



UNIwersytet
PRZYRODniczy
WE WROcławiu

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Dyscyplina Nauki Biologiczne

Dominika Paulina Ciurko

**Mikrobiologiczna produkcja biologicznie aktywnych
związków z odpadów rolno-spożywczych**

Microbial production of biologically active compounds from agri-food
wastes

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
promotora dr hab. inż. Wojciecha Łaby, profesora uczelni,
promotora pomocniczego dr Tomasza Janka

Wrocław 2023

Pragnę podziękować

Panu Promotorowi

dr hab. inż. Wojciechowi Łabie, profesorowi uczelni

za możliwość realizacji niniejszej pracy doktorskiej,

opiekę merytoryczną,

serdeczność i poświęcony czas,

Panu Promotorowi pomocniczemu

dr Tomaszowi Jankowi

za pomoc w odnalezieniu strategicznych kierunków rozwoju pracy,

przekazaną wiedzę, wsparcie w każdej sytuacji

i okazaną życzliwość

Pracownikom i Doktorantom

Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

za cenne rady, serdeczność i czas, którego nigdy nie zapomnę

Rodzinie i Przyjaciołom

za wiarę we mnie, zrozumienie i motywację do pracy

Spis treści

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	5
Streszczenie	6
Streszczenie w języku angielskim (Abstract).....	10
1. Wstęp	14
2. Cel pracy	23
3. Materiały i metody	24
3.1. Mikroorganizmy	24
3.2. Surowce odpadowe przemysłu rolno-spożywczego.....	25
3.3. Warunki hodowli mikroorganizmów na surowcach odpadowych	26
3.4. Analizy bioinformatyczne.....	27
3.4.1. Analiza <i>in silico</i> frakcji białkowej BSG jako źródła bioaktywnych peptydów.....	27
3.4.2. Analiza filogenetyczna i analiza syntenii enzymów proteolitycznych kladu <i>Yarrowia</i>	28
3.4.3. Analiza <i>in silico</i> ekspresji genów proteaz <i>Y. lipolytica</i> na różnych podłożach hodowlanych	28
3.5. Analizy istotne dla procesu hydrolizy frakcji białkowej BSG oraz makuchów	29
3.5.1. Wstępna analiza aktywności proteolitycznej i lipolitycznej bakterii i drożdży.....	29
3.5.2. Analiza ekspresji enzymów proteolitycznych <i>Y. lipolytica</i> w podłożu BSG	29
3.5.3. Analiza postępu hydrolizy frakcji białkowej BSG w hodowlach bakterii proteolitycznych i drożdży.....	30
3.5.4. Ocena aktywności proteolitycznej kladu <i>Yarrowia</i> w podłożu BSG	31
3.5.5. Oznaczenie profilu enzymów proteolitycznych	31
3.5.6. Analiza proteomiczna enzymów proteolitycznych kladu <i>Yarrowia</i>	32
3.6. Badania dotyczące surfaktyny produkowanej w hodowlach bakterii <i>B. subtilis</i> #309	33

3.6.1.	Pomiar napięcia powierzchniowego (ST)	33
3.6.2.	Wyznaczenie indeksu emulgacji (E24)	34
3.6.3.	Wyznaczenie kinetyki produkcji surfaktyny	34
3.6.4.	Analiza profilu homologów surfaktyny	34
3.6.5.	Analiza surfaktyny jako środka do usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych..	35
3.7.	Analiza właściwości biologicznych	35
3.7.1.	Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej surfaktyny i hydrolizatów frakcji białkowej BSG	35
3.7.2.	Analiza aktywności inhibitorowej surfaktyny wobec konwertazy angiotensyny (ACE)	37
3.7.3.	Dokowanie molekularne surfaktyny do domeny C i N konwertazy angiotensyny (ACE)	38
4.	Komentarze do publikacji	40
4.1.	Publikacja 1 (P1): Czurko D., Łaba W., Żarowska B., Janek T. 2021. Enzymatic hydrolysis of bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. RSC Advances: 11 (8), 4688-4700. DOI: 10.1039/D0RA08830G	40
4.2.	Publikacja 2 (P2): Czurko D., Neuvéglise C., Szwechłowicz M., Lazar Z., Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of Yarrowia Clade Species and Their Putative Applications. International Journal of Molecular Sciences: 24 (7), 6514. https://doi.org/10.3390/ijms24076514	43
4.3.	Publikacja 3 (P3): Czurko D., Czyżnikowska Ż., Kancelista A., Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by <i>Bacillus subtilis</i> and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. International Journal of Molecular Sciences: 23 (18), 10824. https://doi.org/10.3390/ijms231810824	48
5.	Podsumowanie.....	52
6.	Wnioski	54
7.	Literatura	56
8.	Dorobek naukowy	69
9.	Publikacje wraz z oświadczeniami współautorów	72

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Publikacja 1 (P1):

Ciurko D., Łaba W., Żarowska B., Janek T. 2021. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. RSC Advances: 11 (8), 4688-4700. DOI: [10.1039/D0RA08830G](https://doi.org/10.1039/D0RA08830G)

IF= 4,036; MEiN= 100

Publikacja 2 (P2):

Ciurko D., Neuvéglise C., Szwechłowicz M., Lazar Z., Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of Yarrowia Clade Species and Their Putative Applications. International Journal of Molecular Sciences: 24 (7), 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>

IF= 6,208; MEiN= 140

Publikacja 3 (P3):

Publikacja 3 (P3): Ciurko D., Czyżnikowska Ż., Kancelista A., Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. International Journal of Molecular Sciences: 23 (18), 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>

IF= 6,208; MEiN= 140

Całkowity współczynnik IF, jak również liczba punktów ministerialnych publikacji, które wchodzi w skład rozprawy doktorskiej wynosi odpowiednio 16,452 oraz 380. Wartości współczynnika IF podano zgodnie z rokiem opublikowania. Punkty MEiN dla wszystkich artykułów podano zgodnie z Załącznikiem do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 1 grudnia 2021 r.

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 produkcję 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 μ M 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 przeciwutleniającą 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*, E_{24}) 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 E_{24} 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.

Streszczenie w języku angielskim (Abstract)

Food wastes are generated at every stage of the "food life cycle" including agricultural production, storage, processing, distribution, consumption and withdrawal from the market. Food waste production has a negative impact on the environment. It entails unnecessary greenhouse gas emissions and affects global water resources.

Brewers' spent grain (BSG) is the most abundant by-product of the beer production process, account for about 85% of all waste generated in breweries. BSG is a source of protein, fiber and fat, as well as vitamins, essential amino acids and phenolic compounds. Globally, around 70% of the BSG produced is used as feed for livestock, while another 10% for biogas production. The huge scale of beer production creates problems with the BSG disposal. Due to the short shelf life and difficulties related to storage and transport, approximately 20% of BSG ends up in landfills. Therefore, the search for new, economically profitable methods of BSG utilization is of decisive importance.

Oilcakes are main by-products of the vegetable oil manufacturing. When pressing, around 250-350 g of oil is generated per one kilo of seeds, while 65-75% of their weight is transformed into a by-product. Oilcakes are characterized by a high content of protein, fatty acids, carbohydrates, minerals and vitamins. Traditional methods of oilcakes utilization include livestock feeding and the application as soil compost. In the perspective of biotechnological applications, cakes are used as substrates for the production of antibiotics, biopesticides, vitamins and microbial enzymes. Moreover, cakes are increasingly applied as a substrate for the biosurfactant production.

The aim of the current work was to develop a biotechnological method of the agro-food by-products valorization. Therefore, a microbiological conversion of BSG as well as sunflower and rapeseed cake into biologically active compounds was performed.

In the first work, the production of BSG protein hydrolysates was described. Initially, *in silico* analysis was carried out to determine whether BSG could be a source of biologically active peptides. Subsequently, BSG proteolysis was performed in bacterial cultures with confirmed proteolytic properties. The degree of protein hydrolysis (DH%) was calculated,

and the enzymes spectrum, participating in proteolysis was examined. Finally, the antioxidant activity of hydrolysates was investigated.

With the aid of bioinformatics tools, a wide spectrum of bioactive peptides, including natural antioxidants, generated as a result of BSG protein hydrolysis was detected. Under laboratory conditions, *B. cereus* PCM 2849, *B. subtilis* PCM 2850, *B. polymyxa* ATCC 842, *B. lentus* PCM 450, *B. licheniformis* PCM 1847 and *K. rhizophila* PCM 2931 were found to perform efficient BSG proteolysis. The DH% in the most effective bacterial cultures was in the range of 30-45%. Size exclusion chromatography was found to be a convenient tool to monitor the progress of proteolysis. A wide spectrum of proteolytic enzymes involved in the protein degradation has been detected. Finally, significant antioxidant activity of the BSG hydrolysates was determined. The best results were obtained using the ABTS method (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) in *B. cereus* PCM 2849 (1621.31 μ M TEAC/g peptides) culture medium.

In the next stage of the research, BSG was used for the production of protein hydrolysates in cultures of the *Yarrowia* clade. Due to the low state of knowledge in the field of *Yarrowia* yeast proteolytic enzymes, a detailed characterization of alkaline proteases was performed. A phylogenetic tree was prepared and the study of enzymes synteny was implemented. Expression of genes encoding putative alkaline proteases was studied *in silico*, in various culture conditions and experimentally, in a medium supplemented with BSG. Moreover, the proteolytic activity of *Yarrowia* clade was investigated. Enzymes involved in BSG proteolysis were selected and proteomic analysis was performed. The process of BSG protein hydrolysis was characterized in detail and the antioxidant activity of the obtained hydrolysates was determined.

Based on the bioinformatic analysis, thirteen groups of putative alkaline proteases of the *Yarrowia* clade were distinguished, including the *XPR2* group, which is a set of homologues to the extracellular alkaline protease (Aep). Seven of the putative alkaline proteases were expressed in BSG medium and the highest expression was detected for *XPR2* and *YALI0B16500* gene. The lack of proteolytic activity of *Y. phangngaensis*, *Y. deformans* and *C. hispaniensis* and the extraordinary properties of *Y. lipolytica* W29, *Y. alimentaria* and *Y. keelungensis* was determined. Moreover, a broad spectrum of enzymes, involved in the BSG protein hydrolysis was determined and the protease of a key importance were identified. Based on the proteomic analysis, a high homology of *Yarrowia* enzymes to Aep

Y. lipolytica E150 (CLIB122) was demonstrated, confirming the common ancestry of *Yarrowia* clade. The antioxidant activity of hydrolysates was significantly higher, than that of proteolytic bacteria. It was related to exceptionally high DH% of BSG proteins. In yeast cultures, the DH% was almost twice as high as in the culture of proteolytic bacteria and reached 60-73%. The best antioxidant properties were determined in *Y. divulgata* (2606.13 $\mu\text{M TEAC/g}$), *Y. galli* (1771.87 $\mu\text{M TEAC/g}$), *Y. keelungensis* (1730.73 $\mu\text{M TEAC/g}$) and *Y. lipolytica* (1722.63 $\mu\text{M TEAC/g}$) post-culture media and the ABTS method was found to be the most appropriate for this type of studies.

Finally, research on the production of surfactin was performed. Initially, chemical composition of sunflower and rapeseed cake, used as a substrate for biosurfactant production was analysed. Surfactin production in both sunflower and rapeseed cake medium was monitored using surface tension (ST), emulsification index (E₂₄) and pH. The kinetics of surfactin production was determined. The profile of proteolytic and lipolytic enzymes, involved in cakes utilization was analyzed. The properties of surfactin, as the oil-recovery agent was examined. The profile of surfactin homologues as well as antioxidant and inhibitory activity of surfactin against angiotensin converting enzyme (ACE) were tested. Finally, *in silico* molecular docking of surfactin to the C and N domains of ACE was performed.

Sunflower and rapeseed cake, due to the high content of protein and fatty acids are a prospective substrates for surfactin production. In the sunflower and rapeseed cake medium, a significant decrease of ST, respectively to the value of 30.1 mN/m and 29.7 mN/m was observed. At the same time, significant increase of E₂₄ to the value of approximately 63% was noted. In addition, a logarithmic increase in surfactin concentration was detected. In the sunflower and rapeseed cake medium, the maximum surfactin concentration reach 1.19 g/L and 1.45 g/L respectively. Preliminary studies confirmed the proteolytic and lipolytic properties of *B. subtilis* #309. Therefore, a wide spectrum of enzymes, involved in cakes utilization was established. Surfactin was found to be an effective oil recovery agent, while applied technology was described as economically profitable. Determination of the profile of surfactin homologues showed, the highest content of surfactin of the fifteen hydrocarbon chain length (C₁₅) in both tested media. The relationship between homologues proportion and the fatty acid composition of the substrate as well as bioavailability of specific amino acids was reported. Finally, the lack of antioxidant activity of surfactin was determined.

On the contrary, significant inhibitory activity against ACE was determined. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was determined to reach 0.62 mg/mL. Molecular docking of surfactin to the C and N domains of ACE confirmed the possible interaction of these compounds.

1. Wstęp

Odpady spożywcze generowane są na każdym etapie „cyklu życia żywności” obejmującego produkcję rolną, przechowywanie, przetwórstwo, dystrybucję, konsumpcję oraz wycofanie z obrotu. Roczne straty w sektorze rolno-spożywczym szacuje się na 1,6 gigaton, co stanowi jedną trzecią masy żywności wyprodukowanej na świecie [1]. W skali europejskiej ilość zmarnowanej żywności wylicza się na poziomie 88 milionów ton, a jej wartość na 143 biliony euro [2]. Polska, na tle krajów Unii Europejskiej, zajmuje niechlubne piąte miejsce generując 9,2 miliona ton odpadów rolno-spożywczych rocznie, których wartość wynosi 14 bilionów euro [3].

Marnowanie szeroko pojętej żywności ma negatywny wpływ na środowisko naturalne. Niekorzystne oddziaływanie na klimat wynika z emisji gazów cieplarnianych na etapie produkcji i przetwórstwa produktów spożywczych. Jak pokazują statystyki, marnowanie żywności to także straty w zasobach wody. Roczne zużycie wody celem nawadniania upraw, które na pewnym etapie „cyklu życia żywności” trafiają na wysypiska odpadów wynosi 250 km³, co odpowiada trzykrotnej objętości Jeziora Genewskiego. Ponadto, szacuje się że żywność, która w ciągu jednego roku trafia na wysypiska śmieci, na etapie produkcji zajmuje prawie 1,4 miliarda hektarów upraw, stanowiąc równowartość 28% światowej powierzchni gruntów rolnych [4].

Ograniczenie strat w sektorze rolno-spożywczym wymaga poszukiwania nowych metod waloryzacji produktów ubocznych będących wynikiem przetwórstwa żywności. W tym celu opracowana w 1989 roku [5] hierarchia postępowania z odpadami została dostosowana do odpadów sektora rolno-spożywczego. Na jej podstawie niewykorzystane do celów konsumpcyjnych produkty powinny być przekazane do instytucji takich jak banki żywności. Produkty niezdatne do spożycia należy wykorzystać celem skarmiania zwierząt gospodarskich. Następną, proponowaną ścieżką waloryzacji odpadów rolno-spożywczych jest ich ponowne wykorzystanie celem generacji produktów o wysokiej wartości dodanej. Kolejno, hierarchia wskazuje na działania, mające na celu odzysk składników odżywczych w procesach takich jak kompostowanie czy fermentacja beztlenowa, a dalej skierowanie

do procesów ukierunkowanych na odzysk energii. Jako stadium finalne wskazuje się utylizację na składowiskach odpadów [6].

Młóto browarniane (ang. *brewer's spent grain*, BSG) to główny produkt uboczny produkcji piwa, stanowiący 85% wszystkich odpadów generowanych w browarach. Każdego roku wytwarza się 39 milionów ton tego surowca, a tylko w Europie 3,4 miliona ton. Oznacza to, że na każde 100 litrów wyprodukowanego piwa przypada średnio 20 kg BSG [7]. BSG jest wytwarzane w konsekwencji procesu słodowania [8]. Podstawowym zbożem używanym do produkcji słodu jest jęczmień [9], jednakże popularność piw pszenicznych, produkowanych z udziałem minimum 50% sładów pszenicznych stale narasta [10]. Produkcja słodu odbywa się w trzech etapach. W fazie maceracji dochodzi do aktywacji metabolizmu ziarna oraz inicjalizacji kiełkowania. Kolejno, w fazie germinacji następuje synteza i aktywacja enzymów, które nieodwracalnie modyfikują strukturę ziarna [11]. Na tym etapie ponad 70% frakcji białkowej jęczmienia ulega hydrolizie do mniejszych peptydów [12]. Kolejno ziarno jest suszone i w takiej formie sład trafia do browaru, gdzie podczas zacierania dochodzi do hydrolizy skrobi, β -glukanu i arabinoksydanu [13], jak również kontynuacji proteolizy zapoczątkowanej w fazie germinacji [12]. Skrobia ulega konwersji enzymatycznej w brzeczkę, którą po procesie filtracji wykorzystuje się jako medium do fermentacji etanolowej, zaś pozostałą niezdegradowaną część ziarna słodowego określa się mianem BSG [13].

W skład BSG wchodzi 15-25% białka, 50-70% błonnika, 5-10% tłuszczu i 2-5% popiołu [14]. Zawartość poszczególnych składników jest zmienna i zależy od rodzaju słodu, warunków środowiskowych wzrostu zbóż oraz skali procesu nawożenia. BSG stanowi bogate źródło witamin takich jak biotyna, cholina, kwas foliowy, niacyna, kwas pantotenowy, ryboflawina, tiamina i pirydoksyna jak również minerałów wśród których dominują wapń, kobalt, miedź, żelazo, magnez, mangan, fosfor, potas, selen, sód i siarka [15]. Frakcja białkowa BSG jest reprezentowana przez hordeiny i gluteliny, pełniące rolę związków zapasowych ziarna jęczmienia oraz albuminy, wśród których dominuje białko Z [12]. BSG charakteryzuje się wysoką zawartością aminokwasów egzogennych takich jak leucyna, walina, treonina, lizyna i arginina oraz endogennych, wśród których dominuje alanina, seryna, glicyna, tyrozyna, kwas glutaminowy i asparaginowy oraz prolina [16]. BSG jest uważane za podstawowe źródło związków fenolowych, wśród których szczególnym zainteresowaniem cieszą się kwasy hydroksycynamonowe takie jak kwas ferulowy, p-kumarowy, synapinowy i kawowy, które pełnią rolę naturalnych przeciwutleniaczy [17].

Podstawową ścieżką waloryzacji BSG jest skarmianie zwierząt gospodarskich. Ocenia się, że około 70% wytwarzanego globalnie BSG jest stosowane jako pasza dla zwierząt [18], a kolejne 10% celem produkcji biogazu [18]. Ogromna skala produkcji piwa stwarza problemy z utylizacją BSG [19]. Przez wzgląd na krótki okres przydatności, określany na 7 do 10 dni, a także trudności związane z przechowywaniem i transportem, uważa się, że około 20% BSG trafia na składowiska odpadów, co wymusza poszukiwanie ekonomicznie opłacalnych metod zagospodarowania tego surowca [17,18].

BSG zyskuje zainteresowanie jako wartościowy składnik ludzkiej diety, ze względu na obecność prozdrowotnych, bioaktywnych składników oraz wysoką zawartość błonnika rozpuszczalnego [20]. Łatwa dostępność i niska cena rynkowa powodują, że BSG jest szeroko stosowane w biotechnologii. Rozwiązania biotechnologiczne umożliwiają transformację BSG w produkty o wyższej wartości dodanej, co wpisuje się w założenia hierarchii postępowania z odpadami rolno-spożywczymi. Badania naukowe koncentrują się na wykorzystaniu BSG jako substratu w hodowlach mikroorganizmów oraz procesach syntezy produktów ich metabolizmu. BSG jest stosowane celem produkcji enzymów, takich jak amylazy, celulazy, ksylanazy, proteazy, lakazy, esterazy kwasu ferulowego czy α -L-arabinofuranozydazy. BSG jest potencjalnym substratem do produkcji ksylitolu [21], kwasów organicznych (kwasu mlekowego i kwasu cytrynowego) oraz prebiotyków (ksylooligosacharydów i arabinoksylooligosacharydów) [13]. Wysoka zawartość polisacharydów, białka i kwasów hydroksycynamonowych powoduje narastające zainteresowanie naukowców BSG, jako surowcem do ekstrakcji cennych związków, czy to na drodze procesów chemicznych jak hydroliza kwasowa, alkaliczna lub hydrotermalna, czy bardziej przyjaznych środowisku jak fermentacja i hydroliza enzymatyczna [13].

Na potrzeby przedstawionej rozprawy doktorskiej, prowadzono proteolizę BSG w hodowlach bakterii i drożdży. Jak wskazuje Faulds i wsp. (2009) [22] proteoliza BSG może być ograniczona na skutek zmian strukturalnych zachodzących podczas obróbki cieplnej towarzyszącej procesom zacierania i suszenia słodu. Wysoka temperatura przyczynia się do formowania trudnodostępnych agregatów hordeiny B i D oraz gluteliny. Ponadto dostępność frakcji białkowej BSG dla enzymów proteolitycznych ulega obniżeniu, na skutek interakcji z celulozą i ligniną obecną w ścianie komórkowej ziarna. Jednakowoż Niemi i wsp. (2013) [23] udowodnili, że współdziałanie enzymów hydrolitycznych różnych podklas ma pozytywny wpływ na proteolizę BSG. Należy zatem przypuszczać, że proteoliza frakcji

białkowej BSG w warunkach hodowli mikroorganizmów może przebiegać efektywnie, przez wzgląd na wykorzystanie całej puli enzymów produkowanych przez drobnoustroje. Mając na uwadze, że enzymy są zdecydowanie najdroższymi ze wszystkich biomolekuł stosowanych w procesach biotechnologicznych [24], hydroliza w warunkach hodowli mikroorganizmów pozwala znacząco zredukować koszty związane z ich użyciem. Również łagodne warunki temperatury i pH, stosowane dla hodowli mikroorganizmów, w istotny sposób obniżają koszt procesu [25].

Działanie enzymów proteolitycznych na substraty jest wysoce selektywne i specyficzne. Ze względu na specyficzność działania wyróżnia się egzo- i endopeptydazy. Wśród egzopeptydaz wyodrębnia się kolejno karboksy- i aminopeptydazy, odcinające aminokwasy od C- lub N- końca łańcucha polipeptydowego, natomiast endopeptydazy są klasyfikowane na endopeptydazy serynowe, cysteinowe, asparaginianowe, treoninowe i metalopeptydazy. Celem zapewnienia wysokiej wydajności proteolizy białka, powszechną praktyką jest stosowanie proteolizy sekwencyjnej, w którą zaangażowane są proteazy o odmiennej specyfice działania. Przykładem jest aplikowanie Flavourzyme, który łączy aktywność egzo- i endopeptydazy po preparacie Alcalase o charakterystyce wyłącznie endopeptydazy [26]. Hydroliza w kulturach mikroorganizmów pozwala na jednoczesne działanie całej puli różnych proteaz produkowanych przez drobnoustroje, co przez wzgląd na różnice w mechanizmie katalizy różnych grup enzymów proteolitycznych, może przełożyć się na większą wydajność tego procesu.

Współdziałanie enzymów hydrolitycznych różnych podklas, jak również proteoliza prowadzona przy udziale kilku proteaz o odmiennym mechanizmie katalizy, wspomaga rozkład łańcucha polipeptydowego BSG. Jak zauważył Chew i wsp. (2019), wyższy stopień hydrolizy białka (ang. *degree of hydrolysis*, DH%) na mniejsze podjednostki zwiększa możliwość pozyskania biologicznie aktywnych peptydów lub aminokwasów [25].

Bioaktywne peptydy to związki organiczne składające się z 2 do 20 reszt aminokwasowych, połączonych wiązaniem peptydowym, o masie cząsteczkowej nie przekraczającej 6000Da. Powstają na skutek hydrolizy większych fragmentów białka i mogą pozytywnie oddziaływać na zdrowie i funkcjonowanie ludzkiego organizmu. Aktywność biologiczna peptydów zależy od ich składu aminokwasowego, sekwencji aminokwasów oraz masy cząsteczkowej, co z kolei jest determinowane przez naturę substratu białkowego, mechanizm katalizy enzymów użytych do proteolizy, warunków hydrolizy takich jak czas

i temperatura, a także przez stosunek enzymu do substratu. Masa cząsteczkowa peptydów przeciwutleniających mieści się w zakresie 500-1800Da, a ich aktywność jest determinowana obecnością charakterystycznych aminokwasów [27]. Roblet i wsp. (2012) [28] wskazują na dwie grupy aminokwasów odpowiedzialnych za właściwości przeciwutleniające peptydów, a mianowicie aminokwasy aromatyczne takie jak tyrozyna, tryptofan czy fenyloalanina oraz redukujące (zawierające siarkę) jak metionina czy cysteina. Również Elias i wsp. (2008) wykazali, że aminokwasy, które determinują aktywność przeciwutleniającą peptydów, zawierają boczne grupy funkcyjne wiążące siarkę (cysteina i metionina), aromatyczne grupy funkcyjne (tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina) lub grupy funkcyjne zawierające pierścień imidazolowy (histydyna). Ponadto autorzy wskazują na przeciwutleniające właściwości aminokwasów hydrofobowych, takich jak walina czy leucyna, zlokalizowanych na końcu łańcucha peptydowego. Ze względu na wysoką zawartość frakcji białkowej i znaczną koncentrację aminokwasów hydrofobowych, BSG jest perspektywnym surowcem do produkcji peptydów o właściwościach przeciwutleniających. Produkcja peptydów przeciwutleniających z BSG została dotychczas opisana w pracy Verni i wsp. (2020) [30], gdzie zidentyfikowano pięć peptydów (LFGFTYLR, LVLANAIYFK, VGYVANFCK, IFLENVIR i EVQMDFVR), o długości 8-10 aminokwasów, zawierających w swej strukturze liczne aminokwasy aromatyczne i redukujące.

Innymi produktami ubocznymi przemysłu rolno-spożywczego wykorzystanymi na potrzeby przedstawionej pracy doktorskiej, której celem była produkcja biologicznie aktywnych związków są makuchy: rzepakowy i słonecznikowy. Makuchy to główne produkty uboczne procesu wytwarzania olejów roślinnych. Tradycyjnie wykorzystuje się dwie metody produkcji olejów, wśród których wyróżnia się tłoczenie z wykorzystaniem prasy mechanicznej lub ekstrakcję rozpuszczalnikami. Celem ekstrakcji najczęściej stosowany jest n-heksan, benzen, cykloheksan, eter izopropylowy, tetrahydrofuran lub aceton [31]. Metoda produkcji olejów znacząco wpływa na skład chemiczny produktów ubocznych, dlatego terminem makuch określa się odpady generowane na drodze tłoczenia, natomiast pojęciem śruta operuje się w odniesieniu do pozostałości po ekstrakcji rozpuszczalnikami [31,32].

Podczas tłoczenia nasiona zwykle podgrzewa się do temperatury 100°C, a następnie mechanicznie wyłacza się olej. Alternatywnie w przypadku coraz częściej stosowanego tłoczenia na zimno, temperaturę utrzymuje się na poziomie 50-60°C [31]. Z kolei w procesie

ekstrakcji rozpuszczalnikami rozdrobnione nasiona poddaje się działaniu rozpuszczalników, co pozwala zmaksymalizować odzysk oleju [33].

Pozyskiwane wynikiem tłoczenia makuchy to produkty uboczne o wysokiej zawartości składników odżywczych. Makuch rzepakowy zawiera średnio 32% białka, 8,75% tłuszczu oraz 12,0% błonnika, a zawartość węglowodanów, skrobi oraz popiołu mieści się odpowiednio w zakresie 38,5–41,3%, 0,7–2,3% oraz 6,3–7,9%. Makuch rzepakowy posiada zrównoważony profil aminokwasowy, stanowiąc doskonałe źródło aminokwasów egzogennych, wśród których lizyna oraz aminokwasy zawierające w swej strukturze siarkę cieszą się największym zainteresowaniem. Makuch rzepakowy jest źródłem minerałów, takich jak żelazo, miedź, kobalt, magnez, mangan, wapń, fosfor i cynk oraz witamin E, D i B5 [34,35].

Makuch słonecznikowy zawiera odpowiednio 32.0–42.6% i 29.0–43.0% białka i błonnika pokarmowego. Pod względem produkcji jest czwartym najważniejszym odpadem generowanym w olejarniach, zaraz po makuchu sojowym, rzepakowym i nasion bawełny. Makuch słonecznikowy zawiera 1,5–2,9% tłuszczu, 44,8–51,7% węglowodanów, a koncentracja skrobi oraz popiołu mieści się w granicach 0,1-1,5% oraz 6,5-8,0%. To źródło minerałów, wśród których dominuje fosfor, wapń, potas, magnez, cynk, żelazo, mangan, selen i miedź a także witamin z grupy B i E [35,36]. Makuch słonecznikowy dostarcza aminokwasów egzogennych, takich jak cysteina, metionina, leucyna, walina, izoleucyna, tryptofan, alanina i fenyloalanina [37].

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 jest przekształcane w produkt uboczny [38]. Jak pokazują statystyki, z jednej tony nasion rzepaku powstaje około 650 kg makuchu, a jeżeli proces tłoczenia jest uzupełniony o ekstrakcję rozpuszczalnikami, uzyskuje się około 600 kg śruty [39]. Z kolei z jednej tony nasion słonecznika pozyskuje się około 660kg makuchu i 340kg oleju [40]. Uprawy roślin oleistych są zdominowane przez soję, stanowiącą 50% światowej produkcji oraz rzepak i bawełnę, których łączny udział wyliczany jest na 20% [35]. Europa jest największym producentem rzepaku, z wiodącym udziałem Francji, Niemiec i Polski [41]. Bazując na statystykach opracowanych przez Organizację Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), roczna suma produkcji makuchów i śruty utrzymuje się na poziomie 150-160 milionów ton, dlatego niezwykle ważne jest poszukiwanie nowych metod ich zagospodarowania [42].

Tradycyjne ścieżki waloryzacji makuchów obejmują skarmianie zwierząt gospodarskich oraz aplikację w roli kompostu glebowego [43]. W perspektywie aplikacji biotechnologicznych makuchy są wykorzystywane jako substraty do produkcji antybiotyków, biopestycydów i witamin [44] oraz enzymów mikrobiologicznych, z naciskiem na syntezę enzymów lipolitycznych [45]. Co istotnie obserwuje się intensyfikację stosowania makuchów jak i innych produktów odpadowych przetwórstwa olejów w badaniach nad produkcją biosurfaktantów.

Mikrobiologiczne surfaktanty to związki powierzchniowo-czynne, które przez wzgląd na obecność hydrofobowej i hydrofilowej części mają zdolność do gromadzenia się na granicy faz, pomiędzy fazą polarną i niepolarną, modyfikując właściwości powierzchniowe i międzyfazowe roztworów. W konsekwencji działania biosurfaktantów obserwuje się wzrost rozpuszczalności związków polarnych w fazach niepolarnych i odwrotnie [46]. Przewagą biosurfaktantów nad ich syntetycznymi odpowiednikami jest ich biodegradowalność, niska toksyczność, wysoka selektywność, aktywność w skrajnych wartościach pH, temperatury i zasolenia oraz niska wartość krytycznego stężenia micelizacji (ang. *critical micelle concentration*, CMC), która determinuje niewielkie zużycie biosurfaktantu celem redukcji napięcia powierzchniowego (ang. *surface tension*, ST) [47]. Mikroorganizmy zdolne do syntezy biosurfaktantów zamieszkują wody (morskie, słodkie i gruntowe), łądy (gleba, osady i szlamy), a także środowiska charakteryzujące się ekstremalnymi warunkami pH, temperatury czy zasolenia [48]. Celem syntezy biosurfaktantów wykorzystuje się przede wszystkim bakterie i drożdże rodzaju *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* i *Candida* [49].

