

Dominika Paulina Ciurko

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,
Chęłmońskiego 37, 51-630 Wrocław

Dyscyplina: Nauki biologiczne

Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Data sporządzenia streszczenia: 05.06.2023

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych związków z odpadów rolno-spożywczych”.

Słowa kluczowe: gospodarka odpadami, młóto browarne, makuch słonecznikowy, makuch rzepakowy, proteoliza, związki bioaktywne, aktywność przeciwutleniająca, analiza bioinformatyczna.

Streszczenie

Odpady spożywcze generowane są na każdym etapie „cyklu życia żywności” obejmującego produkcję rolną, przechowywanie, przetwórstwo, dystrybucję, konsumpcję oraz wycofanie z obrotu. Marnowanie żywności ma negatywny wpływ na środowisko naturalne. Niekorzystne oddziaływanie na klimat wynika przede wszystkim z emisji gazów cieplarnianych na etapie produkcji i przetwórstwa produktów spożywczych oraz marnowania zasobów wody.

Młóto browarniane (ang. *brewer's spent grain*, BSG) to główny produkt uboczny produkcji piwa, stanowiący 85% wszystkich odpadów generowanych w browarach. BSG stanowi źródło białka, błonnika i tłuszczu, a także witamin, aminokwasów egzogennych i związków fenolowych. Ocenia się, że około 70% wytwarzanego globalnie BSG jest stosowane jako pasza dla zwierząt, a kolejne 10% celem produkcji biogazu. Ogromna skala produkcji piwa stwarza problemy z utylizacją BSG. Przez wzgląd na krótki okres trwałości, a także trudności związane z przechowywaniem i transportem, około 20% BSG trafia na składowiska odpadów, co wymusza poszukiwanie ekonomicznie opłacalnych metod zagospodarowania tego perspektywicznego surowca.

Makuchy to główny produkt uboczny procesu wytwarzania olejów roślinnych. Szacuje się, że w procesie tłoczenia olejów, z jednego kilograma nasion roślin oleistych, średnio uzyskuje się około 250–350 g oleju, w zależności od rodzaju nasion, co oznacza, że 65-75% ich masy ulega transformacji w produkt uboczny. Makuchy charakteryzują się wysoką

zawartością białka, kwasów tłuszczowych, węglowodanów, minerałów i witamin. Tradycyjne ścieżki zagospodarowania odpadowych makuchów obejmują skarmianie zwierząt gospodarskich oraz aplikację w roli kompostu glebowego. W perspektywie aplikacji biotechnologicznych makuchy są wykorzystywane jako substraty do produkcji antybiotyków, biopestycydów, witamin i enzymów mikrobiologicznych. Co istotne, obserwuje się intensyfikację stosowania makuchów w roli substratów w badaniach nad produkcją biosurfaktantów.

W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej prowadzono mikrobiologiczną konwersję BSG oraz makuchów słonecznikowych i rzepakowych w biologicznie aktywne związki.

Pierwsza z cyklu prac, opisuje produkcje hydrolizatów frakcji białkowej BSG. Początkowo wykonano analizę *in silico*, aby określić czy BSG może być źródłem biologicznie aktywnych peptydów. W kolejnych etapach prowadzono proteolizę BSG w hodowlach bakterii, wyselekcjonowanych na podstawie zdolności do syntezy enzymów proteolitycznych. Oznaczono stopień hydrolizy (ang. *degree of hydrolysis*, DH%) białka oraz zbadano spektrum enzymów uczestniczących w proteolizie. Finalnie wykonano analizę aktywności przeciwutleniającej otrzymanych hydrolizatów.

Za pomocą narzędzi bioinformatycznych wykazano, że na skutek proteolizy BSG, mogą powstawać peptydy o szerokim spektrum aktywności biologicznej, w tym aktywności antyoksydacyjnej. W warunkach laboratoryjnych ustalono, że spośród testowanych bakterii, *Bacillus cereus* PCM 2849, *Bacillus subtilis* PCM 2850, *Bacillus polymyxa* ATCC 842, *Bacillus lentus* PCM 450, *Bacillus licheniformis* PCM 1847 oraz *Kocuria rhizophila* PCM 2931 prowadzą wydajną proteolizę BSG. W tych kulturach DH% mieścił się w przedziale 30-45%. Udowodniono użyteczność chromatografii wykluczenia w procesie monitorowania postępu hydrolizy. Odnotowano szerokie spektrum enzymów proteolitycznych zaangażowanych w proces rozkładu białka. Finalnie wykazano istotną aktywność przeciwutleniającą hydrolizatów frakcji białkowej BSG. Najlepsze rezultaty otrzymano z wykorzystaniem metody ABTS (kwasu 2,2'-azyno-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego), a najwyższą aktywność uzyskano w płynach po hodowli *B. cereus* PCM 2849 (1621,31 μM TEAC (ang. Trolox equivalent antioxidant capacity/g peptydów)).

W kolejnej pracy, hydrolizę frakcji białkowej BSG prowadzono w hodowlach drożdży kladu *Yarrowia*. Z uwagi na niski stan wiedzy w temacie enzymów proteolitycznych drożdży

kladu *Yarrowia*, wykonano analizę bioinformatyczną, obejmującą analizę filogenetyczną oraz badanie syntenii. Badano poziom ekspresji genów potencjalnie kodujących proteazy alkaliczne *in silico*, w różnych warunkach hodowlanych oraz eksperymentalnie w podłożu wzbogaconym w BSG. Oznaczono aktywność proteolityczną enzymów kladu *Yarrowia*. Scharakteryzowano białka zaangażowane w proteolizę BSG oraz wykonano analizę proteomiczną. Tak jak w pierwszej z cyklu pracy, szczegółowo scharakteryzowano proces proteolizy BSG oraz zdefiniowano aktywność przeciwtleniająca otrzymanych hydrolizatów.

