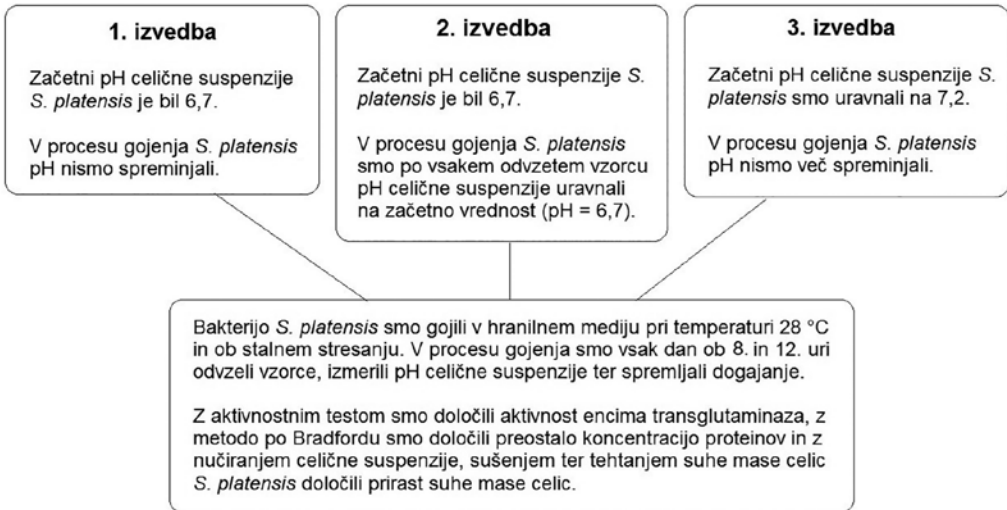
Transglutaminaza kaže izjemno vsestranskost, saj jo uporabljajo v tkivnem inženiringu, tekstilni in usnjarski industriji ter proizvodnji biotehnoških orodij. Raziskave na tem področju nenehno razkrivajo nove uporabe te encimske aktivnosti, kar še dodatno povečuje njene možnosti v različnih industrijskih panogah.

Testiranje razmer gojenja *S. platensis* in aktivnost transglutaminaze

Bakterije *Streptomyces* v naravnem in umetnem okolju uspevajo v milih razmerah, to je pri pH od 6,5 do 8,0 in v temperaturnem območju od 25 do 35 stopinj Celzija. Za *S.*



Slika 4: Shema eksperimentalnega dela v laboratoriju. Narisala: Lang, 2017.



Slika 5: Shema razdelitve laboratorijskega dela v tri izvedbe. Narisala: Lang, 2017.

platensis je značilna proizvodnja zunajceličnih encimov, ki se uporabljajo v industriji. V eksperimentalnem delu nas je zanimalo, kako sprememba pH v celični suspenziji *S. platensis* (slika 3) vpliva na maso celic *S. platensis*, kakšna je aktivnost encima transglutaminaza in kolikšna je koncentracija skupnih proteinov v bakterijski suspenziji *S. platensis*.

Celična suspenzija *S. platensis* je bila inkubirana v inkubacijskem stresalniku osem dni pri temperaturi 28 stopinj Celzija in ob rahlem stalnem stresanju. Na sliki 4 je predstavljena shema poteka eksperimentalnega dela. Po treh izvedbah (slika 5), pri katerih smo pri inkubiranju celične suspenzije *S. platensis* spreminjali razmere pH, je bilo ugotovljeno, da ko se je pH celične suspenzije zniževal, so koncentracija proteinov, aktivnost transglutaminaze in prirast suhe mase celic naraščale.

Po treh različnih izvedbah se je pokazalo, da je za gojenje celične suspenzije *S. platensis* najugodnejši začetni pH 6,7 in inkubiranje pri temperaturi 28 stopinj Celzija ob rahlem stresanju ter brez dodatnega spreminjanja pH. Spreminjanje oziroma urav-

navanje pH na začetku ali med celotnim inkubiranjem celične suspenzije *S. platensis* ni ugodno za uspešno gojenje bakterije *S. platensis*, saj se celotni proces pospeši in bakterije hitreje propadejo.