Podstawą klasyfikacji mikrobiologicznych surfaktantów jest ich budowa oraz pochodzenie. Wyróżnia się biosurfaktanty niskocząsteczkowe, do których zalicza się glikolipidy, lipopeptydy i fosfolipidy oraz wysokocząsteczkowe, takie jak biosurfaktanty białkowe i polimerowe [50]. W ramach przedstawionej pracy doktorskiej makuchy rzepakowe i słonecznikowe wykorzystano jako substrat do produkcji surfaktyny. Surfaktyna jest biosurfaktantem lipopeptydowym naturalnie wytwarzanym przez bakterie *Bacillus subtilis*. Częsteczka surfaktyny składa się z pętli peptydowej, złożonej z siedmiu aminokwasów o sekwencji L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu i hydrofobowego łańcucha kwasu tłuszczowego [51]. Uważa się, że surfaktyna posiada istotne właściwości biologiczne, wśród których najczęściej wymienia się działanie przeciwzapalne,

przeciwmykoplazmatyczne, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe jak również przeciwgrzybiczne [52].

Ograniczeniem aplikacji przemysłowych biosurfaktantów są aspekty ekonomiczne związane z wysokim kosztem ich syntezy. Czynnikiem warunkującym 10-30% całkowitego kosztu produkcji biosurfaktantów jest podłoże hodowlane. Wykorzystanie surowców odpadowych przemysłu rolno-spożywczego stanowi godną uwagi alternatywę [53].

Synteza biosurfaktantów w dużej mierze jest zależna od aktywności enzymów hydrolitycznych w podłożu hodowlanym. Odpowiednio dobrany substrat indukuje biosyntezę zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych, przyczyniając się do hydrolizy frakcji białkowej, a tym samym udostępnienia azotu dla wzrostu kultury, jak również syntezy metabolitów wtórnych. Badania nad produkcją biosurfaktantu, ituryny A pokazały, że śruta rzepakowa indukuje sekrecję proteaz, a tym samym wpływa na poziom produkcji lipopeptydu [54]. Podobny efekt indukcji powinien być zatem obserwowany w podłożu zawierającym makuch rzepakowy i słonecznikowy. Jak podkreślają Mercade i Manresa (1994) [55], produkcję biosurfaktantów wspomagają substraty o odpowiedniej równowadze węglowodanów i lipidów. Makuch rzepakowy i słonecznikowy, ze względu na obecność pozostałego po procesie tłoczenia tłuszczu i wysoką zawartość węglowodanów, stanowi odpowiednio zbilansowany substrat do syntezy surfaktyny. Ponadto de Oliveira Schmidt i wsp. (2021) [56] wskazują na dwie grupy induktorów syntezy biosurfaktantów, do których zalicza się induktory hydrofilowe takie jak jony metali (żelazo, fosfor i mangan), które działają jako kofaktory enzymów uczestniczących w syntezie biosurfaktantów i induktory hydrofobowe (oleje roślinne) stanowiące wtórne źródło węgla metabolizowane na drodze β -oksydacji. Składniki hydrofobowe indukują produkcję biosurfaktantów celem zwiększenia rozpuszczalności hydrofobowych źródeł węgla w podłożu hodowlanym, a także uczestniczą w syntezie hydrofobowych łańcuchów kwasów tłuszczowych biosurfaktantów, modelując produkcję homologów o różnej długościach łańcucha kwasu tłuszczowego. Obecność jonów metali w składzie chemicznym makuchów może pozytywnie wpływać na wydajność produkcji surfaktyny, dostarczając ko faktorów do reakcji enzymatycznych zachodzących w hodowlach bakterii. Dodatkowo pozostały po procesie tłoczenia nasion rzepaku i słonecznika olej, powinien indukować syntezę biosurfaktantów wytwarzanych przez komórki celem metabolizowania nierozpuszczalnego w wodzie źródła pierwiastków budulcowych.

W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej po raz pierwszy sporządzono szczegółową analizę filogenetyczną i analizę syntenii alkalicznych proteaz drożdży kladu *Yarrowia*. Udowodniono przewagę proteolizy BSG prowadzonej w hodowlach mikroorganizmów, nad procesami wykorzystującymi handlowe preparaty enzymatyczne. Wykazano, że na skutek działania różnych enzymów proteolitycznych syntezowanych w hodowlach bakterii i drożdży kladu *Yarrowia*, powstają hydrolizaty o znaczącej aktywności przeciwutleniającej. Istotnym odkryciem prowadzonych badań było wykazanie aktywności inhibitorowej surfaktyny wobec ACE.

2. Cel pracy

Celem pracy była mikrobiologiczna konwersja odpadów piwowarskich i olejarskich w biologicznie aktywne związki. Realizacja badań nad powyższym tematem prowadzona była w oparciu o cele szczegółowe:

- produkcja hydrolizatów frakcji białkowej BSG w hodowlach bakterii proteolitycznych oraz drożdży kladu *Yarrowia*,
- analiza enzymów proteolitycznych zaangażowanych w produkcję biologicznie aktywnych związków,
- wykorzystanie makuchu słonecznikowego i rzepakowego w procesie biosyntezy mikrobiologicznego surfaktantu, surfaktyny w hodowlach bakterii *B. subtilis* #309,
- charakterystyka aktywności biologicznej otrzymanych związków.

3. Materiały i metody

3.1. Mikroorganizmy

W badaniach wykorzystano następujące szczepy bakterii: *B. cereus* PCM 2849, *B. subtilis* PCM 2850, *B. polymyxa* ATCC 842, *B. lentus* PCM 450, *K. rhizophila* PCM 2931, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *B. licheniformis* PCM 1847, *Lactobacillus rhamnosus* PCM 489 i *Escherichia coli* PCM 2560. Bakterie pozyskano z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk (Wrocław, Polska) i przechowywano w 20% roztworze glicerolu (v/v) w temperaturze -80°C w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Wrocław, Polska).

Drożdże kladu *Yarrowia*: *Y. lipolytica* W29, *Yarrowia hollandica* CBS 4855, *Y. galli* CBS 9722, *Y. phangngaensis* CBS 10407, *Y. deformans* CBS 2071, *Y. keelungensis* CBS 11062, *Yarrowia porcina* CBS 12935, *Yarrowia yakushimensis* CBS 10254, *C. hispaniensis* CBS 9996, *Yarrowia bubula* CBS 12934, *Yarrowia osloensis* CBS 10146, *Y. alimentaria* CBS 10151, *Y. divulgata* CBS 11013, *Yarrowia parophonii* CBS 12427 oraz *Yarrowia brassicae* CBS 15225 pozyskano z holenderskiej Kolekcji Kultur Centraalbureau voor Schimmelcultures ((CBS); Holandia) i przechowywano na skosach agarowego podłoża ekstraktu drożdżowego z peptonem i dekstrozą (ang. *Yeast extract-peptone-dextrose*, YPD; Sigma-Aldrich, Niemcy).

B. subtilis #309, wyizolowany z próbki oleju z pola naftowego w Brazylii [57], otrzymano jako dar od doktora Eduardo Gudiña i przechowywano w 20% roztworze glicerolu (v/v) w temperaturze -80°C w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (Wrocław, Polska).

Hodowle inokulacyjne wykorzystywanych w pracy doktorskiej bakterii prowadzono przez 24 godziny przy ciągłym wytrząsaniu (180 rpm) w 250 mL kolbach Erlenmeyera. Bakterie inkubowano w 50 mL bulionu lizogennego ((LB; Sigma-Aldrich, Niemcy) o pH 7,0, w temperaturze 28°C, z wyjątkiem *B. licheniformis* PCM 1847, którego hodowle prowadzono w temperaturze 37°C oraz *L. rhamnosus* PCM 489 i *E. coli* PCM 2560, które

z uwagi na odmienne wymagania pokarmowe hodowano odpowiednio w bulionie wg De Man, Rogosa i Sharpe (MRS; Sigma-Aldrich, Niemcy) o pH 6,2 w temperaturze 37°C oraz w bulionie tryptonowo-sojowym (TSB; Sigma-Aldrich, Niemcy) w temperaturze 28°C. Inokula bakteryjne wirowano (3900rpm, 8 min), a otrzymaną biomasę dwukrotnie przepłukiwano i zawieszano w sterylnej wodzie.

Hodowle *B. subtilis* #309 prowadzono w 300 mL kolbach Erlenmeyera, w 50 mL bulionu lizogenego (LB; Sigma-Aldrich, Niemcy) przez 24 godziny z ciągłym wytrząsaniem (160 rpm).

Hodowle inokulacyjne drożdży kładu *Yarrowia* prowadzono w bulionie YPD ((Sigma-Aldrich, Niemcy) w temperaturze 25°C przez 24 godziny z ciągłym wytrząsaniem (180 rpm). Inokula drożdży wirowano (7500rpm, 10 min), a otrzymaną biomasę dwukrotnie przepłukiwano i zawieszano w sterylnej wodzie.

3.2. Surowce odpadowe przemysłu rolno-spożywczego

BSG pozyskano jako dar od Browaru Stu Mostów (Wrocław, Polska), jako produkt uboczny jednego cyklu produkcyjnego prowadzonego w październiku 2018. Słód, z którego w ramach procesu produkcji piwa wygenerowano BSG zawierał 30% ziarna jęczmienia i 70% ziarna pszenicy. W celu ochrony surowca przed zepsuciem mikrobiologicznym BSG suszono w temperaturze 50°C przez 48 godzin. Proces kontrolowano poprzez cykliczny pomiar wilgotności surowca.

Makuch rzepakowy oraz makuch słonecznikowy, wygenerowane na drodze procesu tłoczenia olejów na zimno, otrzymano od polskiej, lokalnej firmy AleOlej.pl (Wrocław, Polska), specjalizującej się w produkcji szerokiej gamy produktów olejo-pochodnych. Analiza składu makuchów została wykonana przez Krajowe Laboratorium Pasz Instytutu Zootechniki w Państwowym Instytucie Badawczym (Lublin, Polska) i obejmowała pomiar suchej masy (s.m., (%)), włókna detergentowo neutralnego (NDF, (% s.m.)), włókna detergentowo kwaśnego (ADF, (% s.m.)), ligniny detergentowo kwaśnej (ADL, (% s.m.)) i popiołu (% s.m.) metodą grawimetryczną oraz białka ogólnego metodą Kjeldahla. Kompozycję kwasów tłuszczowych (FAs, (% s.m.)) analizowano z wykorzystaniem chromatografii gazowej, sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). W tym celu prowadzono estryfikację kwasów tłuszczowych w 80°C przez 2 godziny za pomocą roztworu metanolowego 2.5% (v/v) kwasu siarkowego. Estry metylowe kwasów tłuszczowych ekstrahowano n-heksanem i oznaczono

na aparacie GC-MS-QP2010 Plus (Shimadzu, Japan), wyposażonym w kolumnę kapilarną Zebron ZB-FAME 30 m x 0.25 mm x 0.20 μm (Phenomenex, USA). Jako fazę ruchomą aplikowano hel ($\geq 99.99999\%$) o ciągłym przepływie 1 mL/min. Zastosowano gradient temperatury 100°C – 210°C o prędkości przyrostu 3°C/min, ze współczynnikiem podziału 1:20. Temperaturę dozownika oraz źródła jonów uderzeniowych utrzymywano odpowiednio na poziomie 250°C i 220°C. Identyfikację kwasów tłuszczowych prowadzono poprzez przyrównanie otrzymanych czasów retencji do standardu (Supelco 37 Component FAME mix, Sigma-Aldrich, USA).

3.3. Warunki hodowli mikroorganizmów na surowcach odpadowych

Hydrolizę białka BSG prowadzono w 250 mL kolbach Erlenmeyera, w 50 mL podłoża zawierającego BSG (50 g/L), MgSO_4 (1 g/L), KH_2PO_4 (0,1 g/L), K_2HPO_4 (0,13 g/L), CaCl_2 (0,5 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L). Proces prowadzono w temperaturze 28°C z ciągłym wytrząsaniem (180 rpm) do momentu osiągnięcia maksymalnego stężenia wolnych grup α -aminowych w medium pohodowlanym. Z uwagi na gwałtowny spadek pH obserwowany po sterylizacji, pH podłoża dostosowano do wartości 7,0 za pomocą sterylnego 5M roztworu NaOH. Podłoże zaszczerpiono odpowiednio 2×10^9 komórek bakterii (**P1**) oraz do wartości gęstości optycznej zawiesiny drożdży $\text{OD}_{600}=0,25$ (**P2**). Niezaszczerpione podłoże BSG, traktowane w sposób analogiczny, stanowiło próbę kontrolną. Odpowiednio w odstępach 24 (**P1**) i 48 (**P2**) godzinnych pobierano 2 mL (**P1**) i 1 mL (**P2**) próby, które wirowano (10000 rpm, 5min) i filtrowano (0,45 μm) celem odseparowania biomasy. Kolejno prowadzono pomiar pH oraz badano postęp hydrolizy białka BSG poprzez analizę stężenia wolnych grup α -aminowych w płynie pohodowlanym, jak również z wykorzystaniem chromatografii wykluczenia [58].

Badania nad produkcją surfaktyny w hodowlach *B. subtilis* #309 (**P3**) prowadzono w 300 mL kolbach Erlenmeyera, w 50 mL podłoża zawierającego odpowiednio makuch słonecznikowy lub rzepakowy (50 g/L) oraz MgSO_4 (1 g/L), KH_2PO_4 (0,1 g/L), K_2HPO_4 (0,13 g/L), CaCl_2 (0,5 g/L) i $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L). Podłoże sterylizowano, a następnie szczepiono stosując 1% inoculum *B. subtilis* #309 (v/v). Hodowlę prowadzono przez 168 godzin w temperaturze 37°C z ciągłym wytrząsaniem (160 rpm). Na każdą dobę hodowli przygotowano jedną kolbę, które w odstępach 24 godzinnych zbierano, płyn pohodowlany wirowano (9500xg, 20 min), a otrzymany supernatant analizowano. Prowadzono pomiar

napięcia powierzchniowego (ang. *surface tension*, ST), wskaźnika emulgacji (ang. *emulsification index*, E₂₄), stężenia surfaktyny (g/l) oraz pH supernatantu.

Docelowo produkcję surfaktyny prowadzono przez 120 godzin, do momentu osiągnięcia maksymalnej koncentracji lipopeptydu w podłożu hodowlanym. Płyn pohodowlany wirowano (9500 g, 20 min), a surfaktynę wytrącano poprzez zakwaszenie za pomocą 6 M HCl do pH 2,0. Surfaktynę wytrącano przez noc w temperaturze 4°C. Supernatant wirowano (9500 g, 20 min), a otrzymany osad lipopeptydu rozpuszczano w wodzie dejonizowanej. Kolejno roztwór surfaktyny doprowadzono do pH 7,0 za pomocą stężonego NaOH. Proces oczyszczania kontynuowano stosując ekstrakcję do fazy stałej (ang. *solid phase extraction*, SPE). W tym celu roztwór surfaktyny wprowadzono na kolumnę systemu Chromabond C18 SPE (Macherey-Nagel, Niemcy) i eluowano gradientem acetonitrylu (40, 60, 80 i 100% acetonitryl-woda (v/v)). Finalnie 80% roztwór acetonitrylu (v/v) (zawierający surfaktynę) zatężono z wykorzystaniem ciekłego azotu. Analiza masowa oczyszczonej surfaktyny prowadzona przy pomocy system UHPLC Dionex UltiMate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone Ameryki) połączonego z MaXis Impact QTOF (Bruker, Niemcy) wykazała czystość związku na poziomie ≥99%.

3.4. Analizy bioinformatyczne

3.4.1. Analiza *in silico* frakcji białkowej BSG jako źródła bioaktywnych peptydów

W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej BSG wykorzystano jako źródło biologicznie aktywnych peptydów. W tym celu sekwencje aminokwasowe białek jęczmienia, takich jak hordeiny B (GenBank: AAZ76368.1), hordeiny C (GenBank: AAA92333.1), hordeiny D (GenBank: BAA11642.1), hordeiny gamma 1 (GenBank: AFM77737.1), hordeiny gamma 2 (GenBank: CAE45747.1), hordeiny gamma 3 (GenBank: AFM77739.1), globuliny (GenBank: AAP31050.1) i gluteliny (GenBank: BAK04052.1) oraz pszenicy to jest alfa gliadyny (GenBank: ABS72146.1), alfa/beta gliadyny (GenBank: BAS02464.1), gamma gliadyny (GenBank: AAQ63856.1), omega gliadyny (GenBank: AAT01617.1) i gluteniny (GenBank: CAA27052.1), zdeponowane w bazie Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI), analizowano za pomocą bazy danych BIOPEP-UWM.18 [59]. Sekwencje białek jęczmienia i pszenicy hydrolizowano *in silico* z wykorzystaniem subtylizyny (EC 3.4.21.62), kokolizyny (EC 3.4.24.30), proteinazy P1 (EC 3.4.21.96),

oligopeptydazy F (EC 3.4.24), oligopeptydazy B (EC 3.4.21.83), termolizyny (EC 3.4.24.27), proteinazy K (EC 3.4.21.67) i 8-V-proteazy (EC 3.4.21.19), bakteryjnych enzymów proteolitycznych, charakteryzujących się odmiennym mechanizmem katalizy i pochodzeniem.

3.4.2. Analiza filogenetyczna i analiza syntenii enzymów proteolitycznych kladu *Yarrowia*

Genomy drożdży kladu *Yarrowia*, opublikowane uprzednio przez Červenák i wsp. (2019) [60], wykorzystano celem ekstrakcji sekwencji kodujących enzymy proteolityczne, na podstawie homologii względem alkalicznej zewnątrzkomórkowej proteazy (ang. *alkaline extracellular protease*, Aep) (*XPR2*) *Y. lipolytica* A101 (*YALIA101S03e00364g*). Zastosowano próg dla współczynnika E (E value), dla operacji prowadzonych w programie blastp na poziomie $1.e^{-20}$. Analizę porównawczą prowadzono z wykorzystaniem programu Clustal Omega [61] w wieloplatformowym, graficznym interfejsie Seaview wersja 4.6.2 [62]. Bloki domen konserwatywnych enzymów proteolitycznych, istotne dla analizy filogenetycznej, identyfikowano z wykorzystaniem programu Gblocks [63]. Drzewo filogenetyczne skonstruowano w oparciu o metodę największego prawdopodobieństwa przy pomocy oprogramowania PhyML 3.0 [64] z uwzględnieniem modelu ewolucji Le Gascuela (LG). Prawidłowość konstrukcji drzewa oceniono metodą testu przybliżonego ilorazu wiarygodności (aLRT). Analizę syntenii wykonano manualnie wykorzystując przeglądarkę genomów Artemis [65].

3.4.3. Analiza *in silico* ekspresji genów proteaz *Y. lipolytica* na różnych podłożach hodowlanych

Bazując na danych opublikowane przez Meunchan i wsp. (2015) [66] badano poziom ekspresji genów kodujących domniemane enzymy proteolityczne *Y. lipolytica* W29 na drożdżowej bazie azotowej (YNB; Sigma-Aldrich, Niemcy) wzbogaconej w kwas oleinowy (ang. *oleic acid*) (YNB+OA), glukozę (YNB+GLU) oraz trójmaślan glicerolu (ang. *tributyryn*) (YNB+TB). Ponadto wykonano analizę ekspresji genów na podłożu YPD i YPD o pH 4,0 dla szczepu potomnego *Y. lipolytica* E150 (*ku70::URA3*, *LEU2*) wykorzystując niepublikowane dotychczas dane Neuvéglise i wsp. z analizy sekwencji cDNA. Geny kodujące proteazy

sprawdzono pod względem występowania sekwencji sygnałnych wykorzystując program SignalP-5.0 [67] oraz DeepLoc-1.0 [68].

3.5. Analizy istotne dla procesu hydrolizy frakcji białkowej BSG oraz makuchów

3.5.1. Wstępna analiza aktywności proteolitycznej i lipolitycznej bakterii i drożdży

Analizę aktywności proteolitycznej drożdży kladu *Yarrowia* (P2) oraz bakterii *B. subtilis* #309 (P3) wykonano w hodowlach na agarze wzbogaconym w mleko odtłuszczone. W tym celu wystandaryzowane hodowle drobnoustrojów ($OD_{600}=1,0$) nakrapiano w ilości 5 μ L na podłoże zawierające 2% agaru (m/v) i 10% sterylnego odtłuszczonego mleka o stężeniu 0,5% (m/v). Płytki inkubowano przez 24 (P2) lub 96 (P3) godzin w temperaturze odpowiednio 25°C (P2) lub 37°C (P3). Finalnie wykonano pomiar stref proteolizy. Kontrolę negatywną stanowiła płytka przygotowana w sposób analogiczny, jednakże wystandaryzowane hodowle drożdży zastąpiono sterylnym, bulionem YPD (P2), a hodowlę *B. subtilis* #309 bulionem LB (P3).

Mając na uwadze, że makuchy to odpady procesu tłoczenia olejów, stanowiące bogate źródło kwasów tłuszczowych, wykonano analizę aktywności lipolitycznej *B. subtilis* #309 (P3). Badanie miało na celu sprawdzenie możliwości utylizacji kwasów tłuszczowych, jako źródła pierwiastków do syntezy struktur i metabolitów komórkowych *B. subtilis* #309. W tym celu 5 μ l wystandaryzowanej hodowli *B. subtilis* #309 ($OD_{600}=1,0$) nakrapiano na podłoże agarowe wzbogacone trójmaślanem glicerolu (2% agar (m/v), 1% pepton (m/v), 0,5% ekstrakt drożdżowy (m/v), 1% trójmaślan glicerolu (m/v)). Hodowlę inkubowano przez 96 godzin w temperaturze 37°C. Obecność przejrzystych stref wokół kolonii stanowiła potwierdzenie aktywności lipolitycznej.

3.5.2. Analiza ekspresji enzymów proteolitycznych *Y. lipolytica* w podłożu BSG

Analizę ekspresji genów kodujących domniemane proteazy alkaliczne *Y. lipolytica* W29 prowadzono w hodowlach na podłożu BSG zgodnie z metodą opisaną w punkcie 3.3. Hodowle prowadzono przez 72 godziny. Po tym czasie płyn pohodowlany sączono przez filtry Whatmana i zbierano do 50 mL probówek typu Falcone. Kolejno permeat rozdzielono na 2 mL próby, odwirowano (15000 rpm, 1 min), a otrzymany osad komórkowy trzykrotnie przemyto sterylną wodą destylowaną i zamrożono w ciekłym azocie. Ekstrakcję

RNA prowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych przy użyciu zestawu RNeasy Micro Kit (Qiagen, Holandia) zgodnie z instrukcjami producenta. RNA trawiono Dnazą (Thermo Fisher Scientific, USA) i prowadzono reakcję odwrotnej transkryptazy przy użyciu zestawu Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Komplementarny DNA (cDNA) wykorzystano jako matrycę w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) prowadzonej przy użyciu Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) i starterów wymienionych w Tab. 5 (**P2**; Tab. 5). Celem weryfikacji poprawności prowadzonej analizy wykorzystano gen metabolizmu podstawowego, to jest gen aktywny (*Act*, *YALIOD08272*). Analogicznej analizie poddano gen kodujący Aep (*XPR2*) *Y. deformans* (*YADE0S25e00298g*).

3.5.3. Analiza postępu hydrolizy frakcji białkowej BSG w hodowlach bakterii proteolitycznych i drożdży

Postęp hydrolizy frakcji białkowej BSG w hodowlach bakterii (**P1**) i drożdży (**P2**) monitorowano poprzez wyliczenie %DH. W tym celu stężenie wolnych grup α -aminowych w kulturach drobnoustrojów porównano z wartości uzyskaną wynikiem hydrolizy całkowitej frakcji białkowej BSG w kwasie solnym. Proces hydrolizy całkowitej prowadzono poprzez zmieszanie 1 g BSG z 8 mL 6M HCl. Próby inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 105°C [69] a następnie filtrowano. Permeat uzupełniono 8 mL 6M NaOH celem neutralizacji pH. Finalnie oznaczono koncentrację wolnych grup α -aminowych [58] w otrzymanym roztworze, która stanowiła wartość referencyjną dla hodowli mikroorganizmów. %DH dla hodowli mikroorganizmów obliczano według następującego równania (1):

$$\%DH = \frac{BH \times 100}{TH} \quad (1)$$

gdzie TH oznacza wartość średnią koncentracji grup α -aminowych z trzech powtórzeń pozyskanych na skutek hydrolizy całkowitej, a BH stanowi wartość średnią z trzech powtórzeń otrzymanych dla hodowli mikroorganizmów, przeliczoną na 1g BSG.

Postęp hydrolizy frakcji białkowej BSG w hodowlach bakterii (**P1**) analizowano ponadto z wykorzystaniem chromatografii wykluczenia. W tym celu 2 mL próby podłoża pochodzącego bakterii wirowano (10000 rpm, 5 min) i filtrowano (0,45 μ m) celem separacji biomasy, a otrzymany supernatant analizowano za pomocą układu

chromatograficznego Bio-Rad (Stany Zjednoczone Ameryki) wyposażonego w kolumnę ENrich SEC 70 10x300 (Bio-Rad, Stany Zjednoczone Ameryki) o zakresie separacji 0.5–70 kDa. Elucję produktów hydrolizy prowadzono za pomocą 50 mM buforu Tris–HCl zawierającego 0,2 M NaCl (pH 7,9) przy prędkości przepływu 0,8 mL/min. Detekcję prowadzono przy długości fali 280 nm.

3.5.4. Ocena aktywności proteolitycznej kładu *Yarrowia* w podłożu BSG

Aktywność proteolityczną drożdży kładu *Yarrowia* (P2) badano poprzez zmieszanie 0,05 mL supernatantu podłoża hodowlanych z 0,45 mL roztworu kazeiny (1,1% w 50 mM buforze Tris-HCl, pH 7,5) i 0,5 mL 50 mM buforu Tris-HCl (pH 7,5) [70]. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w temperaturze 55°C przez 10 minut. W celu zakończenia reakcji enzymatycznej mieszaninę uzupełniono o 0,5 mL 8% (m/v) kwasu trichlorooctowego (ang. *trichloroacetic acid*; TCA) ($\geq 99.0\%$; Sigma-Aldrich, Niemcy). Finalnie próby wirowano (12000 rpm, 15 min), a absorbancję supernatantów oznaczano przy długości fali 280 nm. Analogicznie przygotowano kontrolę negatywną, w której podłoża hodowlane zastąpiono podłożem nieinokulowanym (próba kontrolna). Jako kontrolę pozytywną zastosowano proteazę *B. licheniformis* ($\geq 2,4$ U/g; Sigma-Aldrich, Niemcy). Celem sporządzenia krzywej wzorcowej wykorzystano roztwór tyrozyny o zakresie stężeń 0-2 mM. Jednostkę aktywności enzymu zdefiniowano jako ilość enzymu potrzebną do uwolnienia 1 μ mola tyrozyny przez 1 mL podłoża hodowlanego w ciągu 1 minuty w warunkach doświadczalnych.

3.5.5. Oznaczenie profilu enzymów proteolitycznych

Istotnym elementem badań było sprawdzenie profilu enzymów uczestniczących w proteolizie frakcji białkowej BSG w hodowlach bakterii (P1) i drożdży (P2) oraz makuchu rzepakowego i słonecznikowego w hodowli *B. subtilis* #309 (P3). Wykonano zymografię żelatynową zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Zhang i wsp. (2007). Próby podłoża hodowlanego, zebrane w 96 (P1), 72 (P2) oraz 24 i 96 (P3) godzinie hodowli, mieszano w stosunku 1:1 z buforem obciążającym (62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS (m/v) ($\geq 99.0\%$; Sigma-Aldrich, Niemcy), 25% glicerol (v/v), 0,01% błękit bromofenolowy (m/v) (Sigma-Aldrich, Niemcy)), chłodzono i aplikowano na 10% żel poliakrylamidowy SDS-PAGE zawierający 0,1% żelatyny (m/v) (P1; Rys. 1). Elektroforezę prowadzono w warunkach niedenaturujących pod napięciem 150 V utrzymując ciągłe chłodzenie (pojemnik

do elektroforezy umieszczony na lodzie w chłodni). Zachowanie niskiej temperatury procesu miało na celu przeciwdziałanie nadmiernemu trawieniu ścieżki migracji enzymów proteolitycznych. Kolejno żele płukano w trzech 30 minutowych cyklach w roztworze Triton (2,5% Triton X-100 (v/v); (Sigma-Aldrich, Niemcy), 50 mM Tris-HCl) i inkubowano w 50 mM buforze Tris-HCl (5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl (pH 7,5)) w temperaturze 28°C przez 12 godzin. W końcowym etapie żele barwiono w roztworze Coomassie Brilliant Blue R250 (0,1% Coomassie blue (m/v), 40% metanol (v/v), 10% kwas octowy (v/v)) przez 3 godziny i odbarwiono (40% metanol (v/v), 10% kwas octowy (v/v)) do momentu uwidocznienia stref proteolizy na ciemnym niebieskim tle. PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10 - 250 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA) (**P1**, **P3**) oraz PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 - 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA) (**P2**) wykorzystano jako wzorzec masy cząsteczkowej. Niezaszczepione podłoże BSG wykorzystano jako kontrole negatywną. Komercyjną proteazę *B. licheniformis* ($\geq 2,4 \text{ Ug}^{-1}$; Sigma-Aldrich, Niemcy) zastosowano jako kontrolę pozytywną dla hodowli bakterii (**P1**).

Modyfikację mającą na celu zwiększenie i wystandaryzowanie ilości białka enzymatycznego nanoszonego na żel wprowadzono w dla hodowli kladu *Yarrowia* (**P2**). Zwirowane i przefiltrowane próby podłoża hodowlanego zatężono przy użyciu membran wirówkowych Amicon, tak aby finalnie aplikować około 5 µg białka na studzienkę żelu.

3.5.6. Analiza proteomiczna enzymów proteolitycznych kladu *Yarrowia*

Celem przygotowania prób enzymów proteolitycznych drożdży *Yarrowia* (**P2**) do analizy proteomicznej wykonano elektroforezę SDS-PAGE. Supernatanty uzyskane po 72 godzinach hodowli drożdży wytrącano za pomocą acetonu. W tym celu schłodzone na lodzie supernatanty (400 µL) mieszano z 1600 µL acetonu o temperaturze -80°C. Mieszaniny inkubowano w temperaturze -80°C przez godzinę z zapewnieniem ciągłego wytrząsania. Próby wirowano (13000 rpm, 15 min), a otrzymane osady białka odparowywano do sucha za pomocą wyparki próżniowej. Kolejno osady zawieszono w 50 µL 50 mM buforu Tris-HCl (pH 7,4) uzyskując 8-krotne zwiększenie koncentracji białka. Ze względu na brak pozytywnego wyniku analizy dla supernatantów *Y. divulgata*, *Y. hollandica*, *Y. bubula*, *Y. brassicae*, *Y. yakushimensis*, procedurę powtórzono uzyskując 20-krotne zatężenie. Tak przygotowane próby mieszano z 4xLaemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, USA) i nanoszono na 10% żel poliakrylamidowy. Elektroforezę prowadzono pod

napięciem 150 V. Żele barwiono roztworem Coomassie Brilliant Blue R250 (40% metanol (v/v), 10% kwas octowy (v/v), 0,1% błękit Coomassie (m/v) (Sigma-Aldrich, Niemcy)) przez godzinę i odbarwiano (40% metanol (v/v), 10% kwas octowy (v/v)) przez noc. PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10 - 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA) zastosowano jako wzorzec masy cząsteczkowej. Jako kontrolę negatywną wykorzystano niezaszczepione podłoże BSG. Pozyskane na żelu prążki wycinano celem przeprowadzenia analizy proteomicznej.