Na podstawie analizy bioinformatycznej wyróżniono trzynaście grup domniemanych proteaz alkalicznych kladu *Yarrowia*, a wśród nich grupę *XPR2*, stanowiącą zbiór enzymów homologicznych względem zewnątrzkomórkowej proteazy alkalicznej (ang. *alkaline extracellular protease*, Aep). Wykazano, że siedem spośród domniemanych proteaz alkalicznych podlega ekspresji w podłożu z BSG, a najwyższą ekspresję odnotowano dla genów *XPR2* oraz *YALI0B16500*. Udowodniono brak aktywności proteolitycznej drożdży *Yarrowia phangngaensis*, *Yarrowia deformans* i *Candida hispaniensis* podczas gdy dla szczepów *Yarrowia lipolytica*, *Yarrowia alimentaria* i *Yarrowia keelungensis* wykazano wysoką aktywność proteolityczną. Odnotowano szerokie spektrum enzymów zaangażowanych w proteolizę BSG i wytypowano proteazy o kluczowym znaczeniu. Na podstawie analizy proteomicznej wykazano wysoką homologię enzymów względem Aep *Y. lipolytica* E150 (CLIB122), potwierdzając jednocześnie ścisłe pokrewieństwo drożdży kladu *Yarrowia*. Uzyskano niemal dwukrotnie wyższy DH% frakcji białkowej BSG w porównaniu do hodowli bakterii proteolitycznych. W płynach po hodowli najaktywniejszych gatunków drożdży DH% mieścił się w zakresie 60-73%. Konsekwencją wydajnej hydrolizy była istotnie wyższa, niż w hodowlach bakterii, aktywność antyoksydacyjna. Najlepsze rezultaty uzyskano w płynach po hodowli *Yarrowia divulgata* (2606,13 μM TEAC/g), *Yarrowia galli*, (1771,87 μM TEAC/g), *Y. keelungensis* (1730,73 μM TEAC/g) i *Y. lipolytica* (1722,63 μM TEAC/g).

Ostatnia z cyklu prac przedstawia proces produkcji surfaktyny przez bakterie *B. subtilis* #309. W pierwszej kolejności wykonano analizę składu makuchów wykorzystywanych w roli substratów. Produkcję surfaktyny monitorowano poprzez pomiar napięcia powierzchniowego (ang. *surface tension*, ST), indeksu emulgacji (ang. *emulsification index*, E24) oraz pH. Wyznaczono kinetykę produkcji surfaktyny w obu testowanych podłożach. Analizowano enzymy proteolityczne i lipolityczne zaangażowane w utylizację

makuchów. Badano zdolność surfaktyny do usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z piasku. Wyznaczono profil homologów surfaktyny w obu testowanych podłożach. Analizowano aktywność przeciwutleniającą surfaktyny oraz aktywność inhibitorową wobec konwertazy angiotensyny (ang. *angiotensin converting enzyme*, ACE). Wykonano *in silico* dokowanie molekularne surfaktyny do domeny C i N ACE.

Analiza składu makuchów, przez wzgląd na wysoką koncentrację białka i kwasów tłuszczowych, potwierdziła sensowność ich wykorzystania w roli substratu do produkcji surfaktyny. Zarówno w hodowli prowadzonej na podłożu wzbogaconym w makuch słonecznikowy, jak i rzepakowy obserwowano znaczący spadek ST, odpowiednio do wartości 30,1 mN/m oraz 29,7 mN/m. Jednocześnie odnotowano wzrost E24 do wartości około 63% w obu testowanych podłożach. Zaobserwowano logarytmiczny wzrost koncentracji surfaktyny. Jej maksymalne stężenie w podłożu suplementowanym zarówno makuchem słonecznikowym (1,19 g/L) jak i rzepakowym (1,45 g/L) otrzymano po 120 godzinach hodowli. Badania wstępne potwierdziły aktywność proteolityczną i lipolityczną *B. subtilis* #309. Ustalono szerokie spektrum enzymów uczestniczących w utylizacji makuchów. Udowodniono również skuteczność surfaktyny jako środka do usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych, a zastosowana technologia miała sens ekonomiczny. Analiza profilu homologów wykazała, że surfaktyna z piętnasto-węglowym łańcuchem węglowodorowym (C15) stanowiła dominującą strukturalnie cząsteczkę w obu testowanych podłożach. Wykazano, że wzajemne proporcje homologów są zależne od kompozycji kwasów tłuszczowych substratu, a także dostępności specyficznych aminokwasów w podłożu hodowlanym. Analiza aktywności antyoksydacyjnej wykluczyła możliwość aplikacji surfaktyny w roli antyoksydantu. Przeciwnie, odnotowano znaczącą aktywność inhibitorową wobec ACE. Wartość połowy maksymalnego stężenia hamującego (ang. *half maximal inhibitory concentration*, IC₅₀) ustalono na poziomie 0,62 mg/mL. Finalnie, dokowanie molekularne surfaktyny do domeny C i N ACE potwierdziło możliwość interakcji inhibitora z enzymem.