Iz pridobljenih eksperimentalnih rezultatov (Lang, 2017) smo potrdili, da je za gojenje celic in pridobivanje encimov ter proteinov iz bakterijske suspenzije *S. platensis* najbolj ugodno inkubiranje pri milih razmerah, pri temperaturi 28 stopinj Celzija, ob rahlem stresanju in pri pH gojišča z začetno vrednostjo 6,7. Spreminjanje pH gojišča ni bilo najbolj primerno za gojenje celic *S. platensis*, saj so celice začele hitreje propadati in oddajati neprijeten vonj po razpadanju.

Literatura:

- Akst, J., 2014: *How a Microbe Resists Its Own Antibiotics*. *The Scientist*. <https://www.the-scientist.com/daily-news/how-a-microbe-resists-its-own-antibiotics-37929>.
- Gerritsen, B. V., 2003: *The earth's perfume*. http://web.expasy.org/spotlight/back_issues/035/.
- Kämpfer, P., 2006: *The family Streptomycetaceae, part I: taxonomy*. *The prokaryotes*, 3: 538-604.
- Iancu, C., Butu, N., Babrim, G., 2009: *Preliminary studies regarding transglutaminase synthesis by polar*

filamentous bacteria of the genus Streptomyces sp. Innovative Romanian Food Biotechnology, 4: 12–15.
 Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A., 2000: *Practical streptomyces genetics. Norwich: John Innes Foundation.*
 Lang, V., 2017: *Pridobivanje transglutaminaze iz bakterije streptomyces platensis. Magistrsko delo. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko.*
 Liu, S., Zhang, D., Wang, M., Cui, W., Chen, K., Liu, Y., Zhou, Z., 2011: *The pro-region of Streptomyces hygroscopicus transglutaminase affects its secretion by Escherichia coli. FEMS microbiology letters, 324 (2): 98–105.*
 Schrempf, H., 2006: *The family Streptomycetaceae, part*

II: molecular biology. Prokaryotes, 3: 605–622.
 Sodelavci Medicinske fakultete v Ljubljani in drugi, 2012: *Slovenski medicinski slovar. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta. <http://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/5540078/streptomyces>.*
 Wang, J., Kodali, S., Lee, S. H., Galgoci, A., Painter, R., Dorso, K., Singh, S. B., 2007: *Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104 (18): 7612–7616.*



Vida Lang je mlada raziskovalka na Univerzi v Mariboru. Svoje delo usmerja v področja biologije, kemije in naravoslovja. Aktivno sodeluje na Fakulteti za naravoslovje in matematiko kot asistentka in raziskovalka, zlasti na področju didaktike biologije. V svoji magistrski nalogi iz kemije se je osredotočila na pridobivanje encimov in sekundarnih metabolitov iz bakterij. V magistrski nalogi iz biologije je izvedla raziskavo o motivaciji slovenskih dijakov za poučevanje biologije, kar priča o njenem interdisciplinarnem pristopu k raziskavam na področju didaktike. Z izkušnjami iz poučevanja v osnovnih šolah in željo po razširitvi znanja se je vpisala na doktorsko šolo. V svojem doktorskem delu se osredotoča na raziskovanje uporabe pametnih mobilnih telefonov za poučevanje biologije. Njeno delo kaže širok spekter zanimanj in strokovnosti na področju bioloških in ekoloških znanosti, didaktike ter uporabe tehnologije v izobraževanju.

Evtanazija • Razmišljanje o življenju in smrti

Razmišljanje o življenju in smrti

Poskus vpeljave evtanazije v Slovenijo

Zvonka Zupanič Slavec

Življenje je največ, kar imamo. Tudi življenje s težjo neozdravljivo boleznijo je lepo in ga bolniki radi živijo.

Zahodna družba se izjemno hitro spreminja, s spremembami, ki so klasični družbi vse prej kot blizu, pa prihaja tudi sprejemanje zakonov o evtanaziji ali »dobri«, umetno povzročeni smrti. Na zahodu zagovorniki evtanazije govorijo o hudem trpljenju sta-

rejših in neozdravljivo bolnih kakor tudi o človekovi pravici, da sam odloča o času in načinu smrti. Življenje pa je eno samo, enkratno in nepovrnljivo, zato toliko bolj dragoceno. Ker je nepovratno, so po svetu tudi večinoma ukinili smrtno kazen.