Analiza proteomiczna enzymów kladu *Yarrowia* została wykonana przez Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Warszawa, Polska). Prążki żelu suszono acetonem, a następnie redukowano przez 30 min w 57°C używając 10 mM roztworu ditiotreitolu sporządzonego 100 mM NH₄HCO₃. Cysteiny alkilowano przez 45 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej za pomocą 0,5 M jodoacetamidu sporządzonego w 100 mM roztworze NH₄HCO₃. Białka trawiono przez noc w 37°C trypsyną (10 ng/μL; Promega, USA) w 25 mM roztworze NH₄HCO₃. Następnie próbki zatężono i odsolono na prekolumnie RP-C18 (Waters, Australia). Rozdział peptydów prowadzono na kolumnie RP-C18 nano-Ultra Performance Liquid Chromatography BEH130 75 μm x 250 mm (Waters, USA) z zastosowaniem system Nano ACQUITY UPLC, zapewniającego 45-minutowy liniowy gradient acetonitrylu. Otrzymane dane przetworzono wstępnie za pomocą oprogramowania Mascot Distiller (wersja 2.7, MatrixScience). Uzyskane masy peptydów oraz widma fragmentacji białek porównano do danych zgromadzonych w bazie Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI).

3.6. Badania dotyczące surfaktyny produkowanej w hodowlach bakterii *B. subtilis* #309

3.6.1. Pomiar napięcia powierzchniowego (ST)

ST supernatantów po hodowlach *B. subtilis* #309 (P3) określano techniką pierścieniową du Noüy'a za pomocą tensjometru Krüss K6 (Krüss, Niemcy) zgodnie z metodyką opisaną przez Janek i wsp. (2010) [72]. Każdorazowo tensjometr kalibrowano przy użyciu ultra czystej wody i dokonywano pomiaru napięcia powierzchniowego w temperaturze 25°C.

3.6.2. Wyznaczenie indeksu emulgacji (E₂₄)

Emulgacja jest procesem łączenia dwóch niemieszających się substancji, prowadzącym do powstania trwałej emulsji. E₂₄ supernatantów po hodowlach *B. subtilis* #309 (P3) oznaczano poprzez zmieszanie 2 mL próby z 2 mL n-heksadekanu [72]. Roztwór mieszano przez 2 minuty, po czym pozostawiono na 24 godziny do ustabilizowania warstwy emulsji. Finalnie wykonano pomiar wysokości warstwy emulsji i mieszaniny. E₂₄ obliczono według równania (2) zaprezentowanego poniżej:

$$E_{24}(\%) = \frac{\text{wysokość warstwy emulsji}}{\text{wysokość słupa cieczy}} \times 100 \quad (2)$$

3.6.3. Wyznaczenie kinetyki produkcji surfaktyny

Stężenie surfaktyny w każdej dobie hodowli *B. subtilis* #309 (P3) analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej ((ang. *high performance liquid chromatography*, HPLC); Shimadzu, Japonia). W tym celu 100 µL supernatantu rozpuszczono w 900 µL metanolu (Chempur, Polska) i aplikowano na kolumnę Hypersil GOLD (5 µm; 4,6 x 150 mm) w objętości 10 µL. Elucję prowadzono z szybkością przepływu 0,5 ml min⁻¹ przez 25 minut. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę rozpuszczalnika A (0,1% kwas trifluorooctowy (m/v)) i B (0,1% kwas trifluorooctowy w acetonitrylu (m/v)) według następującego schematu (% A:B (v/v)): 0 min (50:50), 5 min (20:80), 9 min (10:90), 15 min (0:100), 21 min (0:100), 24 min (50:50) i 25 min (50:50). Detekcję prowadzono przy długości fali 210 nm. Zarówno kwas trifluorooctowy (≥99%, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone Ameryki) jak i acetonitryl (≥99% Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone Ameryki) były analitycznie czyste. Stężenie surfaktyny obliczono na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla standardu surfaktyny (≥98,0%, Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone Ameryki).

3.6.4. Analiza profilu homologów surfaktyny

Celem zbadania profilu homologów surfaktyny *B. subtilis* #309 (P3) oczyszczony roztwór lipopeptydu hydrolizowano 6 M HCl w temperaturze 100°C przez 24 godziny [72]. Kolejno wykonano trzykrotną ekstrakcję kwasów tłuszczowych eterem dietylowym. Otrzymane kwasy tłuszczowe estryfikowano za pomocą 2,5% metanolowego roztworu kwasu siarkowego (v/v) w temperaturze 80°C przez 2 godziny. Estry metylowe kwasów

tłuszczowych ekstrahowano n-heksanem i analizowano techniką chromatografii gazowej na aparacie GC-MSQP2010 Plus (Shimadzu, Japonia) zgodnie z metodą opisaną w punkcie **3.2.** Identyfikację otrzymanych związków prowadzono wykorzystując bazę danych Narodowego Instytutu Standardów i Technologii (ang. *National Institute of Standards and Technology*, NIST, Stany Zjednoczone Ameryki).

3.6.5. Analiza surfaktyny jako środka do usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych

Możliwości aplikacyjne surfaktyny w usuwaniu zanieczyszczeń ropopochodnych analizowano za pomocą piasku zawierającego 12,5% (m/m) oleju silnikowego [73]. Zmieszano 40 g piasku z 5 g oleju silnikowego i pozostawiono na 24 godziny. Po tym czasie próbkę uzupełniono o 40 mL płynu pochodzącego *B. subtilis* #309. Próbę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 40°C z ciągłym wytrząsaniem (90 rpm). Po tym czasie odzyskany olej zebrano z powierzchni roztworu i przeniesiono do probówki typu Eppendorf. Próby zwirowano (9000 rpm, 20 min), a następnie wyliczono ilość odzyskanego oleju. W celu wykonania próby kontrolnej płyn pochodzący *B. subtilis* #309 zastąpiono wodą.

3.7. Analiza właściwości biologicznych

3.7.1. Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej surfaktyny i hydrolizatów frakcji białkowej BSG

Próby zebrane po 96 godzinie hodowli bakterii (**P1**) oraz 120 godzinie hodowli kładu *Yarrowia* (**P2**) i *B. subtilis* #309 (**P3**) analizowano trzema metodami ABTS, DPPH, FRAP z uwagi na znaczące różnice mechanizmu reakcji. W metodzie ABTS obserwuje się wygaszanie pasma absorpcji kationorodnika ABTS^{•+} na skutek działania przeciwutleniacza [74]. Celem przeprowadzenia analizy wygenerowano kation wolnorodnikowy ABTS^{•+} poprzez zmieszanie 7 mM roztworu podstawowego kwasu 2,2'-azyno-di-(3-etylobenzotiazolinosulfonowego) (≥98% (ABTS); Sigma-Aldrich, Niemcy) z 2,45 mM peroksydisiarczanem potasu (≥98%; Sigma-Aldrich, Niemcy). Mieszaninę inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 12–16 godzin. Po tym czasie, za pomocą wody destylowanej, dostosowano absorbancję roztworu wolnego rodnika ($\lambda=734$ nm) do wartości 0,7 ($\pm 0,02$). Kolejno 10 μ L próby mieszano z 990 μ L roztworu ABTS^{•+} i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Pomiar absorbancji

wykonano za pomocą czytnika mikroplótek Spark® (Tecan Group Ltd., Szwajcaria) przy długości fali 734 nm. Etanolewy roztwór kwasu 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowego ($\geq 97\%$ (Trolox); Sigma-Aldrich, Niemcy), syntetycznego analogu alfa-tokoferolu, wykorzystano celem sporządzenia krzywej wzorcowej w zakresie stężeń 0–2000 $\mu\text{M/L}$. Aktywność przeciwutleniającą hydrolizatów frakcji białkowej BSG i surfaktyny wyrażono jako ekwiwalent pojemności antyoksydacyjnej Troloxu w przeliczeniu na gram badanego związku ($\mu\text{M TEAC/g}$).

Wychwytywanie wolnych rodników 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylu (DPPH^{*}) analizowano zgodnie z metodą Xu i Chang (2008) [75] z pewnymi modyfikacjami. Istotą metody jest spadek absorbancji próby wynikający z obniżenia stężenia rodnika DPPH^{*} na skutek działania przeciwutleniacza. Zasadniczo 50 μL supernatantu po hodowli bakterii (P1) lub 10 μL supernatantu po hodowli drożdży (P2) i *B. subtilis* #309 (P3) mieszano odpowiednio z 950 μL (P1) lub 190 μL (P2, P3) 0,1 mM etanolewego roztworu wolnego rodnika DPPH^{*} (Sigma-Aldrich, Niemcy). Próby inkubowano w temperaturze pokojowej w ciemności przez 30 min. Pomiar absorbancji wykonano względem ślepej przygotowanej poprzez zmieszanie supernatantu z roztworem etanolu z zachowaniem przyjętej proporcji. Próby wirowano (12000 rpm, 5 min), a następnie dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali 517 nm stosując czytnik mikroplótek Spark® (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Zdolność wychwytywania wolnych rodników obliczono na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla roztworu Troloxu o stężeniu 0–1000 $\mu\text{mol/L}$. Aktywność przeciwutleniającą hydrolizatów frakcji białkowej BSG i surfaktyny wyrażono jako ekwiwalent pojemności antyoksydacyjnej Troloxu w przeliczeniu na gram badanego związku ($\mu\text{M TEAC/g}$).

Zdolności przeciwutleniacza do redukcji Fe^{3+} w kompleksie z 2,4,6-Tris (2-pirydylo)-5-triazyną ($\geq 98\%$ (TPTZ); Sigma-Aldrich, Niemcy) do Fe^{2+} -TPTZ analizowano metodą Benzie i Strain (1996) [76]. Roztwór Fe^{2+} -TPTZ charakteryzuje się intensywnie niebieskim kolorem, a więc przyrost stężenia tego kompleksu monitoruje się spektrofotometrycznie. W celu analizy możliwości redukcji Fe^{3+} 100 μL supernatantu po hodowli bakterii (P1) oraz 50 μL supernatantu po hodowli kladu *Yarrowia* (P2) i surfaktyny *B. subtilis* #309 (P3) mieszano odpowiednio z 300 μL (P1) lub 150 μL (P2, P3) roztworu roboczego ABC (1A:1B:10C). Roztwór ABC przygotowanego poprzez zmieszanie odczynnika A (10 mM TPTZ (Sigma Aldrich, Niemcy) w 40 mM HCl) z odczynnikami B (20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 97\%$); Sigma Aldrich, Niemcy)) oraz C (0,3 M bufor octanowy o pH 3,6). Mieszaninę inkubowano przez

10 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano (12000 rpm, 5 min). Pomiar absorbancji prowadzono za pomocą czytnika mikroplitek Spark® (Tecan Group Ltd., Szwajcaria) przy długości fali 593 nm. Krzywą wzorcową, o zakresie stężeń 0–500 µM/L, sporządzono dla roztworu Troloxu. Aktywność przeciwutleniającą badanych związków wyrażono jako ekwiwalent pojemności antyoksydacyjnej Troloxu w przeliczeniu na gram związku (µM TEAC/g).

Aktywność przeciwutleniającą surfaktyny analizowano z wykorzystaniem roztworu o znanym stężeniu 1mg/mL (**P3**). Koncentrację peptydów w hydrolizatach frakcji białkowej BSG (**P1**, **P2**) badano zgodnie ze zmodyfikowaną metodą Lowry'ego [77]. W tym celu próby o objętości odpowiednio 100 µL (**P1**) i 10 µL (**P2**) mieszano odpowiednio z 500 µL (**P1**) lub 50 µL (**P2**) roztworu AB i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Wykorzystany w badaniach roztwór AB przygotowano poprzez zmieszanie odczynnika A (0,1 M NaOH, 0,2 M Na₂CO₃) z odczynnikiem B (1% cytrynianu sodu (m/v)) w stosunku 50:1. Mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 10 minut, a następnie uzupełniono odpowiednio 50 µL (**P1**) lub 5 µL (**P2**) odczynnika Folina-Ciocalteau (Sigma-Aldrich, Niemcy). Mieszaninę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności, a następnie wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 750 nm za pomocą czytnika mikroplitek Spark® (Tecan Group Ltd., Szwajcaria). Stężenie peptydów oznaczono na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla standardu trawienia peptydów ((ang. *Peptide Digest Assay Standard*) (Thermo Fisher Scientific, USA) w zakresie 0-1000 µg/mL. Wszystkie opisane analizy aktywności przeciwutleniającej hydrolizatów frakcji białkowej BSG (**P1**, **P2**) i surfaktyny (**P3**) wykonano w trzykrotnym powtórzeniu. Wyniki wyrażono w formie wartości średniej ± odchylenie standardowe (SD). Istotność statystyczną rezultatów uzyskanych dla hodowli kładu *Yarrowia* (**P2**) określono za pomocą testu t-Studenta. Poziom istotności ustalono na $p < 0,05$.

3.7.2. Analiza aktywności inhibitorowej surfaktyny wobec konwertazy angiotensyny (ACE)

Aktywność inhibitorową surfaktyny (**P3**) wobec ACE analizowano zgodnie z metodą opisaną przez Udenigwe i Aluko (2012) [78] po przez zmieszanie 250 µL substratu z 50 µL surfaktyny i 5 µL ACE. Stopień inhibicji ACE określono ilościowo po przez wyznaczenie zależności hamowania ACE (%) od stężenia surfaktyny, którą aplikowano w zakresie stężeń

0,1-1 mg/mL. Wyznaczono wartość IC₅₀ surfaktyny (mg/mL). Analizę prowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.7.3. Dokowanie molekularne surfaktyny do domeny C i N konwertazy angiotensyny (ACE)

Strukturę molekularną surfaktyny zoptymalizowano na poziomie teoretycznym PM6 z wykorzystaniem pakietu Gaussa 09 [79]. W oparciu o model polaryzowalnego kontinuum (PCM) [80] uwzględniono wpływ rozpuszczalników na proces dokowania. Dokowanie molekularne surfaktyny do domeny C i N ACE wykonano za pomocą programu AutoDock 4.2 [81]. Strukturę domeny C i N ludzkiego enzymu ACE pozyskano z Protein Data Bank (identyfikator PDB: odpowiednio 2XY9 i 2XYD) [82,83]. Zastosowano lamarckowski algorytm genetyczny z wyszukiwaniem lokalnym, w sumie 500 przebiegów dla obu domen. Obliczenia wykonano dla populacji 150 osobników z 27 000 pokoleń i 250 000 ocen energetycznych.

Wyznaczono energię swobodną wiązania ($\Delta G_{\text{binding}}$), określającą wzajemne powinowactwo kompleksu ACE-surfaktyna, bazując na równaniu przedstawionym poniżej (3):

$$\Delta G_{\text{binding}} = [\Delta G_{\text{intermolecular}} + \Delta G_{\text{internal}} + \Delta G_{\text{tors}}] - \Delta G_{\text{unbound}} \quad (3)$$

Energia oddziaływań międzycząsteczkowych ($\Delta G_{\text{intermolecular}}$) stanowiąca sumę energii dyspersji, wiązań wodorowych, elektrostatyki i desolvatacji została obliczona zgodnie z następującym wzorem (4):

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{intermolecular}} &= W_{vdw} \\ &+ \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\ &+ W_{\text{hbond}} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ &+ W_{\text{elec}} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} \\ &+ W_{\text{sol}} \sum_{i,j} (S_i V_i + S_j V_j) e^{\left(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2 \right)} \end{aligned} \quad (4)$$

Uzyskane wyniki analizowano z wykorzystaniem systemu UCSF Chimera [84] oraz pakietu LIGPLOT v.4.5.3 [85].

4. Komentarze do publikacji

- 4.1. **Publikacja 1 (P1):** Ciorco D., Łaba W., Żarowska B., Janek T. 2021. **Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain.** *RSC Advances*: 11 (8), 4688-4700. DOI: [10.1039/D0RA08830G](https://doi.org/10.1039/D0RA08830G)

W Publikacji 1 (P1) opisano produkcję hydrolizatu frakcji białkowej BSG. Początkowo wykonano symulację hydrolizy białka *in silico* celem weryfikacji, czy BSG może być źródłem biologicznie aktywnych peptydów. Hydrolizę *in silico* prowadzono przy użyciu modułu bazy danych BIOPEP-UWM z wykorzystaniem bakteryjnych proteaz, wyselekcjonowanych na podstawie odmiennej specyfiki katalizy reakcji hydrolizy łańcucha peptydowego [86]. Przeprowadzona analiza wykazała, że BSG może być źródłem peptydów prezentujących aktywność przeciwutleniającą, stymulującą wychwyt glukozy i uwalnianie substancji wazoaktywnych. Wynikiem hydrolizy *in silico* otrzymano inhibitory ACE, zależnej od kalmoduliny cyklicznej fosfodiesterazy nukleotydu (ang. *calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase*, CaMPDE), oligopeptydazy prolilowej i reniny (**P1**; Tab. S1). Co więcej wykazano możliwość powstawania peptydów o szkodliwym działaniu w stosunku do osób cierpiących na celiakię. Najczęstszym produktem symulacji proteolizy były inhibitory peptydazy dipeptydylowej IV (ang. *dipeptidyl peptidase IV*, DPP IV) i peptydazy dipeptydylowej III (ang. *dipeptidyl peptidase III*, DPP-III), których ze względu na dużą liczbę nie uwzględniono w Tab. S1.

W kolejnym etapie badań prowadzono hydrolizę frakcji białkowej BSG w hodowlach bakterii proteolitycznych. BSG użyto jako jedyne źródło składników odżywczych dla wzrostu bakterii. Postęp procesu hydrolizy frakcji białkowej BSG monitorowano poprzez pomiar pH, koncentracji grup α -aminowych w podłożu pohodowlanym oraz z wykorzystaniem chromatografii wykluczenia. W pierwszej dobie obserwowano nieznaczny spadek pH, wskazujący na utylizację cukrów (**P1**; Rys.2). Kolejno odnotowano wzrost pH charakterystyczny dla procesu proteolizy. Wyjątkiem od reguły była hodowla bakterii *E. coli* PCM 2560, *B. polymyxa* ATCC 842, *M. luteus* ATCC 4698, dla których pH utrzymywało

się na stałym poziomie oraz *L. rhamnosus* PCM 489, gdzie odnotowano spadek do wartości 3,5 charakterystyczny dla wzrostu bakterii kwasu mlekowego.

Zaobserwowano wzrost koncentracji grup α -aminowych w podłożu pohodowlanym *B. cereus* PCM 2849, *B. subtilis* PCM 2850, *B. lentus* PCM 450, *K. rhizophila* PCM 2931, *B. licheniformis* PCM 1847, jak również *B. polymyxa* ATCC 842 (**P1**; Rys. 3). Wyliczony DH% frakcji białkowej dla wskazanych hodowli bakterii mieścił się w zakresie 32-43% (**P1**; Rys.4). Najlepsze rezultaty uzyskano dla hodowli *B. cereus* PCM 2849 (2583,3 $\mu\text{g/mL}$) i *B. lentus* PCM 450 (2508,3 $\mu\text{g/mL}$). Porównanie uzyskanych wyników, do tych pozyskanych przez innych badaczy, wykazało przewagę hydrolizy prowadzonej w hodowlach drobnoustrojów nad zastosowaniem handlowych preparatów enzymatycznych [87,88]. Proces prowadzony za pomocą handlowych enzymów proteolitycznych jest ograniczony ze względu na postępującą inaktywację enzymów. W warunkach hodowlanych, do czasu wyczerpania składników odżywczych w pożywce, sekrecja enzymów proteolitycznych może przebiegać w sposób ciągły, co determinuje większą wydajność proteolizy frakcji białkowej. Ponadto hydroliza w hodowlach mikroorganizmów umożliwia jednoczesne działanie kilku enzymów proteolitycznych, często różnych pod względem mechanizmu katalizy, co przekłada się na wyższą efektywność procesu.

Skutkiem hydrolizy znaczna ilość białka zaangażowanego w utrzymanie struktury BSG uległa solubilizacji do podłoża hodowlanego, co wraz z postępowaniem procesu przejawiało się wzrostem pola powierzchni pików na chromatogramach (**P1**; Rys.5). Równocześnie obserwowano hydrolizę dużych białek do peptydów o mniejszych masach cząsteczkowych. Odnotowano zmniejszanie powierzchni pików odpowiadających wielkocząsteczkowym białkom (piki wyływające w pierwszej fazie rozdzielania chromatograficznego) na rzecz peptydów o mniejszej masie cząsteczkowej (piki wyływające z kolumny jako ostatnie). Za pomocą chromatografii wykluczenia potwierdzono ponadto brak postępu hydrolizy w hodowlach *M. luteus* ATCC 4698, *L. rhamnosus* PCM 489 and *E. coli* PCM 2560 (**P1**; Rys.5G-I). Przeprowadzona analiza wykazała, że zastosowanie chromatografii wykluczenia umożliwia śledzenie postępu proteolizy frakcji białkowej BSG. Liczne piki obserwowane na chromatografach, określonych przy różnych czasach retencji, potwierdzają niejednorodność składu frakcji peptydowej hydrolizatów, co jest niezwykle ważne w kontekście poszukiwania związków bioaktywnych.

Analiza podłoży pochodowlanych techniką zymografii żelatynowej wykazała, że frakcja białkowa BSG pełni rolę induktora syntezy enzymów proteolitycznych w hodowlach bakterii (P1; Rys. 6). Co więcej udowodniono, że w każdej prowadzonej hodowli proteoliza frakcji białkowej BSG przebiega przy jednoczesnym udziale kilku enzymów. Spektra produkowanych enzymów różniły się znacząco wśród testowanych bakterii. Przykładowo w hodowli *B. subtilis* PCM 2850 odnotowano sekrecję enzymów o masie molekularnej 30 kDa i 40 kDa, jak również enzymów wspólnych dla hodowli *B. cereus* PCM 2849 o masie 55 kDa, 70 kDa i 100 kDa. Z kolei w hodowli *B. licheniformis* PCM 1847 odnotowano dwa enzymy o masie 21 kDa i 23 kDa zaangażowane w proteolizę białka BSG.

W prowadzonych badaniach udowodniono, że wyższe stężenie peptydów w płynie pochodowlanym można pozyskać poprzez jednoczesne działanie wielu proteaz. Medium pochodowlane *B. polymyxa* ATCC 842, charakteryzujące się największą liczbą aktywnych proteaz, jednocześnie odznaczało się najwyższą koncentracją peptydów (4,30 mg/mL) (P1;Tab. 1).

Pozyskane w badaniach hydrolizaty charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwutleniająca (P1; Rys 7). Najlepsze rezultaty otrzymano przy wykorzystaniu metody ABTS. Najwyższą aktywność odnotowano dla płynu po hodowli *B. cereus* PCM 2849 (1621,31 μM TEAC/g peptydów). Jednocześnie aktywność antyoksydacyjna próby kontrolnej była na poziomie 634,29 μM TEAC/g peptydów, co tłumaczy się częściową hydrolizą białka BSG w trakcie procesu sterylizacji. Co warto zaznaczyć aktywność pozyskanych hydrolizatów była znacząco lepsza od rezultatów otrzymanych dla hydrolizatów glutenu pszenicy (240 μM /g) [89]. Płyn pozyskany po hodowli *B. subtilis* PCM 2850 (188,89 μM TEAC/g peptydów) odznaczał się najwyższą aktywnością w odniesieniu do metody DPPH, a właściwości przeciwutleniające pozostałych prób nie osiągnęły poziomu kontroli (167,10 μM TEAC/g peptydów). Prawdopodobnie powstałe w podłożu skutkiem hydrolizy termicznej peptydy (na etapie procesu sterylizacji podłoża hodowlanego), aktywne względem wolnego rodnika DPPH^{*}, były utylizowane w hodowlach bakterii celem wzrostu biomasy. Odmienność rezultatów uzyskanych metodą DPPH i ABTS należy tłumaczyć istnieniem kilku ważnych różnic w odpowiedzi rodników na przeciwutleniacze. W tych badaniach ABTS rozpuszczano w wodzie, dzięki czemu w reakcję z wolnym rodnikiem zaangażowane były przeciwutleniacze hydrofilowe. Z kolei wolny rodnik DPPH rozpuszczono w etanolu, zgodnie z jego naturą chemiczną. Interakcja peptydów z roztworem etanolem

rodnika DPPH mogła przyczynić się do ich częściowej denaturacji, a w konsekwencji utraty aktywności biologicznej, co stanowi poważne ograniczenie przy interpretacji wyników aktywności hydrofilowych przeciwutleniaczy. Pomimo istotnych różnic pomiędzy metodami bazującymi na reakcji przeciwutleniacza z wolnym rodnikiem (ABTS, DPPH), a techniką FRAP, której istotą jest redukcja formy utlenionej żelaza Fe^{3+} do Fe^{2+} , wyniki otrzymane z wykorzystaniem techniki FRAP nie różniły się znacząco od tych pozyskanych z zastosowaniem wolnego rodnika DPPH*. Najwyższą aktywności wykryto w hydrolizatach po hodowli *B. cereus* PCM 2849 (284,08 μ M TEAC/g peptydów) oraz *B. subtilis* PCM 2850 (248,81 μ M TEAC/ g peptydów). Co istotne podobne wartości aktywności antyoksydacyjnej hydrolizatów białka BSG, wytworzonych z zastosowaniem handlowych preparatów enzymatycznych, otrzymano w pracy Vieira i wsp. (2017) [90] oraz Connolly i wsp. (2019) [91].

4.2. Publikacja 2 (P2): Ciarco D., Neuvéglise C., Szwechłowicz M., Lazar Z., Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of Yarrowia Clade Species and Their Putative Applications. International Journal of Molecular Sciences: 24 (7), 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>

Publikacja ta, jest drugą z cyklu badań nad produkcją biologicznie aktywnych związków z wykorzystaniem surowców odpadowych. W pracy po raz kolejny opisano produkcję hydrolizatów frakcji białkowej BSG. Proteolizę raz jeszcze prowadzono w hodowlach mikroorganizmów, tym razem z wykorzystaniem drożdży kladu *Yarrowia* posiadających status GRAS (ang. *generally recognized as safe*). Mając na uwadze niewielki stan wiedzy na temat enzymów proteolitycznych drożdży kladu *Yarrowia* wiele uwagi poświęcono ich szczegółowej analizie. Sporządzono drzewo filogenetyczne alkalicznych proteaz kladu *Yarrowia*, jak również przeprowadzono analizę ich syntenii. W pracy zaprezentowano wyniki badań nad ekspresją proteaz alkalicznych *Y. lipolytica* w różnych podłożach hodowlanych, jak również w podłożu BSG. Wykonano analizę aktywności proteolitycznej, szczegółowo opisano przebieg hydrolizy białka BSG oraz scharakteryzowano profil enzymów proteolitycznych każdego z testowanych szczepów drożdży. Finalnie przedstawiono wyniki analizy aktywności przeciwutleniającej pozyskanych hydrolizatów.

Analiza genomów kladu *Yarrowia* wykazała obecność od 5 do 21 sekwencji kodujących proteazy alkaliczne odpowiednio dla *Y. phangngaensis* i *Y. galli* (P2; Tab. 1). Na podstawie homologii sekwencji wyróżniono 13 grup domniemanych proteaz alkalicznych zaprezentowanych na drzewie filogenetycznym (P2; Rys. 1). Jedną z wyróżnionych była grupa *XPR2* stanowiąca zbiór enzymów homologicznych względem Aep kodowanej przez *YALIOF31889g*, która jest jednym z najlepiej przebadanych enzymów proteolitycznych *Y. lipolytica*. Dalsze badania wykazały brak homologów Aep u drożdży *Y. phangngaensis* i *C. hispaniensis*. Co więcej, odległości genetyczne pomiędzy większością genów zebranych w ramach grupy *XPR2* były niewielkie, na co wskazują krótkie gałęzie drzewa. Jednak niektóre białka zgromadzone w tej grupie powstały na skutek sukcesywnych duplikacji (*Y. osloensis*, *Y. porcina*, *Y. galli*, *Y. yakushimensis*), na co wskazują długie gałęzie drzewa filogenetycznego. Analiza syntenii tych białek wykazała różne miejsca insercji genów co sugeruje, że duplikacje w ich obrębie zachodziły niezależnie od siebie (P2; Rys. S1). Wyjątkiem od reguły było zachowanie syntenii w górnym regionie genów *YAOSOS01e24608g* i *YAPOOS01e09780g*, dlatego przypuszcza się że obecny układ prawdopodobnie powstał w wyniku tej samej duplikacji. Co istotne zaobserwowano zachowanie syntenii wśród bliskich homologów *XPR2* (część grupy *XPR2* z krótkimi rozgałęzieniami) (P2; Rys. 2). Niemniej jednak odnotowano przegrupowanie powyżej (w górę od *YALIOF31867g*) oraz poniżej (w dół od *YALIOF31911g*) w obrębie homologu *XPR2* dla *Y. bubula*. Z uwagi na fakt iż *Y. bubula*, *Y. hollandica* i *Y. alimentaria* są uważane za bazowe szczepy rodzaju *Yarrowia*, dla których syntenia jest zakonserwowana, aktualna kolejność genów obserwowana dla *Y. lipolytica* i pozostałych gatunków kladu prawdopodobnie powstała na skutek tego samego przegrupowania.

Aby zweryfikować, które z 16 domniemanych proteaz mogą odgrywać istotną rolę w hydrolizie białka, wykorzystano wcześniej opublikowane dane RNA-seq *Y. lipolytica* W29 oraz niepublikowane dane wykonane dla pochodnej E150 (CLIB 122) (genotyp: E150, ku70::URA3, LEU2) Analiza *in silico* wykazała, że 12 genów *Y. lipolytica* potencjalnie kodujących proteazy nie ulega lub ulega minimalnej ekspresji w podłożach minimalnych (YNB) wzbogaconych odpowiednio w glukozę (GLU), kwas oleinowy (ang. *oleic acid*) (OA) i trójmaślan glicerolu (ang. *tributyryn*) (TB) (P2; Tab. 2). Co istotne, gen *XPR2* był silnie ekspresjonowany w podłożu YNB wzbogaconym glukozą (YNB + GLU), a słabo w podłożu minimalnym suplementowanym w kwas oleinowy (YNB+OA) oraz trójmaślan

glicerolu (YNB+TB). Odnotowano umiarkowaną ekspresję *YALIOA06435g* i *YALIOA08360g* na trzech testowanych źródłach węgla (GLU, OA, TB). W badaniach analizowano również poziom ekspresji genów w różnych wartościach pH. W nawiązaniu do badań Śnieżewski i wsp. (2012) [92] ekspresja *XPR2* jest indukowana dostępnością peptonu lub pH>6. Otrzymane wyniki zaprezentowane w manuskrypcie częściowo potwierdzają to stwierdzenie. W ramach przeprowadzonych badań wykazano umiarkowaną ekspresję *XPR2* w podłożu YPD oraz niską w YPD o pH 4. Najsilniej ekspresjonowany był gen *YALIOB16500g*, zarówno na podłożu YPD, jak i YPD o pH 4. Analiza sekwencji sygnałowych wykazała, że wszystkie analizowane enzymy mogą być potencjalnie wydzielane na zewnątrz komórki. Co więcej ocenę ekspresji genów domniemanych proteaz *Y. lipolytica* W29 prowadzono także w podłożu BSG. Wykazano, że siedem z nich podlega ekspresji, a najwyższy poziom obserwowano kolejno dla *XPR2* i *YALIOB16500* (**P2**; Rys. 3).

Wstępna analiza aktywności proteolitycznej, prowadzona na agarze wzbogaconym w mleko odtłuszczone, wykazała ogromne zróżnicowanie drożdży kladu *Yarrowia* pod względem zdolności do sekrecji enzymów proteolitycznych w tych warunkach (**P2**; Tab. 3). Odnotowano brak aktywności proteolitycznej *Y. phangngaensis*, *Y. deformans* i *C. hispaniensis*. Największe strefy proteolizy obserwowano wokół kolonii *Y. yakushimensis* (15,05 mm), *Y. lipolytica* (14,80mm), *Y. keelungensis* (14,02 mm), i *Y. alimentaria* (13,51 mm) (**P2**; Rys. 4). Tym samym analiza wstępna jednoznacznie potwierdziła zdolność niektórych gatunków *Yarrowia* do zewnątrzkomórkowej sekrecji aktywnych proteaz. Analogicznie, badania prowadzone w podłożu BSG potwierdziły brak aktywności proteolitycznej *Y. phangngaensis*, *Y. deformans* i *C. hispaniensis*. Najwyższą aktywność odnotowano w płynie pohodowlanym *Y. lipolytica* W29 (2,47 U). Satysfakcjonujące rezultaty uzyskano również dla *Y. galli* (1,96 U), *Y. alimentaria* (1,38 U), *Y. keelungensis* (1,07 U) i *Y. parophonii* (0,80 U). Reasumując, przedstawione wyniki badań stawiają drożdże kladu *Yarrowia* w roli perspektywicznych producentów enzymów proteolitycznych. Ponadto, porównanie naszych rezultatów z wynikami Braga i wsp. (2012) [93] pokazuje, że BSG jest doskonałym substratem do syntezy proteaz.

