

Patrycja Szczepańska

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

Dyscyplina: Nauki biologiczne

Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Streszczenie sporządzone: 01.04.2023.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*; fosfolipidy; resweratrol; fosfatydylocholina; inżynieria genetyczna; estry resweratrolu.

## Streszczenie

Drożdże *Yarrowia lipolytica* to mikroorganizmy oleiste znane ze swoich zdolności do syntezy cennych metabolitów, znajdujących zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym i paliwowym. Drożdże te zdolne są do asymilacji szerokiej gamy różnych źródeł węgla potrzebnych do wzrostu i syntezy pożądaných związków, takich jak substraty hydrofilowe (cukry, glicerol) i hydrofobowe (węglowodory, tłuszcze), które mogą być także pozyskiwane z surowców odpadowych. Niniejsza rozprawa doktorska skupia się na badaniu zdolności drożdży *Y. lipolytica* do syntezy dużych ilości fosfolipidów, wśród których główny nacisk położono na fosfatydylocholinę, oraz resweratrolu, związku polifenolowego o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych, z zastosowaniem taniego substratu jakim jest glicerol. Praca posiada także aspekt interdyscyplinarny, w którym skupiono się na uzyskaniu lipidowych pochodnych resweratrolu oraz ocenie ich właściwości przeciwnowotworowych i antyoksydacyjnych względem nowotworowych i zdrowych ludzkich linii komórkowych.

W pierwszej fazie badań podjęto się charakterystyki szlaku biosyntezy fosfolipidów u drożdży *Y. lipolytica* i zwiększenia ich produkcji z odpadowego substratu, glicerolu. W tym celu wykonano serię manipulacji genetycznych uzyskując szczep (PS08), charakteryzujący się 6-krotnym zwiększeniem produkcji fosfatydylocholiny (27,8 mg/g) i prawie 3-krotną poprawą produkcji fosfolipidów

ogółem (60,2 mg/g) w porównaniu do szczepu kontrolnego. W celu jeszcze większej poprawy produkcji tych związków, przeprowadzono optymalizację warunków hodowli i składu podłoża a następnie przeskalowano proces do warunków bioreaktorowych z zastosowaniem technicznego i odpadowego glicerolu. Uzyskane wyniki wykazały, że produkcja fosfolipidów była na podobnym poziomie niezależnie od rodzaju użytego glicerolu. Finalnie szczep PS08 zdolny był do biosyntezy 653,7 mg/L fosfolipidów, wśród których 352,6 mg/L stanowiła sama fosfatydylocholina.

W kolejnych badaniach skupiono się na syntezie polifenolowego związku jakim jest resweratrol. W tym celu skonstruowano szczepy *Y. lipolytica* zdolne do jego produkcji, w których testowano wydajność dwóch heterologicznych szlaków – szlaku katabolizmu tyrozyny i szlaku katabolizmu fenyloalaniny. Dalsze zwiększanie ilości uzyskiwanego resweratrolu prowadzono poprzez zwiększanie ilości kopii genów kodujących kluczowe enzymy, jak również przez optymalizację składu podłoża oraz warunków prowadzenia procesu. Wyniki wykazały, że najlepszym producentem resweratrolu okazał się szczep łączący w sobie oba szlaki katabolizmu wspomnianych aminokwasów, z podwójną kopią genów (szczep T2P2), który zdolny był do sekrecji 0,104 g/L resweratrolu podczas hodowli w kolbach. Następnie, produkcję tego metabolitu z zastosowaniem glicerolu przeprowadzono w bioreaktorze, uzyskując 4-krotnie wyższe stężenie, wynoszące 0,430 g/L resweratrolu.

Kolejna, interdyscyplinarna część badań dotyczyła estryfikacji resweratrolu z wybranymi kwasami tłuszczowymi: palmitynowym, oleinowym i sprzężonym linolowym, a uzyskane koniugaty analizowane były następnie analizy w kierunku ich właściwości przeciwnowotworowych i antyoksydacyjnych względem wybranych ludzkich linii komórkowych raka płuc (A549), gruczolakoraka jelita grubego (HT29) oraz gruczolakoraka przewodowego trzustki (BxPC3). Nadanie charakteru lipidowego cząsteczce resweratrolu miało na celu rozszerzenie jego możliwych zastosowań dzięki zwiększonej bioprzyswajalności i stabilności nowych koniugatów. Zbadano kilka parametrów: żywotność komórek i apoptozę, w tym ekspresję głównych markerów pro- i antyapoptotycznych, a także ekspresję dysmutazy ponadtlenkowej, kluczowego enzymu bariery antyoksydacyjnej organizmu. Uzyskane wyniki pozwoliły na wybór

trzech związków: mono-RES-OA, tri-RES-PA oraz mono-RES-CLA, które w porównaniu z innymi estrami wyraźnie wykazywały obniżenie żywotności komórek nowotworowych, bez wpływu na komórki prawidłowe. Ponadto, wybrane estry wykazywały właściwości antyoksydacyjne wobec prawidłowej linii komórkowej, wpływając na regulację ekspresji głównych genów pro-antyoksydacyjnych bez wpływu na ich ekspresję w komórkach nowotworowych, a tym samym zmniejszając obronę komórek nowotworowych przed nasilonym stresem oksydacyjnym indukowanym wysoką akumulacją ROS. Uzyskane wyniki wykazały, że estry resweratrolu i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych pozwalają na zwiększenie ich aktywności biologicznej, a tym samym na ich duży potencjał zastosowania klinicznego.