Wysoka aktywność enzymów proteolitycznych, sekrecjonowanych przez większość gatunków kladu *Yarrowia*, przyczyniła się do efektywnej hydrolizy frakcji białkowej BSG. Najwyższe stężenie grup α -aminowych oznaczono w medium po hodowli *Y. lipolytica* (4367 $\mu\text{g/mL}$), *Y. galli* (4245 $\mu\text{g/mL}$), *Y. alimentaria* (3939 $\mu\text{g/mL}$), i *Y. keelungensis*

(3885 µg/mL) scharakteryzowanych uprzednio jako wiodące szczepy proteolityczne. DH% frakcji białkowej BSG w hodowli sześciu z piętnastu testowanych szczepów przekroczył wartość 50%, a najlepszy rezultat otrzymano w hodowli *Y. lipolytica*, gdzie aż 72,78% frakcji białkowej uległo hydrolizie. Otrzymane rezultaty jednocześnie były niemal dwukrotnie wyższe, od wyników uzyskanych w hodowlach bakterii proteolitycznych (**P1**). Były też konkurencyjne względem badań prowadzonych przy udziale *Rhizopus* sp., w których 59,0% frakcji białkowej BSG uległo hydrolizie [94]. Mając na względzie, że grzyby strzępkowe są znane jako znakomici producenci enzymów hydrolitycznych, tym bardziej należy podkreślić istotność uzyskanych wyników.

Procesem towarzyszącym hydrolizie frakcji białkowej BSG w hodowlach kładu *Yarrowia* była stopniowa alkalizacja podłoża do pH 8,5-9 (**P2**; Rys. 8). Jedynie w hodowlach *Y. phangngaensis*, *Y. deformans*, and *C. hispaniensis*, gdzie uprzednio zaobserwowano brak aktywności proteolitycznej, a co za tym idzie hydrolizy, alkalizacja nie była tak znacząca (pH < 8).

Wykorzystana w badaniach technika zymografii żelatynowej umożliwiła obserwację szerokiego spektrum enzymów proteolitycznych produkowanych w hodowlach drożdży kładu *Yarrowia* (**P2**; Rys. S2). Co ważne, niektóre obserwowane na żelu strefy proteolizy reprezentowały kompleksy enzymatyczne, przypuszczalnie powstałe na skutek interakcji pomiędzy kilkoma podjednostkami enzymów, na co wskazuje analiza profilu enzymów produkowanych w hodowli *Y. lipolytica* (**P2**; Tab. 4). W odniesieniu do wyników zymografii, w podłożu BSG hydroliza frakcji białkowej przebiegała przy udziale dwóch proteaz o masie cząsteczkowej 110 kDa i 130 kDa. Jak wykazała analiza sekwencji potencjalnie kodujących enzymy proteolityczne, masa cząsteczkowa proteaz *Y. lipolytica* mieści się w zakresie 40-90 kDa, w związku z tym produkcja enzymów o masie molekularnej znacznie przekraczającej 90 kDa nie jest możliwa. Niemniej jednak, na podstawie uzyskanych wyników, możliwe było wytypowanie enzymów/kompleksów enzymatycznych, których rola w proteolizie białka BSG w hodowlach kładu *Yarrowia* była kluczowa. Uważa się, że istotne znaczenie w proteolizie frakcji białkowej BGS odgrywał kompleks enzymatyczny o masie molekularnej 110 kDa, sekrecjonowany w hodowli drożdży *Y. lipolytica* i *Y. alimentaria*. Ponadto, znaczącą rolę przypisuje się proteazie o masie molekularnej 37-39 kDa produkowanej w hodowli *Y. galli* i *Y. parophonii*. Dodatkowo, proteaza o masie

cząsteczkowej 30 kDa, wydzielana przez *Y. keelungensis* w znaczący sposób wpływała na hydrolizę frakcji białkowej BSG.

Wyniki przeprowadzonej kolejno analizy proteomicznej potwierdziły ścisłe pokrewieństwo drożdży kladu *Yarrowia* (**P2**; Tab. S1). Pomimo, że analiza została wykonana z wykorzystaniem bazy danych Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (ang. *The National Center for Biotechnology Information*, NCBI), w której proteomy kladu *Yarrowia* nie są dostępne, a sekwencje oraz widma fragmentacji badanych enzymów były porównywane do danych zgromadzonych dla królestwa grzybów, najwyższy stopień homologii wykazano względem rodzaju *Yarrowia*. Analiza proteomiczna enzymów/kompleksów enzymatycznych *Y. lipolytica*, *Y. keelungensis* i *Y. alimentaria* wykazała wysoką homologię względem Aep *Y. lipolytica* E150 (CLIB122). Sekwencja aminokwasowa kompleksów enzymatycznych *Y. lipolytica* o masie 130 kDa i 110 kDa była odpowiednio w 40% i 44% homologiczna względem Aep. Stopień pokrycia sekwencji kompleksu enzymatycznego *Y. alimentaria* o masie 130 kDa (42%) względem Aep był nawet wyższy niż w przypadku *Y. lipolytica*. Wreszcie istotną homologię względem Aep na poziomie 35% wykazano również dla proteazy *Y. keelungensis*, o masie cząsteczkowej 30 kDa. Co warto podkreślić, sekwencje enzymów/kompleksów enzymatycznych były homologiczne względem Aep w pozycji 158-454 łańcucha peptydowego, która odpowiada aktywnej formie proteazy powstającej na skutek usunięcia sekwencji sygnałowej.

Hydrolizaty białka BSG otrzymane po hodowli kladu *Yarrowia* charakteryzowały się znaczącą aktywnością przeciwutleniającą. Najlepsze rezultaty otrzymano metodą ABTS. Najlepszy wynik odnotowano podczas analizy płynu po hodowli *Y. divulgata* (2606,13 μM TEAC/g). Istotną aktywność antyoksydacyjną, w porównaniu do kontroli (603,73 μM TEAC/g) prezentowały również płyny pohodowlane *Y. galli* (1771,87 μM TEAC/g), *Y. keelungensis* (1730,73 μM TEAC/g) i *Y. lipolytica* (1722,63 μM TEAC/g). Rezultaty otrzymane dla hodowli kladu *Yarrowia* były znacznie wyższe od wyników uzyskanych z wykorzystaniem bakterii (**P1**). Wysoka aktywność antyoksydacyjna w hodowlach *Y. galli*, *Y. keelungensis* oraz *Y. lipolytica* była rezultatem efektywnej hydrolizy białka (DH% > 60%), zaś aktywność płynów pohodowlanych *Y. divulgata*, przez wzgląd na niski DH% (<30%), prawdopodobnie wynikała z produkcji erytrytolu, który jest uważany za silny antyoksydant [95]. Należy wziąć pod uwagę, że w badaniach, w których hydrolizę frakcji białkowej prowadzi się bezpośrednio w kulturach drobnoustrojów, na aktywność

przeciwutleniającą hydrolizatów mogą wpływać produkty metabolizmu mikroorganizmów. Ponadto, BSG jest surowcem zawierającym oprócz białka także celulozę, węglowodany, ligninę oraz lipidy, dlatego w wyniku hydrolizy inne związki jak na przykład fenole, mogą ulec solubilizacji do podłoża hodowlanego i w konsekwencji wpływać na aktywność przeciwutleniającą hydrolizatów. Dwie pozostałe metody wykorzystane w badaniach nie wykazały istotnej aktywności przeciwutleniającej hydrolizatów frakcji białkowej BSG. Aktywność antyoksydacyjna płynów pochodzących z kładu *Yarrowia*, determinowana metodą DPPH, nie osiągnęła wartości próby kontrolnej (147,80 $\mu\text{M TEAC/g}$). Również wyniki uzyskane metodą FRAP nie różniły się znacząco od rezultatu uzyskanego dla kontroli (181,46 $\mu\text{M TEAC/g}$). Najwyższą aktywność metodą FRAP odnotowano dla płynu po hodowli *Y. divulgata* (233,13 $\mu\text{M TEAC/g}$).

- 4.3. Publikacja 3 (P3): Ciuirko D., Czyżnikowska Ż., Kancelista A., Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. International Journal of Molecular Sciences: 23 (18), 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>**

Trzecia publikacja z cyklu opisuje produkcję oraz analizę właściwości biologicznych surfaktyny, jednego z najbardziej aktywnych biosurfaktantów lipopeptydowych. Produkcję surfaktyny prowadzono w hodowli *B. subtilis* #309, w podłożach zawierających makuchy słonecznikowy lub rzepakowy jako jedyne źródło węgla i azotu.

W pierwszym etapie badań dokonano analizy składu makuchów. Na jej podstawie stwierdzono, że makuch słonecznikowy (93,8%) i rzepakowy (93,1%) charakteryzują się wysoką zawartością suchej masy (P3; Tab. 1). Co ważne, makuch słonecznikowy (21,4% s.m.) i rzepakowy (30,2% s.m.) różniły się znacząco pod kątem zawartości surowego białka. Również profil kwasów tłuszczowych był istotnie różny. Makuch słonecznikowy cechował się siedmiokrotnie wyższą zawartością kwasu linolowego (55,67%), podczas gdy makuch rzepakowy (77,84%) odznaczał się niemal dwukrotnie wyższym stężeniem kwasu oleinowego. Kwas palmitynowy stanowił trzecią najważniejszą frakcję kwasów tłuszczowych makuchów słonecznikowego (2,82%) i rzepakowego (2,44%).

Ze względu na wysoką koncentrację białka oraz obecność nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, makuchy są produktami ubocznymi o dużym potencjale aplikacyjnym

do produkcji biosurfaktantów. W nawiązaniu do teorii hydrofilowych i hydrofobowych induktorów produkcji biosurfaktantów [96], obecne w makuchach kwasy tłuszczowe wspomagają biosyntezę ugrupowań lipidowych mikrobiologicznych surfaktantów. Znaczna różnorodność profilu kwasów tłuszczowych makuchów słonecznikowego i rzepakowego umożliwiła analizę wpływu substratu na produkcję homologów surfaktyny.

Ze względu na kluczową rolę enzymów hydrolitycznych w procesie biokonwersji substratu, wykonano wstępną analizę aktywności proteolitycznej i lipolitycznej bakterii *B. subtilis* #309. Zarówno na podłożu wzbogaconym w odtłuszczone mleko jak i trójmaślan glicerolu wokół kolonii bakterii obserwowano strefę przejaśnienia, potwierdzającą zdolność *B. subtilis* #309 do syntezy aktywnych proteaz i lipaz (**P3**; Rys. 2a, 2b).

W kolejnym etapie badań prowadzono hodowlę *B. subtilis* #309 w podłożu suplementowanym odpowiednio w makuch słonecznikowy lub rzepakowy celem syntezy surfaktyny. Produkcję monitorowano poprzez pomiar ST oraz E_{24} podłoży pohodowlanych. Analizowano kinetykę produkcji surfaktyny z wykorzystaniem techniki chromatograficznej (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Odnotowano podobny przebieg procesu syntezy tego lipopeptydu w obu podłożach hodowlanych. Obserwowano znaczący spadek ST od początkowej wartości 46,5 mN/m oraz 48,2 mN/m do minimalnej wartości 30,1 mN/m oraz 29,7 mN/m odpowiednio w podłożu wzbogaconym w makuch słonecznikowy i rzepakowy (**P3**; Rys. 1). Jednocześnie zaobserwowano wzrost E_{24} odpowiednio do wartości maksymalnej 66,1% i 67,1% (**P3**; Rys. 1). Wzrost koncentracji surfaktyny miał charakter logarytmiczny. Zarówno w podłożu wzbogaconym w makuch słonecznikowy (1,19 g/L) jak i rzepakowy (1,45 ± 0,09 g/L) maksymalne stężenie biosurfaktantu odnotowano w 120 godzinie wzrostu bakterii (**P3**; Rys. 1). Procesowi biosyntezy towarzyszyła nieznaczna alkalizacja podłoży hodowlanych. Analiza porównawcza pozyskanych wyników z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów [97,98] wykazała, że makuchy, jako jedyne źródło składników budulcowych, zapewniają wysoką wydajność produkcji surfaktyny. Jednocześnie zachowano niski koszt produkcji, dzięki zastosowaniu surowców odpadowych przetwórstwa olejów roślinnych.

Aktywność enzymów proteolitycznych *B. subtilis* #309 była indukowana obecnością makuchów w podłożu hodowlanym, co wykazano techniką zymografii żelatynowej. Na 10% żelu poliakrylamidowym obserwowano szerokie spektrum produkowanych proteaz (**P3**; Rys. 2c). Zaangażowanie poszczególnych enzymów w hydrolizę zależało od stadium

postępu procesu. Udowodniono, że w procesie hydrolizy frakcji białkowej makuchów uczestniczy wiele proteaz, które zapewniają dostęp składników budulcowych do syntezy surfaktyny.

Ze względu na znaczącą aktywność powierzchniową i emulgującą surfaktyna wydaje się być doskonałym związkiem do zastosowań *ex situ* jako czynnik intensyfikujący wydobywanie ropy naftowej ze złóż oraz zanieczyszczonych gleb. Celem opracowania prostej i opłacalnej procedury o szerokich możliwościach aplikacyjnych, badano wpływ supernatantu po hodowli *B. subtilis* #309 na wydajność usuwania oleju z zanieczyszczonego piasku. Takie postępowanie umożliwiło pominięcie etapu oczyszczania surfaktyny, który jest czasochłonny, kosztowny i trudny do przeniesienia na skalę przemysłową. Skuteczność usuwania oleju zwiększała się stopniowo wraz ze wzrostem stężenia surfaktyny w płynie pohodowlanym (**P3**; Tab. 2). Maksymalny odnotowany odzysk oleju wynosił 31,6% i 37,1% odpowiednio dla hodowli prowadzonej na makuchach słonecznikowym i rzepakowym. Pomimo, że odnotowane przez innych badaczy rezultaty były znacząco lepsze [99,100], wykorzystanie tanich substratów, oraz pominięcie procesu oczyszczania biosurfaktantów z podłoża pohodowlanego, czyni zastosowaną procedurę konkurencyjną.

Kolejnym etapem badań była analiza profilu homologów surfaktyny w podłożu pohodowlanym. Homolog surfaktyny C15 był dominującą frakcją zarówno w podłożu wzbogaconym w makuch słonecznikowy (47%) jak i rzepakowy (53%) (**P3**; Rys. 3). Kolejnym, najczęściej syntezowanym związkiem był homolog C14, a jego koncentracja w obu testowanych podłożach pohodowlanych była na podobnym poziomie 31-32%. Odnotowano jednak znaczące różnice w koncentracji surfaktyny C13, której stężenie w podłożu wzbogaconym odpowiednio w makuch słonecznikowy i rzepakowy oznaczono na poziomie 16% i 10%. Odmienny poziom produkcji homologu C13 należy tłumaczyć przede wszystkim znacznymi różnicami w koncentracji kwasu oleinowego w obu wykorzystywanych substratach. Według Schmidt i wsp. (2022) [101] zarówno kwas oleinowy jak i palmitynowy istotnie wpływają na wytwarzanie homologów surfaktyny, jednak to kwas oleinowy powoduje ich największe zróżnicowanie. Jako kolejną przyczynę odmiennej koncentracji produkowanych homologów wskazuje się różnice w składzie aminokwasowym makuchów. Biodostępność Arg, Gln i Val stymuluje produkcję homologów, o parzystej liczbie atomów węgla (C14 i C16) w łańcuchu kwasów tłuszczowych, podczas gdy Cys, His, Ile, Leu, Met i Ser indukuje syntezę łańcuchów o nieparzystej liczbie atomów węgla (C13 i C15) [102].

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że zróżnicowanie składu substratu, w tym przypadku istotne różnice w kompozycji makuchów słonecznikowego i rzepakowego mają wpływ na ostateczny skład homologów surfaktyny.

Finalnym etapem badań było sprawdzenie aktywności przeciwutleniającej oraz inhibitorowej surfaktyny wobec ACE. Aktywność przeciwutleniającą analizowano z wykorzystaniem trzech metod: ABTS, DPPH, FRAP. Surfaktyna wytwarzana w hodowlach *B. subtilis* #309 charakteryzowała się śladową aktywnością antyoksydacyjną, co zaprzecza rezultatom pozyskanym przez innych badaczy [103]. Wyjaśnienia należy poszukiwać w strukturze jej cząsteczki. Przyjęto się, że surfaktyna w swej budowie zawiera łańcuch peptydowy o strukturze L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu. Istnieją jednak homologi, które różnią się pod względem sekwencji aminokwasowej czego przykładem jest surfaktyna zawierająca w pozycji czwartej Ala zamiast Val [104]. Jak podkreślają Tabbene i wsp. (2012) [105] aktywność przeciwutleniająca może być determinowana obecnością aminokwasów hydrofobowych (Val i Leu) oraz aminokwasów o charakterze kwasowym (Asp i Glu). W związku z tym, surfaktyna zawierająca Ala zamiast Val może prezentować zredukowaną aktywność. Ponadto, otwarcie pierścienia laktonowego poprzez hydrolizę lub metylację może istotnie wpływać na jej właściwości [104].

ACE jest kluczowym składnikiem układu renina-angiotensyna, a jej podstawową funkcją jest utrzymanie stabilnego ciśnienia krwi i równowagi elektrolitowej. Intensywnie poszukuje się inhibitorów zdolnych do regulacji aktywności ACE w odniesieniu do kontroli nadciśnienia tętniczego. Przeprowadzone badania wykazały wysoką aktywność inhibitorową surfaktyny wobec ACE. Wartość stężenie inhibitora, powodujące 50%-ową inhibicję ACE (ang. *half maximal inhibitory concentration*, IC_{50}) ustalono na poziomie 0,62 mg/mL, co jest zgodne z rezultatem Ghazalai wsp. (2017) [106], którzy testowali aktywność inhibitorową mieszaniny lipopeptydów, o dominującym udziale surfaktyny. Otrzymane wyniki potwierdziły właściwości terapeutyczne surfaktyny jako środka przeciwnadciśnieniowego. Dodatkowo, badania *in silico* potwierdziły, że homolog surfaktyny C15 może być inhibitorem ACE, przez wzgląd na właściwości hydrofobowego łańcucha, polarnej części peptydowej oraz zważywszy na obecność donora i akceptora wiązań wodorowych. Wykazano, że za stabilizację kompleksu odpowiedzialne są oddziaływania niekowalencyjne, głównie hydrofobowe, ale także wiązania wodorowe i oddziaływania van der Waalsa (z jonem Zn^{2+}) (**P3**; Tab. 4). W pracy zaprezentowano sposób wiązania surfaktyny do domeny C i N ACE (**P3**; Rys. 4)

5. Podsumowanie

W ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej zaproponowano metodę mikrobiologicznej konwersji produktów ubocznych przetwórstwa piwa i oleju w związki biologicznie aktywne, która potencjalnie umożliwi ograniczenie strat w sektorze rolno-spożywczym.

Wykazano, że BSG jest perspektywnym induktorem syntezy enzymów proteolitycznych zarówno w hodowlach bakterii jak i drożdży kladu *Yarrowia*. Aktywność enzymów proteolitycznych w podłożu BSG wpływała na efektywną hydrolizę frakcji białkowej tego surowca. Co więcej, otrzymane hydrolizaty cechowała znacząca aktywność przeciwutleniająca. Przez wzgląd na właściwości antyoksydacyjne, produkty hydrolizy frakcji białkowej BSG mogą być stosowane w różnych sektorach przemysłu. Peptydy o właściwościach przeciwutleniających są coraz częściej stosowane w produkcji nutraceutyków, funkcjonalnych składników żywności oraz farmaceutyków. Jako starzejące się społeczeństwo poszukujemy składników o zwiększonej sile działania. Peptydy umożliwiające spłycenie zmarszczek, wygładzenie tekstury skóry oraz zmniejszenie zaczerwienienia i przebarwień są intensywnie wyczekiwane przez specjalistów pielęgnacji skóry. Niestabilna i reaktywna natura wolnych rodników może przyczyniać się do uszkodzenia komórek, prowadząc do nadciśnienia, chorób sercowo-naczyniowych, nowotworów, cukrzycy oraz chorób neurodegeneracyjnych i zapalnych. Peptydy zdolne do neutralizacji wolnych rodników chronią organizm, hamując reakcje peroksydacji lipidów, a co za tym idzie zapobiegając uszkodzeniom oksydacyjnym. Inną możliwością aplikacyjną produktów hydrolizy frakcji białkowej BSG jest szeroko rozumiana branża spożywcza, w której poszukuje się sposobów zabezpieczania produktów żywnościowych przed utlenianiem lipidów, prowadzącym do powstawania niepożądanych posmaków, zapachów i potencjalnie toksycznych związków.

Badania wykonane w ramach niniejszej pracy, wyznaczyły kierunek racjonalnego zagospodarowania makuchów roślin oleistych. Udowodniono potencjał *B. subtilis* #309 do produkcji enzymów hydrolitycznych, jak również aktywnej utylizacji makuchów słonecznikowego i rzepakowego. Przez wzgląd na skład chemiczny makuchów, między

innymi wysoką zawartość białka i kwasów tłuszczowych, uzyskano istotną wydajność produkcji surfaktyny. Zaprezentowano szerokie możliwości aplikacyjne surfaktyny *B. subtilis* #309. W zależności od potrzeby, surfaktynę można syntetyzować w celu redukcji ST. Surfaktyna może pełnić rolę emulgatora, szeroko stosowanego w przemyśle kosmetycznym do stabilizowania złożonych, nietrwałych struktur kosmetyków, czy też w przemyśle spożywczym w celu zapewnienia jedwabistej, gęstej konsystencji produktu. Do produkcji surfaktyny na szeroką skalę może przyczynić się opracowana na potrzeby niniejszej pracy technologia. Jej największą zaletą jest niski koszt, wynikający przede wszystkim z zastosowania makuchów w roli substratu. To z kolei umożliwia wykorzystanie surfaktyny, w procesach wielkoobszarowej bioremediacji, na przykład w celu usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych ze skażonego środowiska. Finalnie wykazano, że surfaktyna może działać jako skuteczny inhibitor ACE. Przedstawione w ramach rozprawy doktorskiej wyniki mogą być podstawą do dalszych badań dążących do komercjalizacji surfaktyny w roli bezpiecznego, skutecznego i przyjaznego dla środowiska leku hipotensyjnego.

6. Wnioski

1. Młóto browarniane (ang. *brewer's spent Grain*, BSG) jest perspektywicznym substratem do produkcji bioaktywnych peptydów w hodowlach mikroorganizmów proteolitycznych.
2. Badania wykazały przewagę proteolizy w warunkach hodowli bakterii i drożdży nad zastosowaniem handlowych preparatów enzymatycznych. Proteoliza BSG w hodowlach mikroorganizmów umożliwia wykorzystanie całej puli produkowanych enzymów co zwiększa wydajność oraz pozwala zredukować koszty procesu.
3. Udowodniono wspólne pochodzenie enzymów proteolitycznych drożdży kładu *Yarrowia*, na co wskazuje wykonana analiza bioinformatyczna i proteomiczna. Uzyskane wyniki przedstawiają wysoką homologię proteaz kładu *Yarrowia* względem *Aep Y. lipolytica* E150 (CLIB122).
4. Frakcja białkowa BSG indukuje syntezę enzymów proteolitycznych w hodowlach testowanych bakterii proteolitycznych i drożdży kładu *Yarrowia*, co skutkuje produkcją szerokiego spektrum zewnątrzkomórkowych proteaz do medium pohodowlanego.
5. Akumulacja proteaz w środowisku hodowli bakterii i drożdży umożliwia efektywną proteolizę BSG. Drożdże kładu *Yarrowia* zapewniają większą wydajność procesu, w porównaniu do testowanych bakterii, o czym świadczy niemal dwukrotnie wyższy DH% w hodowlach drożdży kładu *Yarrowia*.
6. Proteoliza BSG w hodowlach bakterii i drożdży kładu *Yarrowia* umożliwia pozyskanie hydrolizatów o wysokiej aktywności przeciwutleniającej. Wyższa aktywność antyoksydacyjna płynów pohodowlanych kładu *Yarrowia*, w porównaniu do bakterii proteolitycznych, wynika z bardziej efektywnej hydrolizy.

7. Pozyskane hydrolizaty białka BSG przez wzgląd na istotną aktywność antyoksydacyjną oraz niski koszt produkcji mogą w perspektywie przyszłości być wytwarzane na skalę przemysłową.
8. Ze względu na wysoką koncentrację białka oraz tłuszczu, makuchy rzepakowe i słonecznikowe są doskonałymi substratami do produkcji lipopeptydowych biosurfaktantów. Frakcja białkowa makuchów pełni rolę induktora syntezy enzymów proteolitycznych, a obecność kwasów tłuszczowych indukuje syntezę lipaz, co skutkuje wysoką produktywnością surfaktyny w hodowlach *B. subtilis* #309.
9. Kompozycja kwasów tłuszczowych makuchów oraz dostępność poszczególnych aminokwasów wpływa na profil produkowanych homologów surfaktyny. Przez wzgląd na różnice w składzie makuchów słonecznikowego i rzepakowego, obserwowano odmienny profil homologów surfaktyny w podłożach pochodzących z *B. subtilis* #309.
10. Surfaktyna *B. subtilis* #309 jest skutecznym inhibitorem ACE, pomimo śladowej aktywności przeciwutleniającej. Dokowanie molekularne surfaktyny do domeny C i N ACE potwierdziło możliwość interakcji inhibitora z enzymem.
11. Zastosowanie surfaktyny *B. subtilis* #309 jako leku hipotensyjnego jest możliwe, jednak wymaga dalszych badań. Konieczne jest potwierdzenie bezpieczeństwa i skuteczności użycia surfaktyny w testach farmakologicznych.

7. Literatura

- [1] M. Egan, The Water Footprint Assessment Manual. Setting the Global Standard, Soc. Environ. Account. J. 31 (2011). <https://doi.org/10.1080/0969160x.2011.593864>.
- [2] C. Tostivint, K. Östergren, T. Quested, H. Soethoudt, Å. Stenmarck, E. Svanes, C. O'Connor, Food waste quantification manual to monitor food waste amounts and progression, Fusions. (2016).
- [3] J. Jungowska, B. Kulczyński, A. Sidor, A. Gramza-Michałowska, Assessment of factors affecting the amount of food waste in households run by polish women aware of well-being, Sustain. 13 (2021) 976. <https://doi.org/10.3390/su13020976>.
- [4] A. Pandey, FOOD WASTAGE: CAUSES, IMPACTS AND SOLUTIONS, Sci. Herit. J. 5 (2021) 17–20. <https://doi.org/10.26480/gws.01.2021.17.20>.
- [5] European Parliament Council, A Community strategy for waste management, SEC/89/934 (1989).
- [6] D.A. Teigiserova, L. Hamelin, M. Thomsen, Towards transparent valorization of food surplus, waste and loss: Clarifying definitions, food waste hierarchy, and role in the circular economy, Sci. Total Environ. 706 (2020) 136033. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136033>.
- [7] S. Saba, G. Zara, A. Bianco, M. Garau, M. Bononi, M. Deroma, A. Pais, M. Budroni, Comparative analysis of vermicompost quality produced from brewers' spent grain and cow manure by the red earthworm *Eisenia fetida*, Bioresour. Technol. 293 (2019) 122019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122019>.
- [8] Y.J. Kok, L. Ye, J. Muller, D.S.W. Ow, X. Bi, Brewing with malted barley or raw barley: what makes the difference in the processes?, Appl. Microbiol. Biotechnol. 103 (2019) 1059–1067. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9537-9>.

- [9] M. Gupta, N. Abu-Ghannam, E. Gallagher, Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9 (2010) 318–328. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x>.
- [10] A. Faltermaier, D. Waters, T. Becker, E. Arendt, M. Gastl, Common wheat (*Triticum aestivum* L.) and its use as a brewing cereal - a review, *J. Inst. Brew.* 120 (2014) 1–15. <https://doi.org/10.1002/jib.107>.
- [11] S.I. Mussatto, G. Dragone, I.C. Roberto, Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications, *J. Cereal Sci.* (2006) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>.
- [12] A. Jaeger, E. Zannini, A.W. Sahin, E.K. Arendt, Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein, *Foods.* 10 (2021) 1389. <https://doi.org/10.3390/foods10061389>.
- [13] S.I. Mussatto, Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications, *J. Sci. Food Agric.* 94 (2014) 1264–1275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>.
- [14] C. Allegretti, E. Bellinetto, P. D'arrigo, G. Griffini, S. Marzorati, L.A.M. Rossato, E. Ruffini, L. Schiavi, S. Serra, A. Strini, D. Tessaro, S. Turri, Towards a Complete Exploitation of Brewers' Spent Grain from a Circular Economy Perspective, *Fermentation.* 8 (2022) 151. <https://doi.org/10.3390/fermentation8040151>.
- [15] M.V. Fărcas Anca, Tofană Maria, Socaci Sonia, Mudura Elena, Scrob Stăncuța, Salanță Liana, Brewers' spent grain—A new potential ingredient for functional foods, *J. Agroaliment. Process. Technol.* 20 (2014) 137–141.
- [16] T. Bonifácio-Lopes, J.A. Teixeira, M. Pintado, Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain—A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60 (2020) 2730–2741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655632>.
- [17] S. Ikram, L.Y. Huang, H. Zhang, J. Wang, M. Yin, Composition and Nutrient Value Proposition of Brewers Spent Grain, *J. Food Sci.* 82 (2017) 2232–2242. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13794>.

- [18] G. Terefe, Preservation techniques and their effect on nutritional values and microbial population of brewer's spent grain: a review, *CABI Agric. Biosci.* 3 (2022) 1–8. <https://doi.org/10.1186/s43170-022-00120-8>.
- [19] L.E.N. Castro, L.M.S. Colpini, All-around characterization of brewers' spent grain, *Eur. Food Res. Technol.* 247 (2021) 3013–3021. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03860-5>.
- [20] F. Nocente, F. Taddei, E. Galassi, L. Gazza, Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher nutritional potential, *LWT.* 114 (2019) 108421. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108421>.
- [21] P. Puligundla, C. Mok, Recent advances in biotechnological valorization of brewers' spent grain, *Food Sci. Biotechnol.* 30 (2021) 341–353. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00900-4>.
- [22] C.B. Faulds, S. Collins, J.A. Robertson, J. Treimo, V.G.H. Eijnsink, S.W.A. Hinz, H.A. Schols, J. Buchert, K.W. Waldron, Protease-induced solubilisation of carbohydrates from brewers' spent grain, *J. Cereal Sci.* 50 (2009) 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.01.004>.
- [23] P. Niemi, D. Martins, J. Buchert, C.B. Faulds, Pre-hydrolysis with carbohydrases facilitates the release of protein from brewer's spent grain, *Bioresour. Technol.* 136 (2013) 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.076>.
- [24] I. Marcet, C. Álvarez, B. Paredes, M. Díaz, The use of sub-critical water hydrolysis for the recovery of peptides and free amino acids from food processing wastes. Review of sources and main parameters, *Waste Manag.* 49 (2016) 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.009>.
- [25] L.Y. Chew, G.T. Toh, A. Ismail, Application of proteases for the production of bioactive peptides, in: *Enzym. Food Biotechnol. Prod. Appl. Futur. Prospect.*, 2018: pp. 247–261. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00015-3>.
- [26] J. Mótyán, F. Tóth, J. Tózsér, Research Applications of Proteolytic Enzymes in

- Molecular Biology, Biomolecules. 3 (2013) 923–942.
<https://doi.org/10.3390/biom3040923>.
- [27] P.G. Manfredini, V.A.F. Cavanhi, J.A.V. Costa, L.M. Colla, Bioactive peptides and proteases: characteristics, applications and the simultaneous production in solid-state fermentation, Biocatal. Biotransformation. 39 (2021) 360–377.
<https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1849151>.
- [28] C. Roblet, J. Amiot, C. Lavigne, A. Marette, M. Lessard, J. Jean, C. Ramassamy, C. Moresoli, L. Bazinet, Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes, Food Res. Int. 46 (2012) 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.014>.
- [29] R.J. Elias, S.S. Kellerby, E.A. Decker, Antioxidant activity of proteins and peptides, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 48 (2008) 430–441.
<https://doi.org/10.1080/10408390701425615>.
- [30] M. Verni, E. Pontonio, A. Krona, S. Jacob, D. Pinto, F. Rinaldi, V. Verardo, E. Díaz-de-Cerio, R. Coda, C.G. Rizzello, Bioprocessing of Brewers' Spent Grain Enhances Its Antioxidant Activity: Characterization of Phenolic Compounds and Bioactive Peptides, Front. Microbiol. 11 (2020) 1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01831>.
- [31] P. Ançuța, A. Sonia, Oil press-cakes and meals valorization through circular economy approaches: A review, Appl. Sci. 10 (2020) 7432.
<https://doi.org/10.3390/app10217432>.
- [32] S. Rakita, B. Kokić, M. Manoni, S. Mazzoleni, P. Lin, A. Luciano, M. Ottoboni, F. Cheli, L. Pinotti, Cold-Pressed Oilseed Cakes as Alternative and Sustainable Feed Ingredients: A Review, Foods. 12 (2023) 432. <https://doi.org/10.3390/foods12030432>.
- [33] M. Siva Sankari, S. Vivekanandhan, M. Misra, A.K. Mohanty, Oil Cakes as Sustainable Agro-Industrial Feedstock for Biocarbon Materials, ChemBioEng Rev. 9 (2022) 21–41.
<https://doi.org/10.1002/cben.202100025>.
- [34] T.A. Egorova, T.N. Lenkova, Rapeseed (.Brassica napus L.) and its prospective useage

- in poultry diet, *Sel'skokhozyaistvennaya Biol.* 50 (2015) 172–182. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.2.172eng>.
- [35] S.F. Mirpoor, C.V.L. Giosafatto, R. Porta, Biorefining of seed oil cakes as industrial co-streams for production of innovative bioplastics. A review, *Trends Food Sci. Technol.* 109 (2021) 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.014>.
- [36] C. Vasudha, L. Sarla, Nutritional quality analysis of sunflower seed cake (SSC), *Pharma Innov. J.* 10 (2021) 720–728.
- [37] A. Petraru, F. Ursachi, S. Amariei, Nutritional characteristics assessment of sunflower seeds, oil and cake. Perspective of using sunflower oilcakes as a functional ingredient, *Plants.* 10 (2021) 2487. <https://doi.org/10.3390/plants10112487>.
- [38] L. Rajpoot, A. Tagade, G. Deshpande, K. Verma, S.R. Geed, D.S. Patle, A.N. Sawarkar, An overview of pyrolysis of de-oiled cakes for the production of biochar, bio-oil, and pyro-gas: Current status, challenges, and future perspective, *Bioresour. Technol. Reports.* 19 (2022) 101205. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101205>.
- [39] B. Cieřlikowski, T. Juliszewski, B. Łapczyńska-Kordon, UTYLIZACJA NA CELE ENERGETYCZNE PRODUKTÓW UBOCZNYCH TECHNOLOGII BIOPALIWOWEJ, *Inżynieria Rol.* 12 (2006) 51–57.
- [40] D.H. Souza, E.R. Freitas, A.V.O. Alencar, M.K.O. Costa, A.S. Santos, J.F. Freire, A.K.S. Rocha, R.D. Coelho, R.C. Nepomuceno, Sunflower cake in brown-egg laying pullet diets: Effects on the growing phase and on the beginning of production cycle, *Anim. Feed Sci. Technol.* 269 (2020) 114663. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114663>.
- [41] A. Fridrihsone, F. Romagnoli, U. Cabulis, Environmental life cycle assessment of rapeseed and rapeseed oil produced in Northern Europe: A Latvian case study, *Sustain.* 12 (2020) 5699. <https://doi.org/10.3390/su12145699>.
- [42] Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets, 2022. <https://doi.org/10.4060/cc2864en>.

- [43] S.S. Teh, A.E.D.A. Bekhit, Utilization of oilseed cakes for human nutrition and health benefits, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13847-3_10.
- [44] S. Ramachandran, S.K. Singh, C. Larroche, C.R. Soccol, A. Pandey, Oil cakes and their biotechnological applications - A review, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2000–2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.002>.
- [45] T. Szymczak, J. Cybulska, M. Podleśny, M. Frąć, Various perspectives on microbial lipase production using agri-food waste and renewable products, *Agric.* 11 (2021) 540. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060540>.
- [46] E. Khaled, H.Y. Aboul-Enein, Surfactants, in: 2015: pp. 905–930. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1301-5_10.
- [47] D.K.F. Santos, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>.
- [48] E.J. Gudiña, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications, *Mar. Drugs.* 14 (2016) 38. <https://doi.org/10.3390/md14020038>.
- [49] S.S. Mohanty, Y. Koul, S. Varjani, A. Pandey, H.H. Ngo, J.S. Chang, J.W.C. Wong, X.T. Bui, A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production, *Microb. Cell Fact.* 20 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>.
- [50] A.I. Adetunji, A.O. Olaniran, Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview, *Saudi J. Biol. Sci.* 28 (2021) 669–679. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.058>.
- [51] X. Chen, Y. Lu, M. Shan, H. Zhao, Z. Lu, Y. Lu, A mini-review: mechanism of antimicrobial action and application of surfactin, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 38 (2022) 143. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03323-3>.
- [52] K.R. Meena, A. Sharma, S.S. Kanwar, Antitumoral and Antimicrobial Activity of

- Surfactin Extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015, *Int. J. Pept. Res. Ther.* 26 (2020) 423–433. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09848-w>.
- [53] L. Neboh, H. A., Abu, G. O., Uyigue, Utilization of Agro-industrial Wastes as Substrates for, *IARD Int. J. Environ. Res.* 2 (2016) 2504–8821.
- [54] H. Jin, X. Zhang, K. Li, Y. Niu, M. Guo, C. Hu, X. Wan, Y. Gong, F. Huang, Direct bio-utilization of untreated rapeseed meal for effective iturin a production by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation, *PLoS One.* 9 (2014) 111171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111171>.
- [55] M.E. Mercade, M.A. Manresa, The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 61–64. <https://doi.org/10.1007/BF02541473>.
- [56] V.K. de Oliveira Schmidt, J. de Souza Carvalho, D. de Oliveira, C.J. de Andrade, Biosurfactant inducers for enhanced production of surfactin and rhamnolipids: an overview, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 37 (2021) 21. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02970-8>.
- [57] E.J. Gudiña, J.F.B. Pereira, L.R. Rodrigues, J.A.P. Coutinho, J.A. Teixeira, Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 68 (2012) 56–6. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.001>.
- [58] S.W. Sun, Y.C. Lin, Y.M. Weng, M.J. Chen, Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.04.006>.
- [59] Minkiewicz, Iwaniak, Darewicz, BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>.
- [60] F. Červenák, K. Juríková, H. Devillers, B. Kaffe, A. Khatib, E. Bonnell, M. Sopkovičová, R.J. Wellinger, J. Nosek, Y. Tzfati, C. Neuvéglise, L. Tomáška, Identification of telomerase RNAs in species of the *Yarrowia* clade provides insights into the co-

- evolution of telomerase, telomeric repeats and telomere-binding proteins, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49628-6>.
- [61] S.A. Dineen, D. Gibson, T.J. Karplus, K. Li, W. Lopez, R. McWilliam, H. Remmert, M. Söding, J. Thompson, J.D. Higgins, D. G, F. Wilm, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 539.
- [62] M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel, Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building, *Mol. Biol. Evol.* 27 (2010) 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
- [63] J. Castresana, Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis, *Mol. Biol. Evol.* 17 (2000) 540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>.
- [64] S. Guindon, J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, O. Gascuel, New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0, *Syst. Biol.* 59 (2010) 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- [65] T. Carver, S.R. Harris, M. Berriman, J. Parkhill, J.A. McQuillan, Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data, *Bioinformatics.* 28 (2012) 464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>.
- [66] M. Meunchan, S. Michely, H. Devillers, J.M. Nicaud, A. Marty, C. Neuvéglise, Comprehensive analysis of a yeast lipase family in the *Yarrowia* clade, *PLoS One.* 10 (2015) e63356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143096>.
- [67] J.J. Almagro Armenteros, K.D. Tsirigos, C.K. Sønderby, T.N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.

- [68] V. Thumulari, J.J. Almagro Armenteros, A.R. Johansen, H. Nielsen, O. Winther, DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models, *Nucleic Acids Res.* 50 (2022) W228–W234. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac278>.
- [69] F. Shahidi, M. Naczki, D. Hall, J. Synowiecki, Insensitivity of the amino acids of canola and rapeseed to methanol-ammonia extraction and commercial processing, *Food Chem.* 44 (1992) 283–285. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90051-3).
- [70] M.L. Anson, The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.* 22 (1938) 79–89. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.1.79>.
- [71] H. Zhang, L. Xu, D. Xiao, J. Xie, H. Zeng, Z. Wang, X. Zhang, Y. Niu, Z. Shen, J. Shen, X. Wu, E. Li, Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: Significant correlation with cell differentiation and tumour invasion, *J. Clin. Pathol.* 60 (2007) 555–561. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.039297>.
- [72] T. Janek, M. Łukaszewicz, T. Rezanka, A. Krasowska, Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6118–6123. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.109>.
- [73] E.J. Gudiña, E.C. Fernandes, A.I. Rodrigues, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 59. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00059>.
- [74] N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>.
- [75] B.J. Xu, S.K.C. Chang, Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods, *J. Food Sci.* 73 (2008) H19–H27. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00625.x>.

- [76] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- [77] C. Raveschot, B. Cudennec, B. Deracinois, M. Frémont, M. Vaeremans, J. Dugersuren, S. Demberel, D. Drider, P. Dhulster, F. Coutte, C. Flahaut, Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from Mongolian traditional dairy products: A multiparametric analysis, *Food Chem.* 304 (2020) 125415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125415>.
- [78] C.C. Udenigwe, R.E. Aluko, Multifunctional Cationic Peptide Fractions from Flaxseed Protein Hydrolysates, *Plant Foods Hum. Nutr.* 67 (2012) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0275-3>.
- [79] J.J.P. Stewart, Application of the PM6 method to modeling proteins, *J. Mol. Model.* 15 (2009) 765–805. <https://doi.org/10.1007/s00894-008-0420-y>.
- [80] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum mechanical continuum solvation models, *Chem. Rev.* (2005) 2999–3094. <https://doi.org/10.1021/cr9904009>.
- [81] G. Morris, R. Huey, W. Linkstrom, M. Sanner, R. Belew, D. Goodsell, Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2010) 2785–2791.
- [82] M. Akif, S.L. Schwager, C.S. Anthony, B. Czarny, F. Beau, V. Dive, E.D. Sturrock, K.R. Acharya, Novel mechanism of inhibition of human angiotensin-I-converting enzyme (ACE) by a highly specific phosphinic tripeptide, *Biochem. J.* 436 (2011) 53–59. <https://doi.org/10.1042/BJ20102123>.
- [83] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* (2000) 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- [84] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis, *J.*

- Comput. Chem. 25 (2004) 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [85] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions, *Protein Eng. Des. Sel.* 8 (1995) 127–134. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>.
- [86] P. Minkiewicz, A. Iwaniak, M. Darewicz, BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>.
- [87] I. Celus, K. Brijs, J.A. Delcour, Enzymatic hydrolysis of Brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8703–8710. <https://doi.org/10.1021/jf071793c>.
- [88] X. Kong, H. Zhou, H. Qian, Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates, *Food Chem.* 102 (2007) 759–763. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.062>.
- [89] B. Olanca, D.S. Özyay, Preparation and functional properties of gluten hydrolysates with wheat-bug (*Eurygaster spp.*) protease, *Cereal Chem.* 87 (2010) 518–523. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-02-10-0026>.
- [90] E.F. Vieira, D.D. da Silva, H. Carmo, I.M.P.L.V.O. Ferreira, Protective ability against oxidative stress of brewers' spent grain protein hydrolysates, *Food Chem.* 228 (2017) 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.050>.
- [91] A. Connolly, M. Cermeño, D. Crowley, Y. O'Callaghan, N.M. O'Brien, R.J. FitzGerald, Characterisation of the in vitro bioactive properties of alkaline and enzyme extracted brewers' spent grain protein hydrolysates, *Food Res. Int.* 121 (2019) 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.008>.
- [92] M.. Śnieżewski, Ł.; Walczak, E .: Lazar, Z.; Robak, Low peptone dose as inductor of alkaline protease promoter used for invertase gene expression in *Yarrowia lipolytica*, *J. Life Sci.* 6 (2012) 1100–1108.
- [93] A. Braga, N. Gomes, I. Belo, Lipase induction in *Yarrowia lipolytica* for castor oil

- hydrolysis and its effect on γ -decalactone production, *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 89 (2012) 1041–1047. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1987-5>.
- [94] J. Ibaruri, M. Cebrián, I. Hernández, Solid State Fermentation of Brewer's Spent Grain Using *Rhizopus sp.* to Enhance Nutritional Value, *Waste and Biomass Valorization*. 10 (2019) 3687–3700. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00654-5>.
- [95] G.J.M. den Hartog, A.W. Boots, A. Adam-Perrot, F. Brouns, I.W.C.M. Verkooijen, A.R. Weseler, G.R.M.M. Haenen, A. Bast, Erythritol is a sweet antioxidant, *Nutrition*. 26 (2010) 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.05.004>.
- [96] K. Paraszkiwicz, P. Bernat, A. Kuśmierska, J. Chojniak, G. Płaza, Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources, *J. Environ. Manage.* 209 (2018) 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.033>.
- [97] M.R. Abas, A.J.A. Kader, M.S. Khalil, A.A. Hamid, M.H.M. Isa, Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 by Using Treated Palm Oil Mill Effluent (POME) as fermentation media, *Int. Conf. Food Agric.* 55 (2013).
- [98] N. Vedaraman, N. Venkatesh, Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils, *Brazilian J. Chem. Eng.* 28 (2011) 175–180. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000200001>.
- [99] Q. Liu, J. Lin, W. Wang, H. Huang, S. Li, Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions, *Biochem. Eng. J.* 93 (2014) 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.08.023>.
- [100] J. Zhang, Q. Xue, H. Gao, H. Lai, P. Wang, Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery, *Microb. Cell Fact.* 15 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0574-8>.
- [101] V.K. de O. Schmidt, Hydrophobic inducers to enhanced surfactin production using cassava wastewater as low-cost culture medium: a prospection on new, In PhD Thesis,

Universidade Federal de Santa Catarina, 2022.

- [102] F. Hu, Y. Liu, S. Li, Rational strain improvement for surfactin production: Enhancing the yield and generating novel structures, *Microb. Cell Fact.* (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1089-x>.
- [103] S. Abdollahi, Z. Tofighi, T. Babaei, M. Shamsi, G. Rahimzadeh, H. Rezvanifar, E. Saeidi, M.M. Amiri, Y.S. Ashtiani, N. Samadi, Evaluation of anti-oxidant and anti-biofilm activities of biogenic surfactants derived from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Iran. J. Pharm. Res.* 9 (2020) 115. <https://doi.org/10.22037/IJPR.2020.1101033>.
- [104] C. Shao, L. Liu, H. Gang, S. Yang, B. Mu, Structural diversity of the microbial surfactin derivatives from selective esterification approach, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 1855–1872. <https://doi.org/10.3390/ijms16011855>.
- [105] O. Tabbene, D. Gharbi, I. Ben Slimene, S. Elkahoui, M.N. Alfeddy, P. Cosette, M.L. Mangoni, T. Jouenne, F. Limam, Antioxidative and DNA protective effects of bacillomycin D-like lipopeptides produced by B38 strain, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168 (2012) 2245–2256. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9933-z>.
- [106] I. Ghazala, M. Bouassida, F. Krichen, J. Manuel Benito, S. Ellouz-Chaabouni, A. Haddar, Anionic lipopeptides from *Bacillus mojavensis* I4 as effective antihypertensive agents: Production, characterization, and identification, *Eng. Life Sci.* 17 (2017) 1244–1253. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700020>.

8. Dorobek naukowy

Publikacje

1. **Ciurko D. P.**, Łaba W., Piegza M., Juszczak P., Choińska-Pulit A., Sobolczyk-Bednarek J. 2019. Enzymatic bioconversion of feather waste with keratinases of *Bacillus cereus* PCM 2849. Polish Journal of Chemical Technology: 21 (3) 53—59. <https://doi.org/10.2478/pjct-2019-0030>
(IF= 1,115; MEiN= 70)
2. **Ciurko D.**, Łaba W., Żarowska B., Janek T. 2021. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. RSC Advances: 11 (8), 4688-4700. DOI: [10.1039/D0RA08830G](https://doi.org/10.1039/D0RA08830G)
(IF= 4,036; MEiN= 100)
3. **Ciurko D.**, Czyżnikowska Ż., Kancelista A., Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. International Journal of Molecular Sciences: 23 (18), 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>
(IF= 6,208; MEiN= 140)
4. **Ciurko D.**, Neuvéglise C., Szwechłowicz M., Lazar Z., Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of Yarrowia Clade Species and Their Putative Applications. International Journal of Molecular Sciences: 24 (7), 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>
(IF= 6,208; MEiN= 140)
5. **Ciurko D.**, Łaba W., Kancelista A., John Ł., Gudiña E. J., Lazar Z., Janek T. 2023. Efficient conversion of black cumin cake from industrial waste into lipopeptide biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Biochemical Engineering Journal: 108981. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108981>
(IF= 4,446; MEiN= 100)

6. **Ciurko D.**, Chebbi A., Kruszelnicki M., Czapor-Irzabek H., Urbanek A. K., Polowczyk I., Franzetti A., Janek T. 2023. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from a new strain of *Pseudomonas antarctica* using crude glycerol as a carbon source. RSC Advances: under review.

Doniesienia konferencyjne

1. Żarowska B., Połomska X., Grzegorzczak M., Banach K., **Ciurko D.** Biological activity of selected yeast strains against phytopathogenic fungi. European Biotechnology Congress., 25.05.2017-27.05.2017. Dubrovnik, Croatia. Journal of Biotechnology: 256:S58.
2. **Ciurko D.**, Łaba W., Piegza M., Kawa-Rygielska J. Two-stage microbial treatment of brewer's spent grain for enhanced extraction of proteins. Biotechnology-Research and Industrial Applications. 20.06.2018-21.06.2018. Wrocław, Polska.
3. Grzywacz A., **Ciurko D.**, Janek T. Optymalizacja produkcji biosurfaktantów przez bakterie arktyczne. Tygiel 2022. 24.03.2022-27.03.2022. Lublin, Polska.
4. **Ciurko D.**, Kancelista A., Lazar Z., Janek T. Agro-industrial oil wastes as a low cost substrate for the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* #309. 18th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries. 1.06.2022-3.06.2022. Bruges, Belgium.
5. **Ciurko D.**, Neuvéglise C., Lazar Z., Janek T. Identification and characterization of proteases secreted by *Yarrowia* clade. The Biochemistry Global Summit (25th IUBMB Congress, the 46th FEBS Congress and the 15th PABMB Congress). 9.07.2022-14.07.2022. Lizbona, Portugalia.
6. Łaba W., Cwynar M., **Ciurko D.**, Wilk M., Piegza M. Optimization of one-step extraction and hydrolysis of proteins from pumpkin seed oil cake through bacterial fermentation. Biotechnology-Research and Industrial Applications. 15.09.2022-15.09.2022. Wrocław, Polska.

Staż i szkolenia

1. 10.05.2021

Szkolenie: Biotechnology to build a brighter future: Food, Health and Environmental Applications.

Organizator: Centre of Biological Engineering (University of Minho) online workshop

2. 24.09.2021-21.12.2021

Staż naukowy w Bicocca: Università degli Studi di Milano (Włochy)

Temat: Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from a new strain of *Pseudomonas antarctica* using crude glycerol as a carbon source.

Opiekun naukowy: Andrea Franzetti

Finansowanie: Wsparcie Wiodących Zespołów Badawczych - Biotech@life

Granty i Projekty badawcze

1. 10.10.2019-09.10.2020

Ocena możliwości pozyskania bioaktywnych peptydów na drodze hydrolizy białek młóta browarniczego w hodowli bakterii proteolitycznych. Narodowe Centrum Nauki. Projekt MINIATURA 3 nr DEC-2019/03/X/NZ9/00052, wykonawca zadania.

2. 01.02.2021-31.03.2023

Potencjał biotechnologiczny oraz aktywność przeciwdrobnoustrojowa nowych koniugatów biosurfaktant-lipaza immobilizowanych na powierzchni biopolimerów. Narodowe Centrum Nauki. Projekt OPUS 19 nr 2020/37/B/NZ9/01519, stypendysta.

9. Publikacje wraz z oświadczeniami współautorów


 Cite this: *RSC Adv.*, 2021, **11**, 4688

Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain†

Dominika Ciurko, * Wojciech Łaba, Barbara Żarowska and Tomasz Janek

Brewers' spent grain was used as a substrate to obtain protein hydrolysates with antioxidant activity. Hydrolysis was conducted in the culture using proteolytic bacteria. Hydrolysis was controlled by measurement of α -amino group concentration and with the aid of size exclusion chromatography. For each culture the degree of hydrolysis was calculated. The most efficient protein hydrolysis was observed in the cultures of *Bacillus cereus* (43.06%) and *Bacillus lentus* (41.81%). In addition, gelatin zymography was performed in order to detect bacterial proteases and their activity. The profile of secreted enzymes was heterogeneous, while the greatest variety was observed for *Bacillus polymyxa*. Brewers' spent grain protein hydrolysates exhibited high antioxidant activity. *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* post-cultured media displayed the highest activity, respectively 1291.97 and 1621.31 μM TEAC per g for ABTS, 188.89 and 160.93 μM TEAC per g for DPPH, and 248.81 and 284.08 μM TEAC per g for the FRAP method.

Received 16th October 2020

Accepted 19th January 2021

DOI: 10.1039/d0ra08830g

rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

Barley, as well as hops, water and yeast, is a basic raw material used in the traditional approach to beer production. Grain of barley consists of three main parts: the germ (embryo), the endosperm (comprising the aleurone and starchy endosperm) and grain coverings divided into three fractions: seed coat, pericarp layers and husk. As a result of the brewing process, consisting of malting and mashing stages, barley's grains are transformed into fermentation medium to produce beer, known as wort. However, the brewing process is selective and allows only for the utilization of those nutrients necessary to produce the wort, while water-insoluble proteins and the cell wall residues of grain are rejected.¹ This residual, solid fraction is called 'brewers' spent grain' (BSG) and is primarily composed of cellulose (17%), non-cellulosic polysaccharides (28%) and lignin (28%). Moreover, the presence of significant quantities of lipids, vitamins, minerals, phenolic acids and proteins (20%) has been confirmed by numerous studies.²

The BSG protein fraction is composed of barley hordeins, glutelins, globulins and albumins.³ The hordein fraction comprises approximately 35–55% of the total barley proteins and is considered as the main storage proteins. Barley glutelins,

the second major fraction, constitute around 35–45% of the total storage proteins. The glutelin fraction is distinguished by high proportions of glutamine/glutamic acid (20.2%), and glycine (8.4%) and high concentration of hydrophobic amino acids (35%) among which proline (11.2%), leucine (8.0%), alanine (6.3%) and valine (6.1%) are dominant.⁴ Globulins and albumins represent functional and nutritional significance of a barley grain. Globulins are built mostly of glutamine/glutamic acid, glycine, asparagines/aspartic acid, leucin and alanin.⁵

Barley is a conventional raw material used in beer production. It is estimated that approximately 16% of the annual world barley production is used in malting.⁶ However, the consumer preferences have changed over the year. In the last few years, the expansion of craft and home brewing has added to the demand for wheat beers. In addition, more attention is paid to the international breweries producing wheat beer.⁷ An excellent example is the German market, where wheat beer production nearly doubled from 1990 to 2009. Currently, one out of every ten beers sold in Germany is a wheat beer.⁸

Wheat protein content ranges from 6 to 20%, depending on the variety and environmental conditions during growth. While barley grain contains mostly low-molecular weight protein, the wheat protein fraction is mainly built of high-molecular-weight molecules, classified into two groups: the storage and cytoplasmic proteins. Albumins and globulins, included in the second group, account for about 15–20% of the total protein content. Their function is to maintain physiological activity of grain.⁸ Gliadins and glutenins represent two types of storage proteins collectively known as prolamins, due to the high content of proline and glutamine. Wheat gliadins account for about 30% of the total grain protein and occur in the

Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Department of Biotechnology and Food Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, J. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław, Poland. E-mail: wojciech.laba@upwr.edu.pl; barbara.zarowska@upwr.edu.pl; tomasz.janek@upwr.edu.pl; dominika.ciurko@upwr.edu.pl; Tel: +48 71 320 7723

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0ra08830g



monomeric form.⁹ Glutenins account for about 35% of the total protein content and belong to the group of the largest molecules found in nature, due to molecular weight exceeding one million.¹⁰

Current research trends show that a growing number of researchers are engaged in exploration of new methods for BSG protein utilization. It seems to be justified due to the growing BSG production, high average protein concentration (20%) and by the fact that approximately 65% of the total malt proteins are retained in the BSG structure.³ Numerous studies focused on the use of BSG proteins to produce hydrolysates with significant biological activity.^{11–13} However, there is a large variety of methods commonly used by researchers. One of the best known is based on the production of BSG protein-enriched isolate in the first stage of the process, followed by hydrolysis conducted by use of commercially available enzymes such as Alcalase, Corolase PP, Flavourzyme, Promod 144MG. In this case, the first stage of research, production of protein cocktail, is usually performed by use of alkaline extraction.¹⁴ Another widely used method replaces enzymatic hydrolysis of BSG proteins with acid precipitation.¹¹ A completely different approach to BSG protein solubilization was applied by Treimo *et al.*,¹⁵ in whose research the BSG protein fraction was extracted as a result of the combined action of carbohydrases (Depol740 and Econase) and peptidase (Alcalase and Promod 439).

Bacterial hydrolysis, another approach allowing for the exploitation of BSG proteins in various scientific fields, was scrupulously explored by researchers. In the study of Kotlar *et al.*¹⁶ the optimal conditions for the enzymatic hydrolysis of BSG performed by *Bacillus cereus* strain were defined, including the storage and sterilization conditions, medium composition and the enzyme source as parameters affecting the microbial-mediated processing of BSG. As the research demonstrated, the drying of BSG at 60 °C for 24–48 h was the most beneficial method to provide storage stability, whereas autoclaving was the best treatment for microbial inactivation, providing an additional positive effect on the proteolytic activity, due to the thermal coagulation of some BSG proteins. The optimal medium composition for the protein solubilization included 36% of pretreated BSG. The process proceeded more effectively with the participation of crude enzyme extract, rather than with the same concentration of fresh culture.

In other research, Łaba *et al.*¹⁷ investigated the impact of BSG medium composition on protease production and protein solubilization in cultures of *B. cereus* PCM 2849 and *B. subtilis* PCM 2850. There were significant differences between the two tested strains. The former exhibited nearly five times higher proteolytic activity in the BSG medium with minerals (MgSO_4 , KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2) than in the medium without minerals. Oppositely, in the culture of the latter, a significant difference in the proteolytic activity was not observed, whereas better results were obtained in the culture conducted without minerals.

In the present study, BSG proteins are hydrolyzed directly in the bacterial cultures in order to obtain protein hydrolysates with significant biological activity. This simple procedure, facilitate the utilization of the total raw material as a medium for bacterial growth. Sugars, lipids, vitamins and minerals

included in BSG structure allow the proper development of bacterial cultures. The great advantage of this approach is the ability to skip the protein extraction procedure, due to the multi-functional nature of microorganisms. It entails relevant reduction of economic cost and workload.

The BSG used in this research represents a unique raw material because of being a mixture of the insoluble part of wheat and barley grain. Therefore, the profile of compounds obtained as a result of proteolysis may be more diverse. Such a procedure increases the opportunity to obtain heterogenic mixture of biologically active compounds.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Luria-Bertani (LB) broth was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Schnellendorf (Germany)), De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth and Tryptic Soy (TSB) broth were purchased from Sigma (Millipore, Schnellendorf (Germany)). Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (FC reagent), Triton X-100 (laboratory grade), sodium dodecyl sulfate (SDS; ($\geq 99\%$)), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS; ($\geq 98\%$)), potassium peroxydisulfate ($\geq 99\%$), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox; ($\geq 97\%$)), iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$; ($\geq 97\%$)), and protease from *Bacillus licheniformis* ≥ 2.4 U were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Schnellendorf (Germany)). 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ; ($\geq 98\%$)) was purchased from Sigma (Supelco, Schnellendorf (Germany)). Coomassie Brilliant Blue R 250 was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)). Peptide digest assay standard and Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham (USA)). All chemicals used in this research were of analytical grade.

2.2. Materials, microorganisms and cultivation media

The BSG samples, obtained from a single batch (October 2018), were collected from the brewery (Browar Stu Mostów, Wrocław, Poland) and dried in order to prevent microbial contamination and spoilage. The process was carried out for 48 h at 50 °C with periodic mixing and was controlled by measuring the humidity of the raw material. The initial malt from which BSG was obtained was composed of 30% barley and 70% wheat grain.

Bacterial strains used to hydrolyze BSG proteins were obtained from the Polish Collection of Microorganisms of the Institute of Immunology and Experimental Therapy (Wrocław, Poland). *Bacillus cereus* PCM 2849, *Bacillus subtilis* PCM 2850, *Bacillus polymyxa* ATCC 842, *Bacillus lentus* PCM 450, *Kocuria rhizophila* PCM 2931, and *Micrococcus luteus* ATCC 4698, selected due to the ability to produce proteolytic enzymes, were cultured in the LB broth for 24 h at 28 °C with rotary shaking (180 rpm). *Bacillus licheniformis* PCM 1847 was cultured under the same conditions at 37 °C. *Lactobacillus rhamnosus* PCM 489 and *Escherichia coli* PCM 2560 were incubated in MRS broth (pH = 6.2) at 37 °C and TSB broth at 28 °C respectively. After 24 h, post-culture media were centrifuged (8 min, 3900 rpm), then the



cell sediment was resuspended and washed twice with sterile distilled water. Each bacterial cell suspension was used as an inoculum in the next stage of research, in order to hydrolyze BSG proteins.

2.3. *In silico* analysis of brewers' spent grain proteins as a source of bioactive peptides

BSG as a convenient source of protein was explored in terms of the possibility of obtaining bioactive peptides, as a result of hydrolysis. By means of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), amino acid sequences of dominant proteins of barley and wheat were found and explored using the BIOPEP-UWM database.¹⁸ In order to analyze barley's protein, B hordein (GenBank: AAZ76368.1), C hordein (GenBank: AAA92333.1), D hordein (GenBank: BAA11642.1), gamma 1 hordein (GenBank: AFM77737.1), gamma 2 hordein (GenBank: CAE45747.1), gamma 3 hordein (GenBank: AFM77739.1), globulin (GenBank: AAP31050.1) and glutelin (GenBank: BAK04052.1) were applied. Alpha gliadin (GenBank: ABS72146.1), alpha/beta gliadin (GenBank: BAS02464.1), gamma gliadin (GenBank: AAQ63856.1), omega gliadin (GenBank: AAT01617.1) and glutenin (GenBank: CAA27052.1) were used to examine wheat as a source of bioactive peptide. Barley and wheat protein sequences were cleaved *in silico* using specific bacterial enzymes. Subtilisin (EC 3.4.21.62), coccolysin (EC 3.4.24.30), proteinase P1 (EC 3.4.21.96), oligopeptidase F (EC 3.4.24), oligopeptidase B (EC 3.4.21.83), thermolysin (EC 3.4.24.27), proteinase K (EC 3.4.21.67) and 8-V-protease (EC 3.4.21.19) were selected for variant cleavage specificity and bacterial origin. After exploring the BSG potential, as a source of bioactive peptides, subsequent phases of research were implemented.

2.4. Preparation of the brewers' spent grain protein hydrolysate

BSG protein hydrolysis were performed in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of the medium composed of (g L^{-1}): BSG (50), MgSO_4 (1), KH_2PO_4 (0.1), K_2HPO_4 (0.13), CaCl_2 (0.5), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.01). After sterilization, the medium was adjusted to pH = 7 using sterile 5 M NaOH (addition of approx. 350 μl per flask). This stage of the work was essential to create appropriate conditions for bacterial growth, because of the significant drop in pH value observed as a result of BSG sterilization. Afterwards, the BSG medium was inoculated with 2×10^9 cells of each bacterial culture. Uninoculated BSG medium represented a control sample. Protein hydrolysis was carried out at 28 °C with rotary shaking (180 rpm) until the concentration of α -amino groups in the medium reached its maximum value. At every 24 h of cultures, two-milliliter samples were taken, the pH was measured and the concentration of α -amino groups was quantified using the ninhydrin method.¹⁹

2.5. Determination of the degree of hydrolysis

For each culture, the degree of hydrolysis (% DH) was calculated, as an appropriate parameter for assessing the process efficiency. The % DH for each experiment was calculated by comparison of bacterial hydrolysis with hydrolysis conducted in hydrochloric acid (total hydrolysis). The following process was

conducted in three replicates as described by Shahidi *et al.*²⁰ The sample of BSG (1 g) was suspended in 8 ml of 6 M HCl and hydrolyzed for 24 h at 105 °C. After cooling the sample was filtered and the process was completed by the addition of 8 ml of 6 M NaOH. Concentration of α -amino groups, obtained as a result of depicted procedure, was considered to be the maximum achievable and it served as a point of reference for the further calculations. DH% for each bacterial culture was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ DH} = (\text{BH} \times 100) / \text{TH} \quad (1)$$

where TH is the average concentration of α -amino groups after total hydrolysis, calculated per 1 g of BSG sample, and BH is the average concentration of α -amino groups obtained as a result of bacterial hydrolysis, calculated per 1 g of BSG sample.

2.6. Size exclusion chromatography as a tool to investigate brewers' spent grain protein hydrolysis

The hydrolysis of BSG proteins was additionally monitored using a size exclusion chromatography system. At every 24 h of hydrolysis conducted by bacterial cells, samples were taken, clarified by centrifugation (5 min, 10 000 rpm) filtered through 0.45 μm membrane and analyzed. The purpose of the study was to observe increasing concentration of hydrolysis products, in the form of macromolecular protein in the first phase of bacterial growth, and its disintegration products as the process progresses. Chromatography was conducted using a Bio-Rad chromatography system, including an ENrich SEC 70 10×300 column with separation range of 0.5–70 kDa. The column was equilibrated and elution was performed in 50 mM Tris–HCl buffer, containing 0.2 M NaCl (pH = 7.9). Samples (50 μl) were typically eluted at a 0.8 ml min^{-1} flow rate and the absorbance of the eluate was monitored at 280 nm. Each analytical determination was carried out in duplicate.

2.7. Gelatin zymography as an appropriate method for detection of bacterial enzymes

In order to estimate the profile of extracellular proteases, secreted in each bacterial culture, gelatin zymography was performed. The zymography was conducted to estimate the molecular weight of BSG protein-hydrolyzing enzymes, for each bacterial species. It was performed according to Zhang *et al.*²¹ with slight modifications. The overall process of the gelatin zymography is illustrated in Fig. 1.

At the end of the BSG hydrolysis, samples (2 ml) from each bacterial culture were taken, clarified by centrifugation (5 min, 10 000 rpm), filtered through 0.45 μm membrane and diluted (1 : 1) in loading buffer (62.5 mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS, 25% glycerol, 0.01% bromophenol blue). Then, samples containing enzymes were cooled and subjected to SDS-PAGE in 10% Tris-glycine SDS-polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin. In this technique gelatin is digested by active proteolytic enzymes after their separation throughout the gel. Electrophoresis was run under non-denaturing conditions, in order to maintain enzyme activity, at 150 V with constant cooling



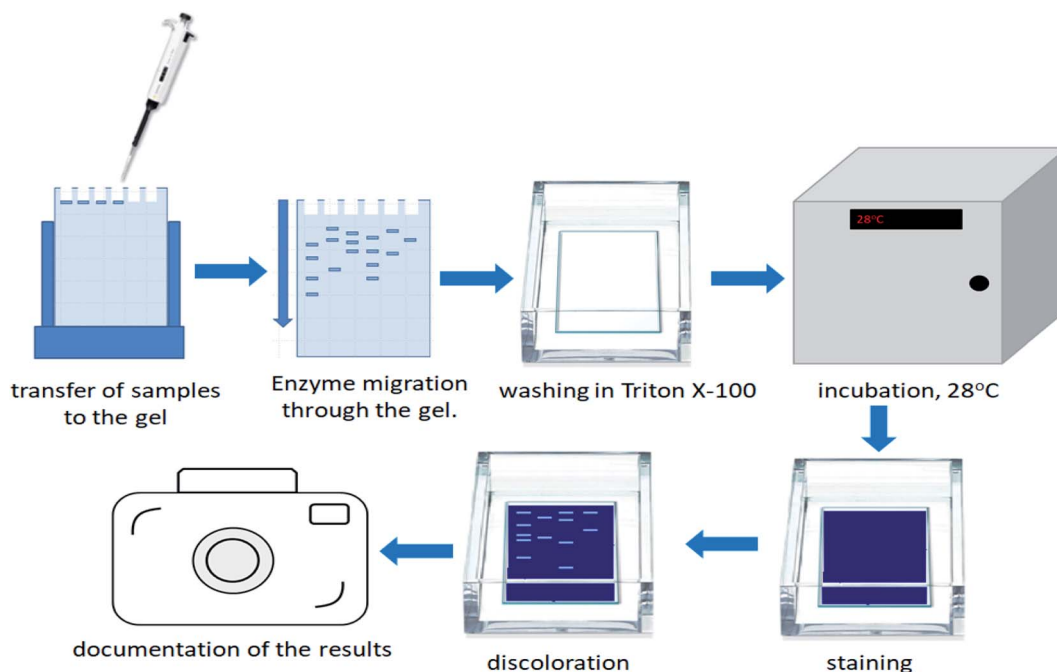


Fig. 1 Illustration of the zymography process.

(electrophoresis container placed on ice in cold room). Maintenance of low temperature prevented excessive digestion of casein during migration of enzymes. Afterwards, the gels were washed in three cycles of 30 min in Triton solution (2.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl) to remove the SDS residue. Gels were then immersed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.5) enriched by 5 mM CaCl_2 and 150 mM NaCl and incubated overnight at 28 °C. The following step, performed to fully activate the enzymes, allowed for the formation of proteolytic clear bands. After incubation, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (0.1% Coomassie blue, 40% methanol, 10% acetic acid) for 3 h, and destained (40% methanol, 10% acetic acid) until clear bands against a blue background were detected. Finally, gels were washed with distilled water and photographed. Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (10 to 250 kDa) was used as molecular weight standard. Uninoculated BSG medium and a commercial protease from *Bacillus licheniformis* $\geq 2.4 \text{ U g}^{-1}$ were used as a control and positive control respectively.

Gelatin zymography was performed to estimate, which enzyme was responsible for BSG protein hydrolysis in each culture. Generally, the more complex the profile of enzymes in the culture is, the more divergent is the mixture of obtained products. It is connected with the specificity of individual enzymes, allowing for the decomposition of polypeptide chains in various ways; hence, wider profiles of active enzymes resulted in obtaining greater concentrations of hydrolysis products.

2.8. Determination of peptide concentration

Peptide concentration was estimated by the modified method of Raveschot *et al.*²² Initially, 100 μl of the tested sample was mixed

with 500 μl of AB reagent and incubated for 10 min at room temperature. Then, 50 μl of FC reagent was added to the reaction mixture and incubated for 30 min in the dark. In order to evaluate peptide concentration the absorbance at 750 nm was measured. A standard curve was established with a peptide digest standard. The calibration curve was performed in a range of 10–100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. AB reagent, necessary in this assay, was prepared as follows: reagent A (0.1 M NaOH + 0.2 M Na_2CO_3) was mixed with reagent B (1% sodium citrate) in a ratio of 50 : 1.

2.9. Determination of antioxidant activity of peptides

As a final stage of the research, the antioxidant activity of the control sample (uninoculated medium) and post-culture BSG media were measured using ABTS assay,²³ DPPH free radical method²⁴ and FRAP assay.²⁵ The research was aimed at confirmation of the presence of biological active compounds, formed as a result of BSG protein hydrolysis.

Initially, ABTS radical cations ($\text{ABTS}^{+\cdot}$) were created, by mixing 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM Potassium peroxydisulfate and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 12–16 h. Then, the absorbance of the radical solution was adjusted to 0.7 (± 0.02) at 734 nm using distilled water. 10 μl of the tested samples were mixed with 990 μl of $\text{ABTS}^{+\cdot}$, vortexed and incubated in the dark, at room temperature. After 5 min of reaction, absorbance at 734 nm was measured using The Spark multimode microplate reader (Tecan Group Ltd.). Trolox ethanol solution was served to prepare the standard curve (0–2000 μM). Measured activity of tested samples was expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity per gram of peptide ($\mu\text{M g}^{-1}$).

Antioxidant activity, expressed as capacity to scavenge DPPH free radicals was investigated according to Xu *et al.*²⁴ with some



modifications. Basically, 50 μl of each sample were added to 950 μl of ethanol solution of DPPH radical (final concentration 0.1 mM), mixed vigorously and left to stand at room temperature in the dark for 30 min. The absorbance of each sample was measured against the corresponding blank (50 μl of the sample suspended in 950 μl of ethanol) at 517 nm using The Spark multimode microplate reader (Tecan Group Ltd.). The free radical scavenging activity was calculated using the calibration Trolox curve, prepared in a range of 20–1000 μM and expressed as micromoles of Trolox equivalent per gram of peptide ($\mu\text{M g}^{-1}$).

According to Benzie *et al.*²⁵ the antioxidant activity of samples were measured using the FRAP method with slight modifications. Initially, 300 μl of working solution (1A:1B:10C), A (10 mM TPTZ in 40 mM HCl), B (20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), C (0.3 M acetate buffer pH = 3.6) were mixed with 100 μl of each sample. Mixtures were incubated for 10 min at room temperature and then the absorbance was measured using The Spark multimode microplate reader (Tecan Group Ltd.) at 593 nm. Methanolic solutions of known Trolox concentrations in the range of 0.05–0.5 $\mu\text{M ml}^{-1}$ were used to prepare the calibration curve.

3. Results and discussion

3.1. Description of bioactive peptides obtained as a result of proteolysis simulation

The extensive *in silico* proteolysis of BSG protein, conducted by means of the BIOPEP-UWM database, demonstrated a significant role of barley and wheat proteins, as a source of biologically active peptide with various activities. Numerous peptides with short amino acid chains, in the range of 2–13 aa, were the products of proteolysis stimulation. Among sequences listed in appendices (Tables S1 and S2†), di- and tripeptides prevailed.

The investigation of peptides obtained from barley and wheat proteins exhibited antioxidant, glucose uptake stimulating and vasoactive substance release stimulating activities. There were inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE), calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (CaMPDE), prolyl oligopeptidase and renin. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and dipeptidyl peptidase-III (DPP-III) were the most frequent products of proteolysis stimulation. However, due to the number, inhibitors of DPP IV and DPP-III were not included in the ESI.† Many of the amino acid sequences, obtained *in silico*, exhibited more than one biological activity. For example, the peptide of the IR sequence demonstrated four different activities, including antioxidant and inhibitory activity against ACE, CaMPDE and renin.

Furthermore, immunostimulating (YG) and anxiolytic (YL) peptides as a product of barley hydrolysis stimulation and anti-inflammatory (YPP and IPP) peptides as a result of wheat proteolysis were formed. Additionally, wheat proteolysis may lead to release of alpha-glucosidase inhibitors (YP), opioid delta receptor ligands (GY) and analgesic peptides (YR).

Unfortunately, as a result of barley and wheat proteolysis stimulation, the presence of a few peptides with negative effects on human health was also detected. It concerns peptides toxic to people suffering from celiac disease. Peptide of the QQQP

sequence was formed as a product of barley's gamma 3 hordein hydrolysis, while QQPY, YPQPQ and QQQP sequences were the product of wheat α -gliadin and γ -gliadin proteolysis. Darewicz *et al.*²⁶ pointed to wheat's glutenin and gliadin and other homologous proteins of barley, rye and maize as a main source of celiac toxic peptides in food products. Moreover, as the authors mentioned, the multiple occurrence of celiac toxic peptides in beer was recently confirmed. By use of bio-informatical instruments, a list of the bioactive peptides, products of BSG proteolysis simulation, was prepared. The number of presented activities indicates many possibilities of the use of BSG protein hydrolysates in various branches of industry, from food to pharmaceuticals. Therefore, further research stages have been implemented.

3.2. Bacterial hydrolysis of BSG proteins

Initially, in order to estimate progress of proteolysis, the pH values of the cultures and uninoculated medium (control) were investigated. Samples were taken at 24 h intervals. Keeping in mind that protein degradation in the microbial culture is accompanied by increasing pH value, it is an appropriate method to monitor the proteolysis. At the beginning, pH for all tested bacterial species was in the range of 6 to 7. Then, during 24 h, a slight decrease for most of the bacterial cultures was noted. The following pattern, presented for the *B. subtilis* PCM 2850 curve (Fig. 2), indicated utilization of sugars, one of the components of BSG, as an easily available carbon source, in the first place. Consequently, during 24 h of hydrolysis conducted by *B. subtilis* PCM 2850, the acidification of the culture medium to nearly pH 5 was noted. In the following hours (24–72) the expected increase of pH value in the culture of BSG hydrolyzing bacteria was observed, to eventually reach pH 8. At the same time, only minor changes were noted for non-hydrolyzing species. An excellent example of non-hydrolyzing bacteria was *E. coli* PCM 2560 culture, where the pH value remained almost at the same level throughout the process (pH = 5.5–6). Also, the pH of uninoculated media (control) remained stable (pH = 6).

Similar observation was made by Paul *et al.*,²⁷ who investigated the process of feather protein hydrolysis in the culture of *Paenibacillus* sp. They observed the shift of medium pH towards the alkaline range from 8.5 to 9.3 during the course of feather degradation. The observed tendency of the medium alkalization could be explained by the hydrolysis of feather protein, followed by the release of deamination products. To summarize, pH monitoring is a useful tool to observe the changes occurring during protein hydrolysis. By the increasing pH value, the protein hydrolysis conducted in bacterial cultures can be easily confirmed.

BSG proteins were efficiently hydrolyzed by six (*B. cereus* PCM 2849, *B. subtilis* PCM 2850, *B. polymyxa* ATCC 842, *B. lentus* PCM 450, *B. licheniformis* PCM 1847, *K. rhizophila* PCM 2931) of all tested species (Fig. 3) evidenced by increasing concentration of α -amino groups.

At the beginning, directly after medium inoculation, the concentration of α -amino groups in the bacterial cultures reached approximately 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$, while the calculated % DH



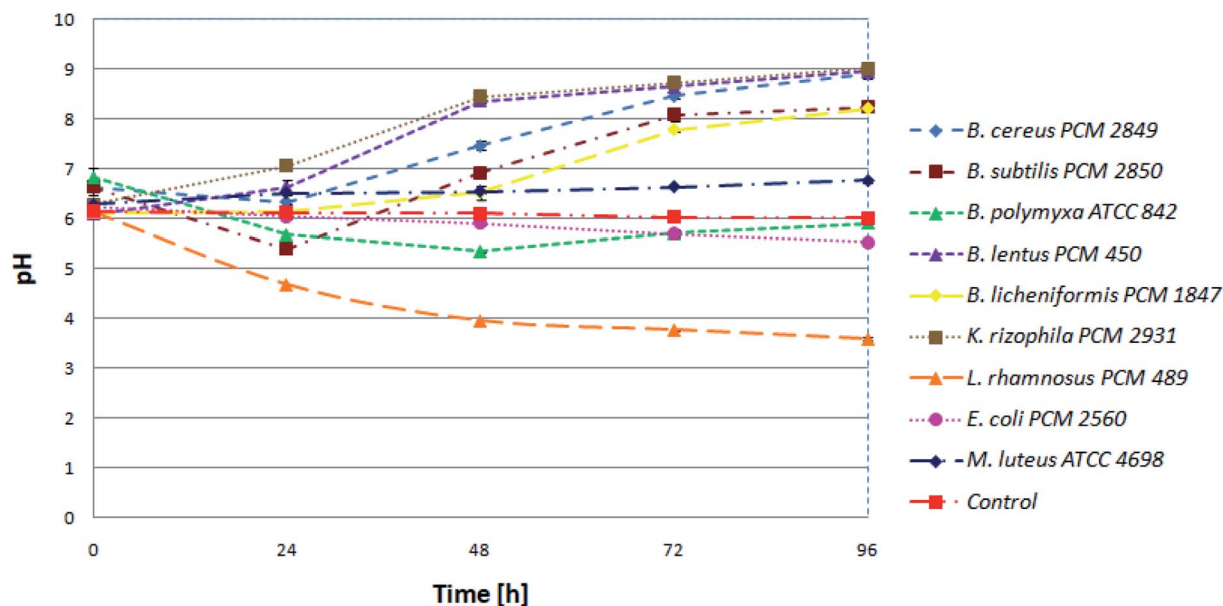


Fig. 2 Kinetics of pH value in the bacterial cultures.

was approximately 4–5%. The presence of free α -amino groups at this stage of the process was a result of high temperatures, causing partial protein hydrolysis during medium sterilization. Then, for the listed species, progressive hydrolysis of BSG proteins was observed. It was manifested by increasing concentration of hydrolysis products and by the above-mentioned increase in pH value. The best results were obtained in *B. cereus* PCM 2849 and *B. lentus* PCM 450 cultures, where the concentration of α -amino groups, after 72 h of bacterial growth, exceeded $2583.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $2508.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ respectively. Furthermore, a rapid increase of % DH was observed (Fig. 4). At the first day of hydrolysis conducted by *B.*

cereus PCM 2849, a significant rise of % DH, from 5.3% immediately after inoculation until 20.3% after 24 h of hydrolysis was noted. Obtained results are in line with studies of Kotlar *et al.*,²⁸ where the hydrolysis of BSG protein by *B. cereus* extracellular peptidase was investigated. In the following research DH% after 2 h of reaction reached 2.7% and the process was stopped after 24 h, obtaining around 22%.

Similar research was performed by Celus *et al.*²⁹ where commercial *B. licheniformis* Alcalase, *Aspergillus oryzae* Flavourzyme and porcine-derived pepsin were used to hydrolyze BSG protein concentrate. The best result was obtained by use of Alcalase, after 2 h of hydrolysis (13%).

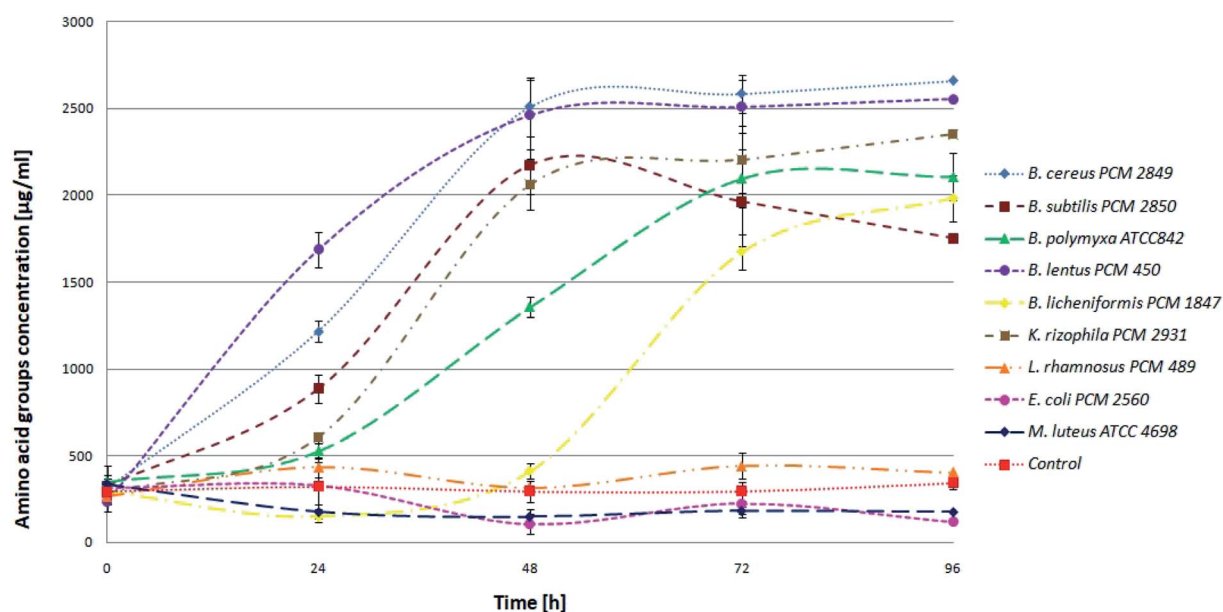


Fig. 3 Kinetics of the hydrolysis of BSG protein in the bacterial cultures.



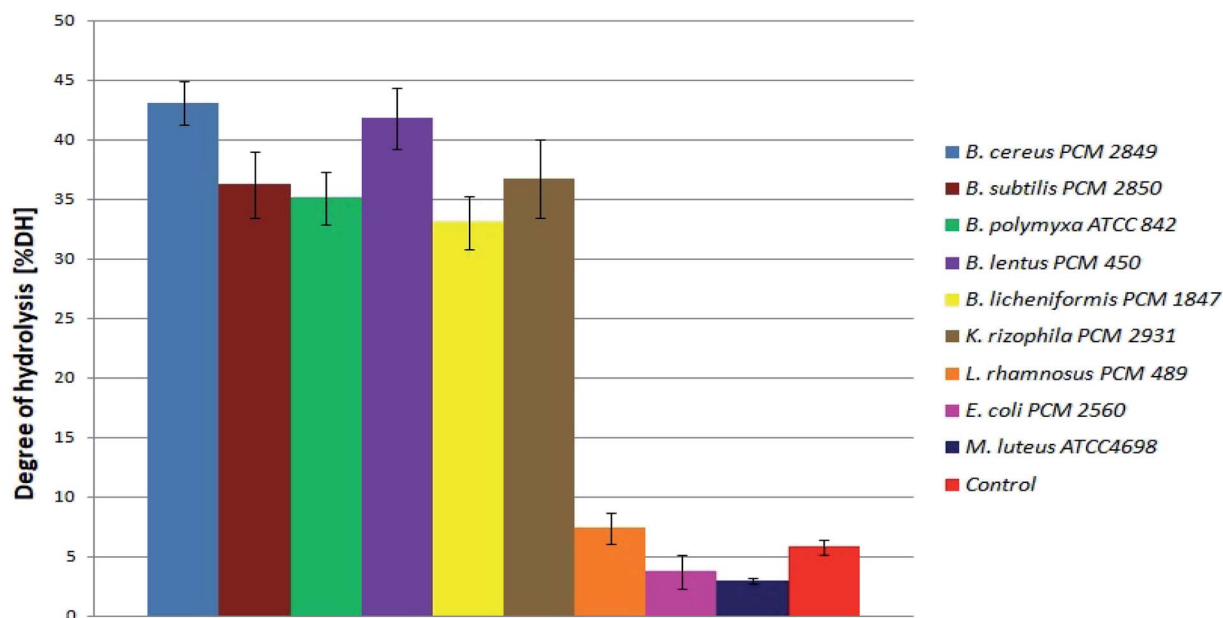


Fig. 4 Degree of BSG protein hydrolysis obtained as a result of hydrolysis conducted in bacterial cultures.

In another study, conducted by Kong *et al.*³⁰ wheat gluten was hydrolyzed with the aid of various proteolytic enzymes, in their optimal conditions. The process was conducted with the application of Alcalase, trypsin, Pancreatin, Neutrase and Protamex, in 30 minute reactions. The most efficient gluten hydrolysis occurred in the presence of Alcalase. In general, the degree of hydrolysis varied from 0% to 15.8%, depending on the enzyme applied.

Comparison of the results of Kotlar *et al.*,²⁸ Celus *et al.*²⁹ and Kong *et al.*³⁰ to our outcomes indicated predominance of the hydrolysis conducted in the culture conditions over the use of ready-made enzyme. The application of living bacterial cells, capable of producing a broad spectrum of proteolytic enzymes, resulted in a higher degree of peptide chain cleavage. It is related to the simultaneous action of several proteolytic enzymes, with different specificity, while commercial enzyme preparations usually do not provide it. Moreover, the process conducted with the aid of commercial proteases is limited, due to gradual inactivation of enzymes. Conditions under which the enzyme remains active are strictly defined; any deviation can cause enzyme inactivation. Therefore, the hydrolysis process is usually short and not so effective. In the culture conditions enzyme secretion is continuous, induced by the presence of nutrients in the medium. This makes the hydrolysis process in the culture conditions more stable and consequently more efficient.

3.3. Protein profile variations observed through size exclusion chromatography analysis

Similar profile and concentration of the BSG protein at the beginning of hydrolysis (0 h) in various bacterial cultures was observed using size exclusion chromatography. Profile similarity was exhibited by comparable position and area of peaks in the chromatograms of tested species (Fig. 5). As a result of bacterial hydrolysis, a significant amount of protein involved in

maintenance of the grain structure changed into a soluble form. It was demonstrated by a substantial increase of peak area on the chromatograms. Furthermore, considerable portion of released protein was hydrolyzed into small particles. However, the subsequent process proceeded after 24 h or in most cases after 48 h of hydrolysis. It was manifested by a decrease of peaks' area corresponding to high molecular weight proteins (peaks flowing out in the first phase of chromatographic separation, at 10–20 ml) at the extent of the increase of peaks corresponding to protein with a lower molecular weight (peaks flowing out of the column after 20 ml).

B. cereus PCM 2849 (Fig. 5A), and *B. subtilis* PCM 2850 (Fig. 5B) cultures were characterized by the presence of the common, dominant protein, corresponding to the peak at $V = 20.0$ ml. During the first 24 h or 48 h of hydrolysis, respectively for the listed species, protein concentration increased. It was monitored on chromatograms as an increasing peak area. Then a gradual peak decline, as a result of protein chain cutting, was observed. It was closely related to the formation of the hydrolysis products, which appeared as minor peaks at the end of chromatograms.

Due to hydrolysis conducted by *B. lentus* PCM 450 (Fig. 5D) and *B. polymyxa* ATCC 842 (Fig. 5C) enzymes, the presence of the same protein peak, appearing at $V = 20.0$ ml, was detected. However, in the culture of *B. lentus* PCM 450 the peak area increased during the first 24 h, according to the pattern observed for *B. cereus* PCM 2849, while in the culture of *B. polymyxa* ATCC 842 peak area was significantly lower and increased for 48 h. In addition, two associated peaks, appearing at 18 ml and 30 ml, were detected in both cultures. The maximal peak areas were noted after 72 h of hydrolysis and were apparently lower in the *B. polymyxa* ATCC 842 samples. *B. lentus* PCM 450 culture was additionally characterized by the presence of protein, appearing at $V = 26$ ml, while the analysis of *B.*



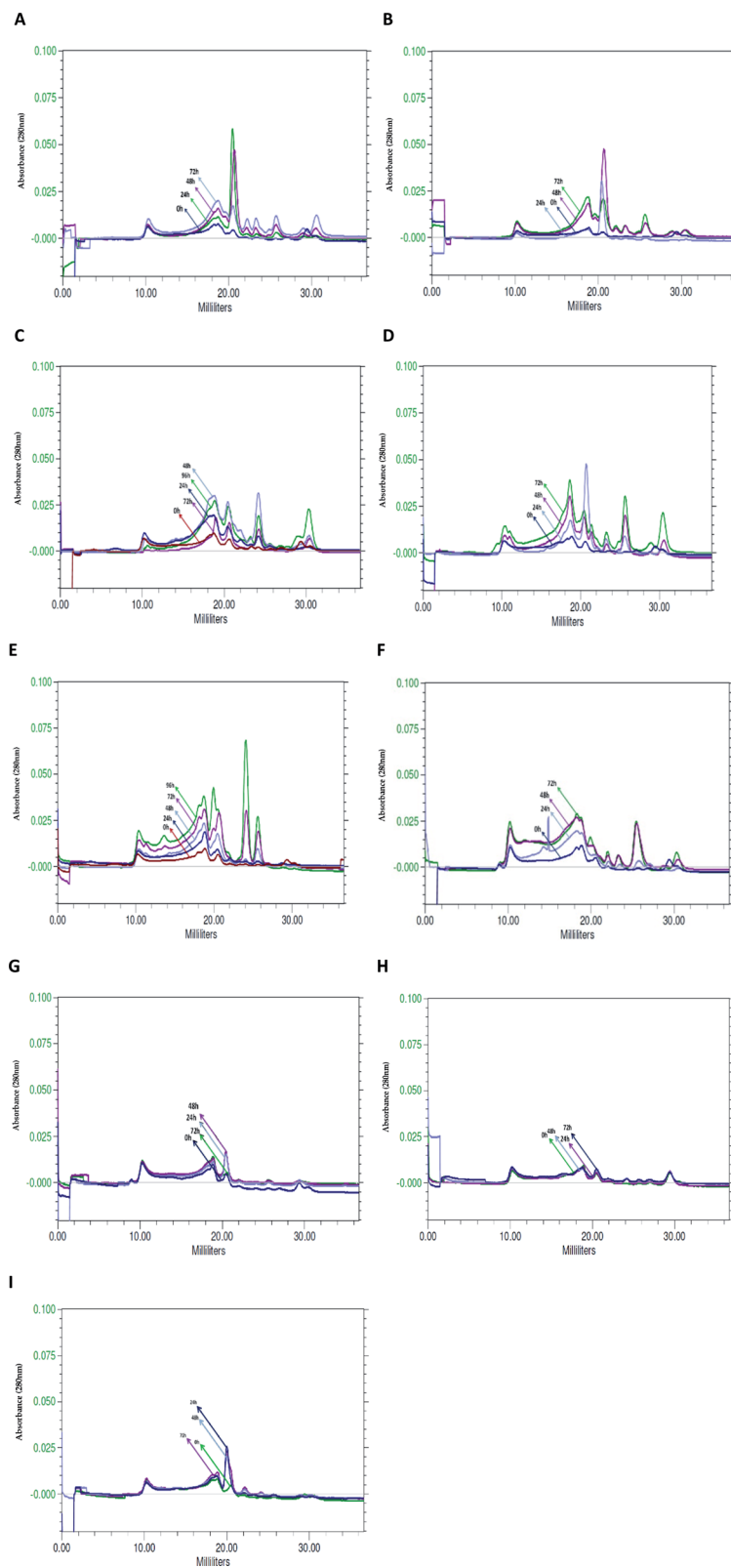


Fig. 5 Chromatograms, illustrating changes occurring in the BSG medium in the successive hours of hydrolysis conducted by: (A) *B. cereus* PCM 2849, (B) *B. subtilis* PCM 2850, (C) *B. polymyxa* ATCC 842, (D) *B. lentus* PCM 450, (E) *B. licheniformis* PCM 1847, (F) *K. rhizophila* PCM 2931, (G) *M. luteus* ATCC 4698, (H) *L. rhamnosus* PCM 489, (I) *E. coli* PCM 2560.

polymyxa ATCC 842 samples demonstrated the presence of a peak at $V = 24$ ml. Summarizing, in both cultures, a substantial increase of soluble protein concentration was observed, which indicated efficient proteolysis of BSG protein.

The activity of *B. licheniformis* PCM 1847 proteolytic enzymes is based primarily on the release of protein, involved in BSG structure, rather than the fragmentation of previously released protein into small particles. On the running chromatograms, it was demonstrated by the constant increase of all appearing peaks' area (Fig. 5E). *B. licheniformis* PCM 1847 culture was characterized by the presence of two proteins peak, corresponding to large peaks appearing at the values of 24 ml and 26 ml, which was unusual for other cultures.

The chromatogram from *K. rhizophila* PCM 2931 samples' analysis was considerably different from the others (Fig. 5F). A substantial increase of peaks' area were observed, until the end of proteolysis. Most of the peaks were stretched, relatively flat. The only exception was a peak at $V = 26$ ml and few minor peaks appearing at the end of the chromatogram.

Analysis of the chromatograms of *M. luteus* ATCC 4698, *L. rhamnosus* PCM 489 and *E. coli* PCM 2560 (Fig. 5G–I) indicated no progress in BSG proteolysis. It was evidenced by the lack of peaks on the running chromatograms. If any peaks appeared, their area was minimal and invariable. The lines corresponding to the next hour of cultures overlapped, which indicated no changes in the bacterial media. Compression of the chromatograms of *M. luteus* ATCC 4698, *L. rhamnosus* PCM 489 and *E. coli* PCM 2560 with chromatograms of the other tested bacteria showed the size exclusion chromatography as an appropriate tool, enabling tracking of hydrolysis. By the use of size exclusion chromatography, the changes occurring in the culture medium during protein proteolysis are possible to observe. By the increasing peak area, the solubilization of the protein into the culture medium could be detected. Moreover the profile of the peaks on the chromatograms revealed whether hydrolysis occurred and indicated the degree of polypeptide chain cleavage. The presence of multiple peaks, defined by the various retention times, indicated that the analyzed sample contained various components. Degree of variation in the composition of the unknown sample is significant information in the search for bioactive compounds.

3.4. Detection of bacterial proteases by gelatin zymography

The analysis of post-culture media by use of zymography demonstrated intensified production of proteases in each bacterial culture. At the same time no proteolytic zones were observed for the control sample (uninoculated medium) (data not published). Proteolytic enzyme production in the bacterial cultures was induced by the presence of BSG, the sole carbon and nitrogen source. Zymography allowed for the estimation of molecular weight of the proteolytic enzymes of each tested species. Analysis of *B. cereus* PCM 2849 post-cultured medium revealed the presence of high-molecular weight proteases with relative molecular mass of 100, 70 and 55 kDa (Fig. 6A), which was higher than that reported in the previous work of Vijayaraghavan *et al.*³¹ In the mentioned work, the secretion of *B. cereus* enzyme with molecular weight of 46 kDa was noted.

The profile of enzymes produced by *B. subtilis* PCM 2850 was similar to the one exhibited by *B. cereus* PCM 2849. Apart from those mentioned above (100, 70 and 55 kDa), two additional proteases were revealed (Fig. 6A). Those enzymes appeared as barely visible bands, characterized by molecular weight of 40 kDa and 30 kDa. However, their poor visibility on the zymography gel pointed to their low activity in the culture medium and hence low participation in the proteolysis process. Results of *B. subtilis* PCM 2850 protease zymography were partially confirmed in the research performed by Pillai *et al.*³² where zymogram profiling of the extracellular enzymes of *B. subtilis* P13 showed the appearance of proteases of 66 kDa, 43 kDa, 31 kDa and 20 kDa. Almost all listed enzymes (66 kDa, 43 kDa, 31 kDa) correspond well with those detected in our research. However, the protease with molecular mass 31 kDa was identified by the author as a dominant, major proteolytic factor, while in our research the impact of that enzyme was presumably minimal. Proteolytic enzymes of *B. subtilis* were the subject of the research of Balaji *et al.*³³ and Res *et al.*,³⁴ where proteases with molecular mass in a range between 64 and 69 kDa and equal to 50 kDa were detected. Due to the similar outline of *B. cereus* PCM 2849 and *B. subtilis* PCM 2850 proteases, much the same was the profile of the hydrolysis products, as presented in Fig. 5A and B.

Bacillus polymyxa is one of the most industrially significant facultative anaerobic bacteria due to producing a wide range of hydrolytic enzymes. *B. polymyxa* produced a great amount of extracellular protease with molecular masses of 20, 35, 50 and 210 kDa applied in detergent formulation, the food industry, leather processing, chemical synthesis and waste management.³⁵

As a result of detailed analysis of *B. polymyxa* ATCC 842 culture, a wide spectrum of secreted enzymes was confirmed in this research (Fig. 6A). Besides four dominant proteases with molecular weight 25 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 50 kDa, slight clear bands, corresponding to macromolecular proteases, appeared on the gel at 70 kDa, 100 kDa, 130 kDa and 210 kDa. Our results correspond well with the research conducted by Alvarez *et al.*³⁶ In the following research, at least four intense proteolytic halos with molecular masses of 20, 35, 50 and 210 kDa were noted. Summarizing the observations, *B. polymyxa* ATCC 842 produced the widest spectrum of proteases in comparison to the other species tested in this research. This consequently translated into the 2–4 times higher concentration of peptides in the post-culture fluid (Table 1).

B. lentus is another example of industrial organisms that produce a commercial protease preparations called Esperase (Novo Nordisk) and Purafact (Genencor Int.).³⁷ The analysis of *B. lentus* PCM 450 post-cultured medium confirmed high potential of this strain to produce proteolytic enzymes (Fig. 6A). On the zymogram gel, distinct bands, appearing in a range between 70–90 kDa and 40–50 kDa, were visualized. Significant dispersion of these bands may indicate the presence of a few enzymes slightly differing in molecular weight, visible as one, big single band. In addition, two more bands with molecular weight 130 kDa and 55 kDa were detected.

The profile of *B. licheniformis* PCM 1847 proteolytic enzymes was distinct from the other tested bacterial species. Two



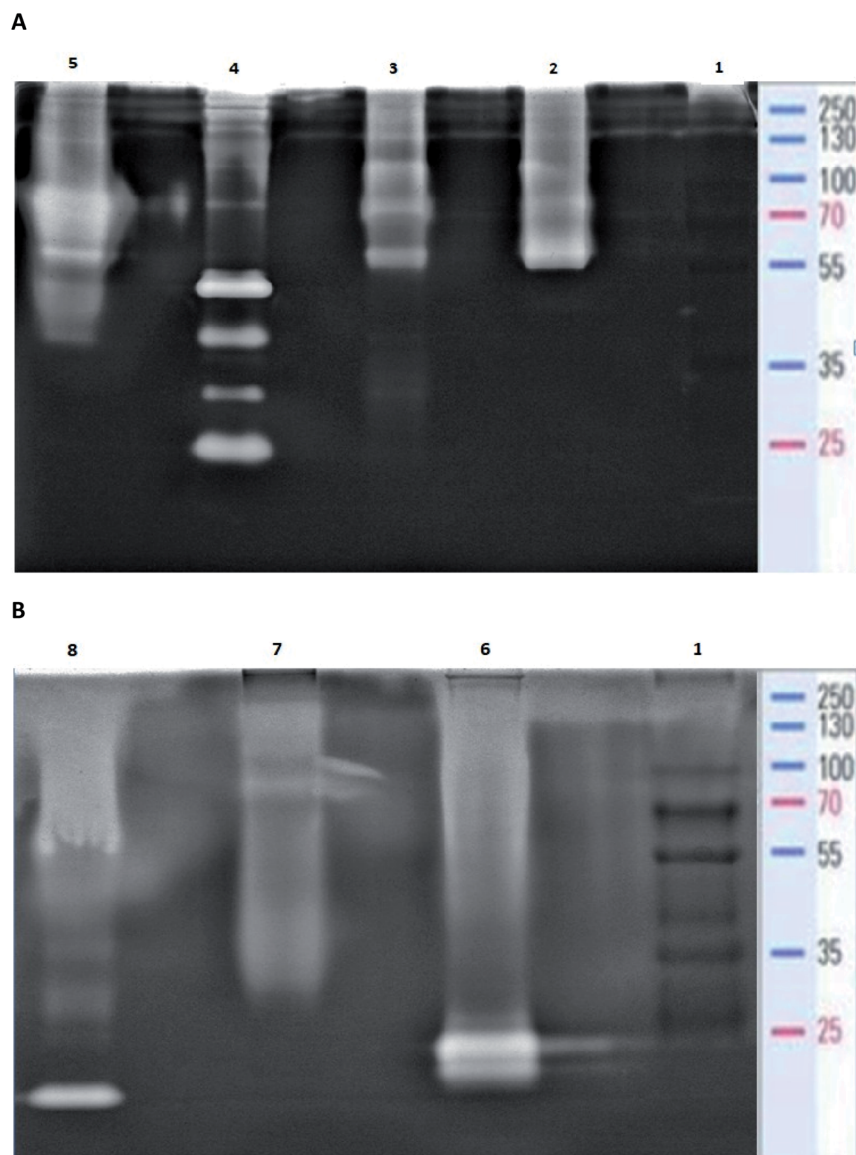


Fig. 6 Casein zymogram showing bands of protein cleavage on 10% SDS-PAGE. (A) (Lane 1) Molecular mass marker, (lane 2) *B. cereus* PCM 2849, (lane 3) *B. subtilis* PCM 2850, (lane 4) *B. polymyxa* ATCC 842, (lane 5) *B. lentus* PCM 450. (B) (Lane 1) Molecular mass marker, (lane 6) *B. licheniformis* PCM 1847, (lane 7) *K. rhizophila* PCM 2931, (lane 8) protease from *B. licheniformis* (Sigma Aldrich).

comparable, low molecular-mass bands were detected on the zymogram gel (Fig. 6B). Enzymes characterized by the mass of around 21 and 23 kDa were not produced by the other tested bacterial species and were in line with the results of analysis conducted for commercial protease from *B. licheniformis*. The molecular weight of the commercial enzyme, appearing on the gel as a single band, was determined to be around 21 kDa

(Fig. 6B). In the studies performed by Yilmaz *et al.*³⁸ the activity band of the *B. licheniformis* A10 protease was observed through the zymogram in the form of a clear casein hydrolysis zone with molecular weight 40.55 kDa, while in the other studies³⁹ four proteolytic enzymes, three (34, 28, and 18 kDa) from *B. licheniformis* DJ-2 and one (30 kDa) from *B. licheniformis* NJ-5, were detected under SDS-denaturing conditions.

Table 1 Peptide concentrations in the post-culture media

	<i>B. cereus</i> PCM 2849	<i>B. subtilis</i> PCM 2850	<i>B. polymyxa</i> ATCC 842	<i>B. lentus</i> PCM 450	<i>B. licheniformis</i> PCM 1847	<i>K. rhizophila</i> PCM 2931	Control
Peptide concentration [mg ml ⁻¹]	104 ± 001	128 ± 008	430 ± 007	180 ± 017	191 ± 001	196 ± 009	070 ± 002



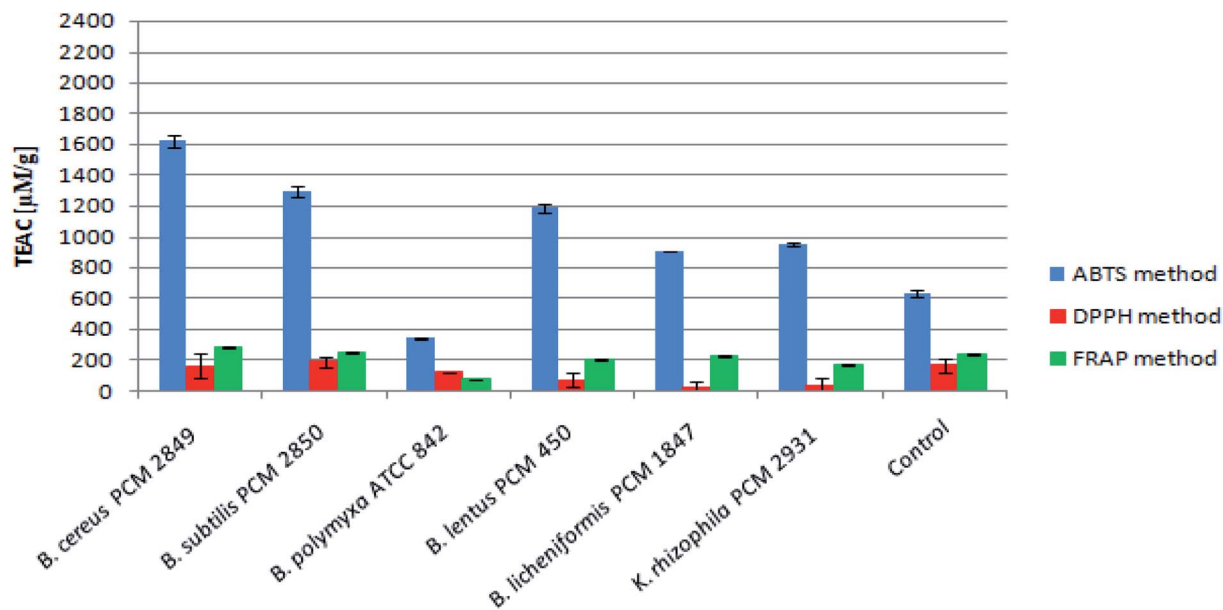


Fig. 7 Antioxidant activity of BSG protein hydrolysates measured by ABTS, DPPH and FRAP assays.

K. rhizophila PCM 2931, a keratinolytic bacterium previously isolated from living poultry, exhibits significant proteolytic properties. However, the molecular mass of proteases secreted by *K. rhizophila* PCM 2931 was difficult to estimate, which could be due to low concentration of the proteases in the post-cultured medium (Fig. 6B). In effect, a barely visible band appearing at around 81 kDa and dispersed zones of proteolytic activity at molecular weight in a range of 100–250 kDa and 45–30 were observed in this research. Profiles of *K. rhizophila* PCM 2931 enzymes were previously successfully examined by Łaba *et al.*,⁴⁰ where two activity bands were determined: a minor band of approximately 80 kDa and a dominant band between 130 and 180 kDa.

3.5. Antioxidant activity of brewers' spent grain protein hydrolysates

Assessment of peptide concentrations using the FC reagent showed significantly greater accumulation of peptides in the *B. polymyxa* ATCC 842 post-culture medium (4.30 mg ml⁻¹), compared to the rest of the bacterial species. Moreover, the culture of *B. licheniformis* PCM 1847 and *K. rhizophila* PCM 2931 was characterized by relatively high peptide content of about 2 mg ml⁻¹. Results of the peptide determination are summarized in Table 1.

The antioxidant activity of BSG protein hydrolysates was initially measured using the ABTS method. The method allowed for determination of the total antioxidant activity of multi-component samples. The principle of the ABTS assay is generation of the nitrogen-centered radical cation (ABTS^{•+}) through oxidation of ABTS by persulfate, which can be followed spectrophotometrically. Hydrolysates produced as a result of bacterial action displayed high antioxidant activity, expressed in terms of Trolox equivalent antioxidant capacity per gram of peptide (μM TEAC per g peptides) (Fig. 7).

B. cereus PCM 2849 hydrolysate exhibited higher antioxidant activity (1621.31 μM TEAC per g peptides) than the rest of samples, where the activity was in the range up 345.18 μM TEAC per g peptides (*B. polymyxa* ATCC 842) to 1291.97 μM TEAC per g peptides (*B. subtilis* PCM 2850). In comparison, the activity of the control sample totaled 634.29 μM TEAC per g peptides. Olanca *et al.*⁴¹ determined the total antioxidant activity of the wheat gluten and gluten hydrolysates. The activity of gluten hydrolysate (172.1 μM g⁻¹) evidently increased as a result of hydrolysis conducted by the enzymes of wheat bug. Hydrolysates characterized by 3% DH and 5% DH exhibited activity totaling 240 μM g⁻¹ and 228 μM g⁻¹ respectively. Mareček *et al.*⁴² assessed the correlation between antioxidant activity of barley/malt and the variety of barley, weather conditions, application of Zn²⁺ fertilizer. The average antioxidant activity determined using the ABTS method was in the range 2.1 to 2.5 μM g⁻¹ for barley and 2.7–3.0 μM g⁻¹ for malt.

The antioxidant activity of the BSG hydrolysates was additionally measured in terms of the ability to scavenge DPPH radicals. *B. subtilis* PCM 2850 post-culture samples exhibited the highest activity, reaching 188.89 μM g⁻¹ peptides (Fig. 7). At the same time, the antioxidant activity in the medium of the other bacteria did not exceed the value obtained for the control (167.10 μM TEAC per g peptides). It indicates rapid utilization of the antioxidant compounds, released during medium sterilization in some bacteria cultures and low rate of formation the new antioxidants. Mareček *et al.*⁴² determined the antioxidant capacity of barley and malt by the DPPH method. The antioxidant activity ranged from 1.2 to 1.7 μM g⁻¹ for barley and from 1.8–2.6 μM g⁻¹ for malt respectively. However, the results obtained with the DPPH method were considerably lower as compared to the ABTS method. It could be explained on the basis of the previous research of Arnao.⁴³ As the author mentioned, both ABTS and DPPH methods involve a radical



chromogen, which is depleted in the presence of an antioxidant. However, there are several important differences in the response of radicals to antioxidants and their manipulation. The DPPH radical is acquired directly without preparation (ready to dissolve), while the ABTS radical must be generated using enzymatic or chemical reactions. Another important reason is the differences in the solubility of ABTS and DPPH radicals. The ABTS radical can be solubilized in aqueous or in organic media, in which the antioxidant activity can be measured due to the hydrophilic and lipophilic nature of the antioxidants, while the DPPH radical must be dissolved in organic media, which is an important limitation when interpreting the role of hydrophilic antioxidants.

In this research, ABTS radicals were solubilized in aqueous solution, while DPPH radicals were solubilized in ethanol solution, which probably was the cause of the observed differences.

As the final stage of the research, the antioxidant activity of the BSG hydrolysates was measured using FRAP method. The mechanism of the performed assay is totally different from the ABTS and DPPH method. In this case, the colorless oxidized Fe^{3+} form of iron is converted into a reduced, blue-colored Fe^{2+} , due to the action of the electron donation from antioxidants.⁴⁴ However, despite a different mechanism, in this case the results were at the same level as those obtained by DPPH methods (Fig. 7). The highest activity levels were detected in the BSG hydrolysates of *B. cereus* PCM 2849 (284.08 μM TEAC per g peptides) and *B. subtilis* PCM 2850 (248.81 μM TEAC per g peptides) species, whereas in the research of Connolly *et al.*¹² the antioxidant activity of BSG hydrolysates was in the range from 183.31 to 295.76 μM TEAC per g protein depending on protease combinations. In addition, similar results were obtained by Vieira *et al.*,¹¹ in a study aimed at preparing BSG hydrolysates by use of Alcalase, Neutrase and brewers' spent yeast protease. The reported antioxidant activity was in the range of 247.71–403.53 μM TEAC per g per dw.

4. Conclusions

BSG was efficiently hydrolyzed in the bacterial cultures and the highest activity, expressed as the ability to cleave the protein chain, was observed in relation to the *Bacillus* genus. This approach ensured the optimal conditions for the enzymes' secretion and action. It was confirmed by means of gelatin zymography, where the full profile of bacterial enzymes was visualized. BSG protein hydrolysates demonstrated high antioxidant activity.

The results of this research indicated a number of possibilities of using BSG hydrolysates in various scientific fields. Our future research will be focused on the isolation of bioactive peptides from the obtained hydrolysates. Moreover, the investigation of the properties of isolated peptides will be a priority task. According to Hartmann and Meisel,⁴⁵ many food-derived peptides exhibit strong biological activity including antioxidant, immunomodulatory, and blood pressure-lowering (ACE inhibitory) properties. The BSG protein hydrolysate, derived from a brewery by-product, can be a low cost and promising peptide source.

Moreover, there are many other possible applications of the obtained BSG protein hydrolysates. In the research conducted by Colla *et al.*⁴⁶ plant-derived protein hydrolysate was applied as a hormone-like active, nitrogen uptake and growth stimulating agent for corn (*Zea mays* L.), tomato and dwarf pea (*Pisum sativum* L.). As described by Pasupuleti *et al.*,⁴⁷ protein hydrolysates are widely used in the manufacture of probiotics, starter cultures and fermented products. In addition, the use of protein hydrolysates, as an important nutrient for growth and maintenance, has been increasing in animal nutrition.

Finally, BSG protein hydrolysate can be applied in the cosmetics industry. According to Burnett *et al.*,⁴⁸ wheat protein and wheat gluten hydrolysates function as skin and hair conditioning agents in personal care products. The Cosmetic Ingredient Review Expert Panel previously assessed the safety of animal and plant-derived amino acids, hydrolyzed corn and wheat protein to qualify them as safe for use in cosmetic products. Hydrolysates of BSG obtained in this work, containing both wheat and barley protein decomposition products, could be a more economically advantageous option for the cosmetic industry.

In conclusion, this article presented a new biological method to effectively hydrolyze protein from BSG using bacteria. The produced protein hydrolysates offer an alternative nitrogen and antioxidant source to synthetics.

Funding

This work was supported by the National Science Centre, Poland, project 2019/03/X/NZ9/00052. The Article Processing Charge (APC) was financed under the Leading Research Groups support project from the subsidy increased for the period 2020–2025 in the amount of 2% of the subsidy referred to Art. 387 (3) of the Law of 20 July 2018 on Higher Education and Science, obtained in 2019.

Conflicts of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Prof. Joanna Kawa-Rygielska (Wroclaw University of Environmental and Life Sciences, Poland) for generously providing brewers' spent grain.

References

- 1 W. Kunze, *Technology Brewing and Malting*, VLB Berlin, 2004, pp. 18–152.
- 2 S. I. Mussatto, G. Dragone and I. C. Roberto, *J. Cereal Sci.*, 2006, 1–14.
- 3 P. Forssell, H. Kontkanen, H. A. Schols, S. Hinz, V. G. H. Eijssink, J. Treimo, J. A. Robertson, K. W. Waldron, C. B. Faulds and J. Buchert, *J. Inst. Brew.*, 2008, **114**, 306–314.



- 4 C. Wang, Z. Tian, L. Chen, F. Temelli, H. Liu and Y. Wang, *Cereal Chem.*, 2010, **87**, 597–606.
- 5 R. Linko, A. Lapvetelainen, P. Laakso and H. Kallio, *Cereal Chem.*, 1989, **66**, 478–482.
- 6 M. X. Zhou, in *Advanced Topics in Science and Technology in China*, 2010, pp. 1–17.
- 7 K. Mastanjević, B. Šarkanj, R. Krska, M. Sulyok, B. Warth, K. Mastanjević, B. Šantek and V. Krstanović, *Food Chem.*, 2018, **254**, 115–121.
- 8 A. Faltermaier, D. Waters, T. Becker, E. Arendt and M. Gastl, *J. Inst. Brew.*, 2014, **120**, 1–15.
- 9 F. Battais, F. Pineau, Y. Popineau, C. Aparicio, G. Kanny, L. Guerin, D. A. Moneret-Vautrin and S. Denery-Papini, *Clin. Exp. Allergy*, 2003, **33**, 962–970.
- 10 R. D'Ovidio and S. Masci, *J. Cereal Sci.*, 2004, **39**, 321–339.
- 11 E. F. Vieira, D. D. da Silva, H. Carmo and I. M. P. L. V. O. Ferreira, *Food Chem.*, 2017, **228**, 602–609.
- 12 A. Connolly, M. Cermeño, D. Crowley, Y. O'Callaghan, N. M. O'Brien and R. J. FitzGerald, *Food Res. Int.*, 2019, **121**, 524–532.
- 13 E. Vieira, J. Teixeira and I. M. P. L. V. O. Ferreira, *Eur. Food Res. Technol.*, 2016, **242**, 1975–1984.
- 14 A. Connolly, M. B. O'Keefe, C. O. Piggott, A. B. Nongonierma and R. J. FitzGerald, *Food Chem.*, 2015, **176**, 64–71.
- 15 J. Treimo, B. Westereng, S. J. Horn, P. Forssell, J. A. Robertson, C. B. Faulds, K. W. Waldron, J. Buchert and V. G. H. Eijssink, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 3316–3324.
- 16 C. E. Kotlar, M. Belagardi and S. I. Roura, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2011, **58**, 464–475.
- 17 W. Łaba, M. Piegza and J. Kawa-Rygielska, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2017, **92**, 1389–1396.
- 18 P. Minkiewicz, A. Iwaniak and M. Darewicz, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 5978.
- 19 S. W. Sun, Y. C. Lin, Y. M. Weng and M. J. Chen, *J. Food Compos. Anal.*, 2006, **19**, 112–117.
- 20 F. Shahidi, U. D. Chavan, A. K. Bal and D. B. McKenzie, *Food Chem.*, 1999, **64**, 39–44.
- 21 H. Zhang, L. Xu, D. Xiao, J. Xie, H. Zeng, Z. Wang, X. Zhang, Y. Niu, Z. Shen, J. Shen, X. Wu and E. Li, *J. Clin. Pathol.*, 2007, **60**, 555–561.
- 22 C. Raveschot, B. Cudennec, B. Deracinois, M. Frémont, M. Vaeremans, J. Dugersuren, S. Demberel, D. Drider, P. Dhulster, F. Coutte and C. Flahaut, *Food Chem.*, 2020, **304**, 125415.
- 23 R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, *Free Radicals Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231–1237.
- 24 B. J. Xu and S. K. C. Chang, *J. Food Sci.*, 2008, **73**, H19–H27.
- 25 I. F. F. Benzie and J. J. Strain, *Anal. Biochem.*, 1996, **239**, 70–76.
- 26 M. Darewicz, J. Borawska, P. Minkiewicz, A. Iwaniak and P. Starowicz, *Food. Sci. Technol. Qual.*, 2015, **22**, 26–41.
- 27 T. Paul, S. K. Halder, A. Das, S. Bera, C. Maity, A. Mandal, P. S. Das, P. K. D. Mohapatra, B. R. Pati and K. C. Mondal, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2013, **2**, 50–57.
- 28 C. E. Kotlar, A. G. Ponce and S. I. Roura, *LWT*, 2013, **50**, 378–385.
- 29 I. Celus, K. Brijs and J. A. Delcour, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 8703–8710.
- 30 X. Kong, H. Zhou and H. Qian, *Food Chem.*, 2007, **102**, 759–763.
- 31 P. Vijayaraghavan, S. Lazarus and S. G. P. Vincent, *Saudi J. Biol. Sci.*, 2014, **21**, 27–34.
- 32 P. Pillai, S. Mandge and G. Archana, *Process Biochem.*, 2011, **46**, 1110–1117.
- 33 S. Balaji, M. Senthil Kumar, R. Karthikeyan, R. Kumar, S. Kirubanandan, R. Sridhar and P. K. Sehgal, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **24**, 2741–2745.
- 34 J. M. B. Res, M. Padmapriya and B. C. Williams, *J. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 2012, **2**, 612–618.
- 35 S. Lal and S. Tabacchioni, *Indian J. Microbiol.*, 2009, **49**, 2–10.
- 36 V. M. Alvarez, I. Von Der Weid, L. Seldin and A. L. S. Santos, *Let. Appl. Microbiol.*, 2006, **43**, 625–630.
- 37 R. Gupta, Q. Beg and P. Lorenz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 15–32.
- 38 B. Yilmaz, M. O. Baltaci, M. Sisecioglu and A. Adiguzel, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2016, **31**, 1241–1247.
- 39 N. S. Choi, J. H. Choi, B. H. Kim, Y. J. Han, J. S. Kim, S. G. Lee and J. J. Song, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2234–2237.
- 40 W. Łaba, B. Żarowska, D. Chorążyk, A. Pudło, M. Piegza, A. Kancelista and W. Kopeć, *AMB Express*, 2018, **8**, 9.
- 41 B. Olanca and D. S. Özyay, *Cereal Chem.*, 2010, **87**, 518–523.
- 42 V. Mareček, A. Mikyška, D. Hampel, P. Čejka, J. Neuwirthová, A. Malachová and R. Cerkal, *J. Cereal Sci.*, 2017, **73**, 40–45.
- 43 M. B. Arnao, *Trends Food Sci. Technol.*, 2000, 419–421.
- 44 K. Schlesier, M. Harwat, V. Böhm and R. Bitsch, *Free Radical Res.*, 2002, **36**, 177–187.
- 45 R. Hartmann and H. Meisel, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, 163–169.
- 46 G. Colla, Y. Roupheal, R. Canaguier, E. Svecova and M. Cardarelli, *Front. Plant Sci.*, 2014, **5**, 448.
- 47 V. K. Pasupuleti, C. Holmes and A. L. Demain, in *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, 2010, pp. 1–9.
- 48 C. Burnett, W. F. Bergfeld, D. V. Belsito, R. A. Hill, C. D. Klaassen, D. C. Liebler, J. G. Marks, R. C. Shank, T. J. Slaga, P. W. Snyder, F. A. Andersen and B. Heldreth, *Int. J. Toxicol.*, 2018, **37**, 55S–66S.



Supplementary Information

Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain

Dominika Cieurko^{1,*}, Wojciech Łaba¹, Barbara Żarowska¹ and Tomasz Janek¹

¹ Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Department of Biotechnology and Food Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, J. Chełmońskiego 37, 51-630 Wrocław; Poland; wojciech.laba@upwr.edu.pl (W.Ł.); barbara.zarowska@upwr.edu.pl (B.Ż.); tomasz.janek@upwr.edu.pl (T.J.)

* Correspondence: dominika.cieurko@upwr.edu.pl; Tel.: +48-71-320-7723 (D.C.)

Table S1. List of bioactive peptides obtained from barley proteins as a result of *in silico* analysis.

Biological activity	Peptide sequence	Peptide length	Peptide location	Peptide source	Enzyme name	Molecular weight
Antioxidative peptide	TY	2	385-386	globulin	subtilisin	282.3
	VY		107-108			B hordein
			209-210			
			936-937	D hordein		
	PQIQEQF	7	194-200	B hordein	subtilisin, oligopeptidase F	857.9
			921-927	D hordein	subtilisin, oligopeptidase F	
	IR	2	205-206	B hordein	coccolysin, thermolysin	
			932-933	D hordein	coccolysin,	
	LK		271-272	B hordein	coccolysin, thermolysin	259.3
			998-999	D hordein	coccolysin	
			266-267	glutelin	coccolysin, thermolysin	
			558-559			
	697-698	D hordein	thermolysin			
	LPM	3	276-278	gamma 3 hordein	coccolysin, thermolysin	
	LKP		269-271	glutelin	oligopeptidase B	356.5
	LLR		234-236			
EL	2	29-30	gamma 3 hordein	proteinase K, subtilisin , oligopeptidase F	260.3	

	KP		270-271	glutelin	proteinase K	243.3
Glucose uptake stimulating peptide	VL	2	184-185	B hordein	subtilisin	230.3
			257-258	gamma 3 hordein	subtilisin, oligopeptidase F	
			911-912	D hordein	subtilisin	
			6-7		subtilisin, oligopeptidase F	
			278-279	gamma 1 hordein	oligopeptidase F	
			255-256		subtilisin	
			8-9	C hordein	subtilisin, oligopeptidase F	
			228-229	gamma 2 hordein	oligopeptidase F	
	IL	2	147-148	B hordein	subtilisin	244.3
			874-875	D hordein		
			535-536	glutelin		
	LV	2	9-10	B hordein	coccolysin	230.3
			5-6	D hordein		
			15-16			
			736-737			
			271-272	gamma 3 hordein		
			106-107	glutelin		
IV	185-186	coccolysin, proteinase P1				

			208-209	B hordein	coccolysin	244.3
			12-13	D hordein		
			935-936			
			124-125	C hordein	proteinase P1	
			237-238	C hordein		
			495-496	glutelin		
Immunostimulating peptide	YG	2	139-140	glutelin	proteinase P1	238.2
Inhibitor of Prolyl Oligopeptidase	VPL	3	163-165	gamma 3 hordein	subtilisin	327.4
CaMPDE inhibitor (Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor)	EF	2	517-518	glutelin	proteinase K	294.3
	KF		267-268		proteinase K, subtilisin, proteinase P1, oligopeptidase F	293.4
			559-560		proteinase K, subtilisin, oligopeptidase F	
			572-573		proteinase K, proteinase P1	
	IR		205-206	B hordein	coccolysin, thermolysin	287.3
			932-933	D hordein	coccolysin,	
Renin inhibitor	IR	2	205-206	B hordein	coccolysin, thermolysin	287.3
			932-933	D hordein	coccolysin,	
	EF		517-518	glutelin	proteinase K	294.3

	KF		572-573		proteinase P1	293.4
			267-268		proteinase K, subtilisin, proteinase P1, oligopeptidase F	
			559-560		proteinase K, subtilisin, oligopeptidase F	
			572-573		proteinase K	
Stimulating vasoactive substance release	SE	2	281-282	C hordein	V-8-protease, proteinase P1	234.2
			382-383	glutelin	proteinase P1	
	VPL	3	163-165	gamma 3 hordein	subtilisin	327.4
	EE	2	279-280	C hordein	proteinase P1	276.2
301-302			glutelin			
Coeliac toxic peptide	QQQP	4	60-63	gamma 3 hordein	proteinase K	499.5
			66-69			
			102-105			
			127-130			
			249-252			
Anxiolytic peptide (neuropeptide)	YL	2	162-163	gamma 1 hordein	oligopeptidase F	294.3
			110-111	gamma 2 hordein		

ACE inhibitor (angiotensin converting enzyme inhibitor)	VF	2	190-191	glutelin	subtilisin	264.3	
			483-484				
			568-569				
			156-157	B hordein			
			261-262				
			9-10	globulin			
	5-6						
	IF		6-7	B hordein	subtilisin, oligopeptidase F	287.3	
			212-213		subtilisin		
			306-307		subtilisin, thermolysin		
	304-305		gamma 1 hordein				
	252-253		gamma 2 hordein				
	58-59		globulin				
	VG		GL	105-106	B hordein	subtilisin, oligopeptidase F, proteinase K	188.2
				27-28	gamma 3 hordein		
	IL		LQP	535-536	glutelin	subtilisin, coccolysin, thermolysin	244.3
				147-148	B hordein		
	LQQ		LQP	263-265	gamma 2 hordein	coccolysin	356.4
81-83							
131-132		gamma 1 hordein		coccolysin, thermolysin			
159-161		C hordein					
LQQ	237-239	gamma 3 hordein	387.4				

			148-150	B hordein		
	FG	2	113-114	gamma 3 hordein	proteinase P1	222.2
			293-294			
			104-105	B hordein	coccolysin, proteinase P1, thermolysin	
			300-301			
	134-135		C hordein			coccolysin, thermolysin
	135-136					
	266-267					
	162-162					
	167-168					
	206-207			gamma 1 hordein	coccolysin, coccolysin, thermolysin	
	156-157		gamma 2 hordein			
	50-51		glutelin			
	AH		269-270	B hordein	coccolysin, proteinase P1, thermolysin	226.2
	GV		226-227	B hordein	proteinase P1	174.2
			307-308		proteinase K, proteinase P1	
			11-12		gamma 3 hordein	
			238-239		proteinase P1	
261-262			gamma 1 hordein		proteinase P1, proteinase K	
305-306						

			59-60	globulin	proteinase K	
			22-23		proteinase P1	
			59-60			
			567-568	glutelin	proteinase K, proteinase P1	
			82-83		proteinase K	
	AF		268-269	B hordein	proteinase P1	236.3
	MF			C hordein		296.4
	VP		176-177	B hordein	thermolysin	214.3
	GI		292-293	gamma 3 hordein		
			163-164	B hordein	proteinase K	188.2
		301-302	glutelin			
	AI	11-12	B hordein	proteinase K	202.2	
		205-206	gamma 3 hordein			
		187-188	glutelin			
	PL	92-93	C hordein	subtilisin, oligopeptidase F	228.3	
		174-175				
		213-214				
		247-248				
		270-271				
		293-294				
522-523		D hordein				

	TF		454-455	glutelin	subtilisin	266.3
			6-7	C hordein	subtilisin, oligopeptidase F, proteinase K	
			53-54	gamma 2 hordein	subtilisin,	
			105-106	gamma 1 hordein	subtilisin, proteinase P1, oligopeptidase F, proteinase K	
			176-177	D hordein	subtilisin,	
			75-76		proteinase P1	
	FP		66-67	C hordein	coccolysin, thermolysin	262.3
			91-92			
			173-174			
			212-213			
			246-247			
			269-270			
			292-293			
			354-355			
	LG		10-11	gamma 3 hordein	thermolysin	188.2
			239-240	glutelin	coccolysin, thermolysin	
			536-537			
			566-567			
	YA		342-343	C hordein	proteinase P1	252.2
	FR		315-316			321.4

	IG		188-189			188.2	
			81-82	glutelin	proteinase P1, thermolysin		
	SY			42-43	C hordein	proteinase P1	268.3
				171-172	D hordein	proteinase P1, proteinase K	
				194-195		proteinase P1	
				337-338		proteinase P1, proteinase K	
				125-126	gamma 1 hordein	proteinase P1	
				185-186		proteinase P1, proteinase K	
	KY			514-515	glutelin	subtilisin,	309.3
				320-321	C hordein	proteinase K	
	TP			61-62			
	GS			140-141	globulin	subtilisin	162.1
				294-295	gamma 3 hordein		
				495-496	D hordein		
				683-684			
	YP			252-253	D hordein	coccolysin, thermolysin	278.3
				380-381			
	AV			10-11	D hordein	coccolysin, proteinase P1, proteinase K	188.2
				8-9		globulin	
	GY			292-293	D hordein	proteinase P1	238.2

			320-321						
			455-456						
	AA		706-707				160.2		
	GE		656-657					204.2	
	SG						26-27	gamma 3 hordein	162.1
							284-285	D hordein	
							302-303		
							347-348		
							449-450		
	ST						362-362	206.2	
		474-475							
	YE		53-54	glutelin	310.3				
			100-101						
	GHG	3	402-404	D hordein	269.2				
	AQLLAAQLPAMCR- inhibitor z glutenu	13	702-714		oligopeptidase B	1417.5			
	YH	2	686-687		thermolysin	318.3			
	KW		133-134		proteinase K	332.4			
	HP		618-619			352.3			
	AP		301-302		gamma 1 hordein	coccolysin, thermolysin	186.2		
			249-250		gamma 2 hordein	coccolysin,			
183-184		glutelin	coccolysin, thermolysin						
570-571	proteinase K								
GG		136-137	globulin		proteinase P1	132.1			

	SF		311-312	gamma 1 hordein	proteinase P1, oligopeptidase F, proteinase K	252.3
			118-119			
			119-120	glutelin		
			578-579			
			10-11			
	171-172	gamma 3 hordein				
	YL		162-163	gamma 1 hordein	oligopeptidase F	294.3
	AEL	3	223-225	globulin	proteinase K	331.4
	PQR		177-179		oligopeptidase B	399.4
	VRP		60-62		thermolysin	370.4
	LNP		115-117	gamma 2 hordein	coccolysin	342.4
	LGV		10-12	gamma 3 hordein		287.4
			566-568	glutelin		
	LN		2	146-147	gamma 3 hordein	coccolysin, thermolysin
		434-435		glutelin		
	KR	186-187		gamma 3 hordein	proteinase P1	302.4
	GM	243-244				206.3
		28-29		glutelin	proteinase K	271.3
	RP	174-175		gamma 3 hordein		
		61-62		globulin		
QP	41-42	gamma 3 hordein		243.3		
	100-101					
HG		157-158	globulin	subtilisin	212.2	

	AR		227-228		coccolysin, thermolysin	245.3	
	FQ		63-64			293.3	
	YG		139-140			238.2	
	EV		133-134]			246.3	
	VY		189-190			280.3	
	PRY	107-108	434.5				
	AGP	3		98-100	glutelin	coccolysin, thermolysin	243.3
	LKP		366-368	thermolysin			356.5
	GQP		269-271	proteinase K			300.3
	AQL		307-309	subtilisin			252.3
	AY		24-26				222.2
	GF	2	547-548		subtilisin, proteinase P1, oligopeptidase F, proteinase K	293.4	
	KF		114-115				subtilisin, oligopeptidase F, proteinase K
			229-230				
			267-268			146.1	
	AG		559-560				coccolysin, thermolysin
		572-573					
				63-64			
				171-172			

	IE		516-517				260.3
			90-91				
	IA		167-168				
			544-545				
	GA		537-538]				
			321-322				
	TG		336-337				
			232-233				
	VR		233-234				
	RL		99-100				
			445-446				
	RK		270-271				
		proteinase P1	202.2				
			146.1				
		thermolysin	176.2				
			273.3				
		proteinase K	287.3				
			337.4				
			268.3				
			243.3				

Table S2. List of bioactive peptides obtained from wheat proteins as a result of *in silico* analysis.

Biological activity	Peptide sequence	Peptide length	Peptide location	Peptide source	Enzyme name	Molecular weight
Antioxidative peptide	TY	2	180-181	β -Gliadin	subtilisin	282.3
	VY		256-257	α -Gliadin		280.3
			305-306	β -Gliadin		
	LQPGQGQQG	9	758-766	Glutenin	coccolysin, thermolysin	912.0
	IR	2	242-243	γ -Gliadin	proteinase P1	287.3
	LK		832-833	Glutenin	thermolysin	259.3
		43-44				
	LWQ	3	201-203	α -Gliadin	coccolysin, thermolysin	445.5
	LWS		152-154	γ -Gliadin		404.5
	WYY		662-664	Glutenin	proteinase P1	530.6
	SY Y		124-126			431.4
	GYY	3	155-157	Glutenin	proteinase P1	401.4
			176-178			
			301-303			
			375-377			
390-392						
437-439						
452-454						
514-516						

			541-543			
			695-697			
			710-712			
			766-768			
			795-797			
			816-818			
	AH	2	169-170	β -gliadin	coccolysin, thermolysin	226.2
	AY		178-179	α -Gliadin,	proteinase K	252.2
	KP		2-3	γ -Gliadin		243.3
	PW		338-339	ω -Gliadin	subtilisin	301.3
Glucose uptake stimulating peptide	VL	2	246-247	α -Gliadin	subtilisin	230.3
				γ -Gliadin	subtilisin, oligopeptidase F	
			175-176	β -Gliadin	subtilisin	
			162-163		subtilisin,	
			49-50	ω -Gliadin	oligopeptidase F	
			6-7	Glutenin		
	IL		6-7	α -Gliadin,	oligopeptidase F	244.3
β -Gliadin						

	LV		9-10	γ -Gliadin	subtilisin	230.3	
			245-246		Glutenin		coccolysin
			5-6	proteinase P1			
			15-16				coccolysin
	IV		79-80	γ -Gliadin			
			272-273	α -Gliadin,	proteinase P1		
			12-13	ω -Gliadin			
			57-58		coccolysin		
	II		14-15	subtilisin			244.3
			320-321		proteinase P1		
Inhibitor of Prolyl Oligopeptidase-antiamnestic activity	VPL	3	209-211	α -Gliadin,	subtilisin	327.4	
				β -Gliadin			
				γ -Gliadin			subtilisin, oligopeptidase F
CaMPDE inhibitor (Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor)	KF	2	291-292	ω -Gliadin	proteinase P1,	293.4	
	IR		242-243	γ -Gliadin		287.3	
Renin inhibitor	IR	2	242-243			proteinase P1	287.3

	KF		291-292			293.4
Stimulating vasoactive substance release	SE	2	26-27	Glutenin	proteinase P1	234.2
	VPL	3	209-211	α -Gliadin	subtilisin	327.4
				γ -Gliadin	subtilisin, oligopeptidase F	
39-41	β -Gliadin	subtilisin				
Antiinflammatory peptide	IPP	3	300-302	α -Gliadin, β -Gliadin	coccolysin, thermolysin	325.4
			186-188	ω -Gliadin		
			251-253			
			259-261			
	275-277					
YPP		258-260	γ -Gliadin	thermolysin	311.4	
Alpha-glucosidase inhibitor	YP	2	251-252	α -Gliadin, β -Gliadin	coccolysin, thermolysin	278.3
Pain regulation - analgesic effect	YR	2	280-281	γ -Gliadin	coccolysin, proteinase P1, thermolysin	337.4
Opioid delta receptor ligand	GYG	3	155-157	Glutenin	proteinase P1,	401.4
			176-178			
			301-303			
			375-377			

			390-392			
			437-439			
			452-454			
			514-516			
			541-543			
			695-697			
			710-712			
			766-768			
			795-797			
816-818						
Celiac toxic peptides	QQPY	4	74-77	α-Gliadin	subtilisin	534.5
	YPQPQ	5	90-94		thermolysin	631.7
			97-101	γ-Gliadin	proteinase K	499.5
	QQQP	4	15-18			
			116-119			
ACE inhibitor (angiotensin converting enzyme inhibitor)	VY	2	298-299	α-Gliadin	subtilisin	280.3
			256-257	α-Gliadin, γ-Gliadin		
			305-306	β-Gliadin		
	PL		252-253	α-Gliadin		228.3
			443-444	Glutenin		
			547-548			
			701-702			
			330-331	ω-Gliadin		
KY	9-10	subtilisin,	309.3			

			110-111	β-Gliadin	proteinase K			
					proteinase P1, proteinase K			
	VP			39-40		thermolysin	214.3	
				20-21		α-Gliadin		subtilisin, thermolysin
				23-24				
				42-43	γ-Gliadin	thermolysin		
				209-210				
	GS			180-181	α-Gliadin	subtilisin	162.1	
	AI			11-12		subtilisin, proteinase K	202.2	
	VR			18-19	β-Gliadin	subtilisin, thermolysin	273.3	
				21-22	α-Gliadin			
	IL			6-7	α-Gliadin , β-Gliadin	subtilisin, oligopeptidase F	244.3	
	YP			251-252	α-Gliadin	coccolysin, thermolysin	278.3	
	AP			307-308			coccolysin, thermolysin, proteinase K	186.2
				267-268	α-Gliadin, γ-Gliadin	coccolysin, thermolysin,		
				148-149	ω-Gliadin	proteinase K		
				163-164				
				231-232				
				278-279				
	316-317	β-Gliadin	coccolysin, thermolysin					

	FG		309-310	α -Gliadin,		222.2	
			318-319	β -Gliadin			
	LQ		78-79	α -Gliadin,		259.3	
			702-703	Glutenin			
			75-76	β -Gliadin			
			193-194				
	AH		169-170	226.2			
	FR		110-111	α -Gliadin,		proteinase P1	321.4
			265-266	γ -Gliadin		coccolysin, thermolysin	
	SF		113-114			α -Gliadin,	proteinase P1,
			243-244	proteinase P1,			
			257-258	proteinase K			
			97-98	β -Gliadin		proteinase P1	
			250-251			proteinase P1,	
			264-265				proteinase K
	QP		29-30	α -Gliadin,		proteinase K	243.2
			65-66				
			67-68				
			81-82				
			85-86				
92-93							
99-100							
26-27		β -Gliadin					

			62-63		
			64-65		
			78-79		
			82-83		
			84-85		
			94-95		
			113-114		
			266-267		
			279-280		
			223-224		
			549-550	Glutenin	
			759-760		
			786-787		
			106-107	α -Gliadin, γ -Gliadin	
			108-109	α -Gliadin,	
			259-260		
			272-273		
			21-22	γ -Gliadin	
			36-37		
			51-52		
			61-62		
			232-233		
			332-333	ω -Gliadin	
			340-341		
			356-357		

	AV		10-11	Glutenin	proteinase P1, proteinase K	188.2
	GI		20-21	α -Gliadin,	proteinase K	
			310-311		proteinase P1	
			222-223	γ -Gliadin		
			319-320	β -Gliadin		
			105-106	Glutenin	proteinase K	
	RP		111-112	α -Gliadin,		271.3
	AY		178-179		252.2	
	QG		203-204	γ -Gliadin	subtilisin	203.2
	TF		264-265		proteinase P1	266.3
			40-41			
			17-18	ω -Gliadin	proteinase K	
	TP		120-121			216.2
	AG		274-275	γ -Gliadin	coccolysin, thermolysin	146.1
	IR		242-243		proteinase P1	287.3
	IF		33-34			
	GV		204-205			
	EV		240-241			
	YV		257-258		proteinase P1	280.3
	HY		19-20		ω -Gliadin	subtilisin, proteinase K
IP	132-133	coccolysin, thermolysin	228.3			

			175-176				
			106-107	Glutenin			
	YK		8-9	ω-Gliadin		309.3	
	FP		307-308			262.3	
	KF		291-292			293.4	
	RF		282-283			321.4	
	ST		92-93		proteinase P1	206.2	
	QK		290-291			274.3	
	HK		38-39			283.3	
	NF		22-23		oligopeptidase B	279.3	
	KP		2-3			243.3	
	SG				149-150	Glutenin	proteinase P1
				295-296			
				384-385			
				446-447			
				461-462			
				523-524			
				671-672			
				733-734			
				748-749			
				775-776			
				810-811			
	TG		804-805			176.2	
	KG		478-479			203.2	

	GR		203-204			231.2	
	AA		829-830			160.2	
	YE		841-842			310.3	
	YH		75-76			318.3	
	GE		821-822			204.2	
	SY		23-24			268.3	
	GY		124-125			proteinase K	238.2
			176-177				
			212-213				
			301-302				
			375-376				
			390-391				
			437-438				
			452-453				
			514-515				
		541-542					
	IAY	556-557	subtilisin	365.4			
		695-696					
	IPP	316-317	coccolysin, thermolysin	325.4			
		177-179					
		300-302					
		186-188					
3	251-253	ω-Gliadin					
	259-261						

			275-277				
	LQP		77-79	β -Gliadin		356.4	
	LQQ		80-82	α -Gliadin		387.4	
			156-158				
			248-250				
			307-309	Glutenin			
			147-149	β -Gliadin			
	184-186						
	VPP		258-260	γ -Gliadin		thermolysin	311.4
	TTN		122-124	ω -Gliadin		proteinase P1	334.3
			165-167				
	VSP		66-68	Glutenin		thermolysin	301.3
	AQQLAAQLPAMCR	13	837-849		oligopeptidase B	1417.5	

Dominika Czurko
imię i nazwisko

Wrocław, 09.05.2023
(miejscowość i data)

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

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Czurko D., Łaba W., Żarowska B., Janek T. 2021. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. RSC Advances: 11 (8), 4688-4700. DOI: [10.1039/D0RA08830G](https://doi.org/10.1039/D0RA08830G)

mój udział polegał na ustaleniu koncepcji, metodologii oraz planu badań. Analizie *in silico* białka młóta browarnianego jako źródła biologiczne aktywnych peptydów. Przygotowaniu hydrolizatów białka młóta, monitorowaniu hydrolizy metodą chromatografii wykluczenia oraz wyznaczeniu stopnia hydrolizy białka. Dodatkowo odpowiadałam za ustalenie profilu enzymów proteolitycznych w medium pohodowlanym jak również oznaczenie koncentracji i aktywności przeciwutleniającej uzyskanych peptydów. Ponadto, byłam odpowiedzialna za wizualizację pozyskanych danych, analizę dotychczasowych doniesień naukowych i ich dyskusję oraz przygotowanie wersji roboczej manuskryptu.

09.05.2023
Czurko Dominika
data i podpis

Wojciech Łaba
imię i nazwisko

Wrocław 08.05.2023
(miejsowość i data)

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

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., **Łaba W.**, Żarowska B., Janek T. 2021. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. RSC advances: 11 (8), 4688-4700. DOI: [10.1039/D0RA08830G](https://doi.org/10.1039/D0RA08830G)

mój udział polegał na ustaleniu koncepcji, metodologii oraz planu badań, krytycznej weryfikacji manuskryptu pod kątem istotnych treści intelektualnych oraz zatwierdzeniu finalnej wersji manuskryptu.

08.05.2023. U Łaba
data i podpis

Barbara Żarowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Chełmońskiego 37, 51-630,
Wrocław, Polska

Wrocław, 8.05.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., Łaba W., **Żarowska B.**, Janek T. 2021. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. RSC advances: 11 (8), 4688-4700. DOI: [10.1039/D0RA08830G](https://doi.org/10.1039/D0RA08830G)

mój udział polegał na krytycznej analizie manuskryptu celem weryfikacji istotnych treści intelektualnych.

8.05.2023 B.Żarowska

data i podpis



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

Dr Tomasz Janek

Wrocław, 09.05.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., Łaba W., Żarowska B., **Janek T.** 2021. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. *RSC Advances*: 11 (8), 4688-4700.

mój udział polegał na ustaleniu koncepcji, metodologii oraz planu badań, krytycznej weryfikacji manuskryptu pod kątem istotnych treści intelektualnych oraz zatwierdzeniu finalnej wersji publikacji.

Tomasz Janek



CELLENCE IN RESEARCH

UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI
ul. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław
tel. 71 3207738
e-mail: tomasz.janek@upwr.edu.pl • www.upwr.edu.pl



Article

Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications

Dominika Ciurko ¹, Cécile Neuvéglise ², Maciej Szwechłowicz ¹, Zbigniew Lazar ^{1,*} and Tomasz Janek ^{1,*}

¹ Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 51-630 Wrocław, Poland

² SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, 34060 Montpellier, France

* Correspondence: zbigniew.lazar@upwr.edu.pl (Z.L.); tomasz.janek@upwr.edu.pl (T.J.); Tel.: +48-71-320-7735 (Z.L.); +48-71-320-7734 (T.J.)

Abstract: Proteolytic enzymes are commercially valuable and have multiple applications in various industrial sectors. The most studied proteolytic enzymes produced by *Yarrowia lipolytica*, extracellular alkaline protease (Aep) and extracellular acid protease (Axp), were shown to be good candidates for different biotechnological applications. In this study, we performed a comprehensive analysis of the alkaline proteolytic enzymes of *Yarrowia* clade species, including phylogenetic studies, synteny analysis, and protease production and application. Using a combination of comparative genomics approaches based on sequence similarity, synteny conservation, and phylogeny, we reconstructed the evolutionary scenario of the *XPR2* gene for species of the *Yarrowia* clade. Furthermore, except for the proteolytic activity of the analyzed *Yarrowia* clade strains, the brewers' spent grain (BSG) was used as a substrate to obtain protein hydrolysates with antioxidant activity. For each culture, the degree of hydrolysis was calculated. The most efficient protein hydrolysis was observed in the cultures of *Y. lipolytica*, *Y. galli*, and *Y. alimentaria*. In contrast, the best results obtained using the 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method were observed for the culture medium after the growth of *Y. divulgata*, *Y. galli*, and *Y. lipolytica* on BSG.



Citation: Ciurko, D.; Neuvéglise, C.; Szwechłowicz, M.; Lazar, Z.; Janek, T. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>

Academic Editor: Clemente Capasso

Received: 13 February 2023

Revised: 19 March 2023

Accepted: 28 March 2023

Published: 30 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: *Yarrowia* clade; yeast; phylogenetics; protease; brewers' spent grain

1. Introduction

Nearly two decades ago, the genus *Yarrowia* was still limited to *Yarrowia lipolytica* species [1,2]. In 2004, Péter et al. [3] described *Candida galli*, a sister species of *Y. lipolytica*, which was later renamed *Y. galli*. In 2005, Cletus Kurtzman [4] defined the *Yarrowia* clade as a taxonomic group, including *Y. lipolytica* and *C. galli*, as well as *Candida hispaniensis* and *Candida bentonensis*. Since then, numerous species have been assigned to the *Yarrowia* clade primarily based on marker sequencing, which has become a common tool in taxonomic studies. Today, the *Yarrowia* clade comprises *Y. lipolytica*, *Yarrowia alimentaria*, *Yarrowia bubula*, *Yarrowia brassicae*, *Yarrowia deformans*, *Yarrowia divulgata*, *Y. galli*, *Yarrowia hollandica*, *Yarrowia keelungensis*, *Yarrowia osloensis*, *Yarrowia parophonii*, *Yarrowia phangngaensis*, *Yarrowia porcina*, *Yarrowia yakushimensis*, and *C. hispaniensis* [5]. The species listed above share many morphological and physiological characteristics of *Y. lipolytica*. One is the ability to exist as yeast cells, pseudomycelium, or true septate hyphae. However, the best known feature of all the species is their high capacity for lipid accumulation, which are the carbon storage compounds accumulated during nitrogen-limiting conditions [6,7]. *Yarrowia* clade species vary in terms of the maximum growth temperature, ranging from 21 °C for *Y. alimentaria* to 37 °C for *Y. phangngaensis* [7].

Most of the species belonging to the *Yarrowia* clade originate from European, American, or Asian regions, being isolated from various natural habitats, which are also common for *Y. lipolytica*, such as dairy and meat products (*Y. alimentaria*, *Y. osloensis*, *Y. divulgata*, *Y. galli*, *Y. bubula*, and *Y. porcina*), mangrove or marine waters (*Y. keelungensis*, *Y. phangngaensis* and

other strains of *Y. divulgata*), guts of insects or vertebrates (*Y. parophonii*, *Y. yakushimensis*, and *Y. hollandica*) and from fermented vegetable food (*Y. brassicae*). Numerous concerns about the safety of using *Yarrowia* clade are related to *Y. deformans* and some strains of *Y. galli*, which have been isolated from human tissues [8].

However, based on the aerobic nature and the rare ability to grow at 37 °C, *Y. lipolytica* has been classified as generally recognized as safe (GRAS) by the American Food and Drug Administration (FDA) for particular applications. It was also considered a “safe-to-use” organism based on an exhaustive literature assessment [9]. Furthermore, the unique biochemical characteristics of *Y. lipolytica* contributed to the irrefutable interest of scientists in that species and its large-scale use [10]. Nowadays, *Y. lipolytica* is commercially used to produce microbial proteins, single cell oil, organic acids, and polyhydroxy alcohols. In addition, several enzymes like RNases, phosphatases, esterases, lipases, and proteases are produced using *Y. lipolytica* cultures [11]. The high proteolytic and lipolytic activity contributed to the widespread distribution of *Y. lipolytica* in the commercial production of meat and dairy products [12].

The most studied proteolytic enzymes produced by *Y. lipolytica*, i.e., extracellular alkaline protease (Aep) and extracellular acid protease (Axp), are synthesized under starvation conditions at the end of the exponential growth phase in protein-rich media [13,14].

Studies by Enderlin and Ogrydziak (1994) classified Aep as a 32 kDa subtilisin-like protein encoded by the gene, secreted in the form of a 55 kDa glycosylated precursor [15]. To develop the mature form of this enzyme, a 15 amino acid long presequence had to be removed, starting with the cleavage of the dipeptides (X-Ala or X-Pro) followed by hydrolysis of the peptide bond between Lys and Arg [16]. Aep secretion by *Y. lipolytica* growing in a yeast extract peptone dextrose (YPD) medium (pH 6.8) reaches around 1–2 g/L [17]. Furthermore, as shown by Akpınar and colleagues (2011), skimmed milk-based medium is appropriate for Aep secretion, and no negative impact of additional carbon (glucose) or nitrogen (glutamine) sources was determined [18].

Early studies on the nature of the Axp protease conducted by Yamada and Ogrydziak (1983) indicated the formation of three mature forms of this enzyme, which differed in their molecular weights—28, 32, and 36 kDa [19]. However, Young and colleagues (1996) showed the formation of a 37 kDa enzyme, sometimes subject to partial hydrolysis. Consequently, Axp was finally classified as a pepsin-like protein, composed of 397 amino acids with a 44 amino acid long prepro-region. The enzyme, secreted as a precursor with a 42 kDa molecular mass, is converted into its mature form in acidic environments [20].

In contrast to *Y. lipolytica*, the information about the biotechnological applications of other *Yarrowia* clade members are very limited. For example, studies about erythritol, mannitol, and arabitol production, with pure or crude glycerol as well as with glucose or fructose as carbon sources, are still in the laboratory research phase [21,22]. Similarly, studies related to lipid biosynthesis in a medium based on switch grass hydrolysate using *Yarrowia* clade species were performed on a small scale [6].

According to our current knowledge, studies performed by Ozturk [23] are the only ones related to the proteolytic activity of *Yarrowia* species other than *Y. lipolytica*. These studies showed the ability of *Y. galli*, *Y. deformans*, and *Y. alimentaria* to gelatin liquefaction, their high proteolytic activity, and their ability to secrete proteases. Therefore, due to the presumably high application potential of the produced proteases, it is necessary to expand our knowledge about these enzymes and their properties.

The selection of a substrate in protease research is crucial for commercial application. The cost of the growth medium represents about 30–40% of the price of industrial enzymes [24]. The brewers' spent grain (BSG), the major solid by-product in the brewing industry, due to the high protein content (19–30% *w/w*) and low price of approximately EURO 35 per ton, is a prospective substrate. Moreover, the average annual global production of BSG, estimated to be about 39 million tons, with 3.4 million tons produced in the European Union, forces the search for new valorization methods for this agro-industrial by-product [25].

Our research provides a comprehensive analysis of the alkaline proteolytic enzymes of *Yarrowia* clade species, including phylogenetic studies, synteny analysis, and protease production and application. Furthermore, in order to address the economic aspects of protease production, a protein-rich spent grains medium was selected. Finally, considering the potential applications of *Yarrowia* proteases, we established a link between the high degree of protein hydrolysis and antioxidant activity of the obtained hydrolysates.

2. Results and Discussion

2.1. Comparative Analysis of *Yarrowia* Alkaline Proteases from a Genomic Point of View

The search for alkaline proteases encoding genes in the genome of the different *Yarrowia* species showed the presence of 5 (*Y. phangngaensis*) to 21 (*Y. galli*) genes (Table 1). Five genes were also found in *C. hispaniensis*, which has a basal position in the clade. Due to the lack of access, genomes of *Y. brassicae* and *Y. parophonii* were not examined in terms of alkaline protease genes. Instead, three strains of *Y. lipolytica* were analyzed: the Polish strain A101, the German strain H222, and the laboratory strain E150 (CLIB 122) issued from a crossing between the French W29 and the American ATCC 18942 followed by many back-crosses [8]. The genome of E150 was the first fully sequenced genome and is still the reference for genome assembly and annotation of new *Y. lipolytica* genomes.

Table 1. Number of alkaline proteases identified in the genomes of *Yarrowia* clade species.

No.	Species and Strain	Number of Alkaline Protease
1	<i>Y. lipolytica</i> A101	15
2	<i>Y. lipolytica</i> E150 (CLIB 122)	16
3	<i>Y. lipolytica</i> H222	16
4	<i>Y. alimentaria</i> CBS 10151	19
5	<i>Y. bubula</i> CBS 12934	16
6	<i>Y. deformans</i> CBS 2071	15
7	<i>Y. divulgata</i> CBS 11013	15
8	<i>Y. galli</i> CBS 9722	21
9	<i>Y. hollandica</i> CBS 4855	15
10	<i>Y. keelungensis</i> CBS 11062	17
11	<i>Y. osloensis</i> CBS 10146	19
12	<i>Y. phangngaensis</i> CBS 10407	5
13	<i>Y. porcina</i> CBS 12935	19
14	<i>Y. yakushimensis</i> CBS 10254	15
15	<i>C. hispaniensis</i> CBS 9996	5

Based on sequence similarity, we defined 13 different groups of putative alkaline proteases as shown on the phylogenetic tree (Figure 1).

Most groups contained one *Y. lipolytica* representative except for three groups with two proteins with multiple counterparts that could not be separated based on sequence similarity. One of these groups corresponds to the XPR2 group, i.e., the Aep encoded by YALI0F31889g, part of which (highlighted by a blue curve in Figure 1) gathered one protein per species except for *Y. phangngaensis* and *C. hispaniensis* for which no ortholog was found. The genetic distances between these genes are small, as shown by the short branches in the tree. The other proteins in the XPR2 group exhibited very long branches representing proteins emanating from successive duplication events, which occurred in *Y. osloensis*, *Y. porcina*, *Y. galli*, and *Y. yakushimensis*. Synteny analysis of these genes showed different insertion sites suggesting that these duplications occurred independently (Figure S1).

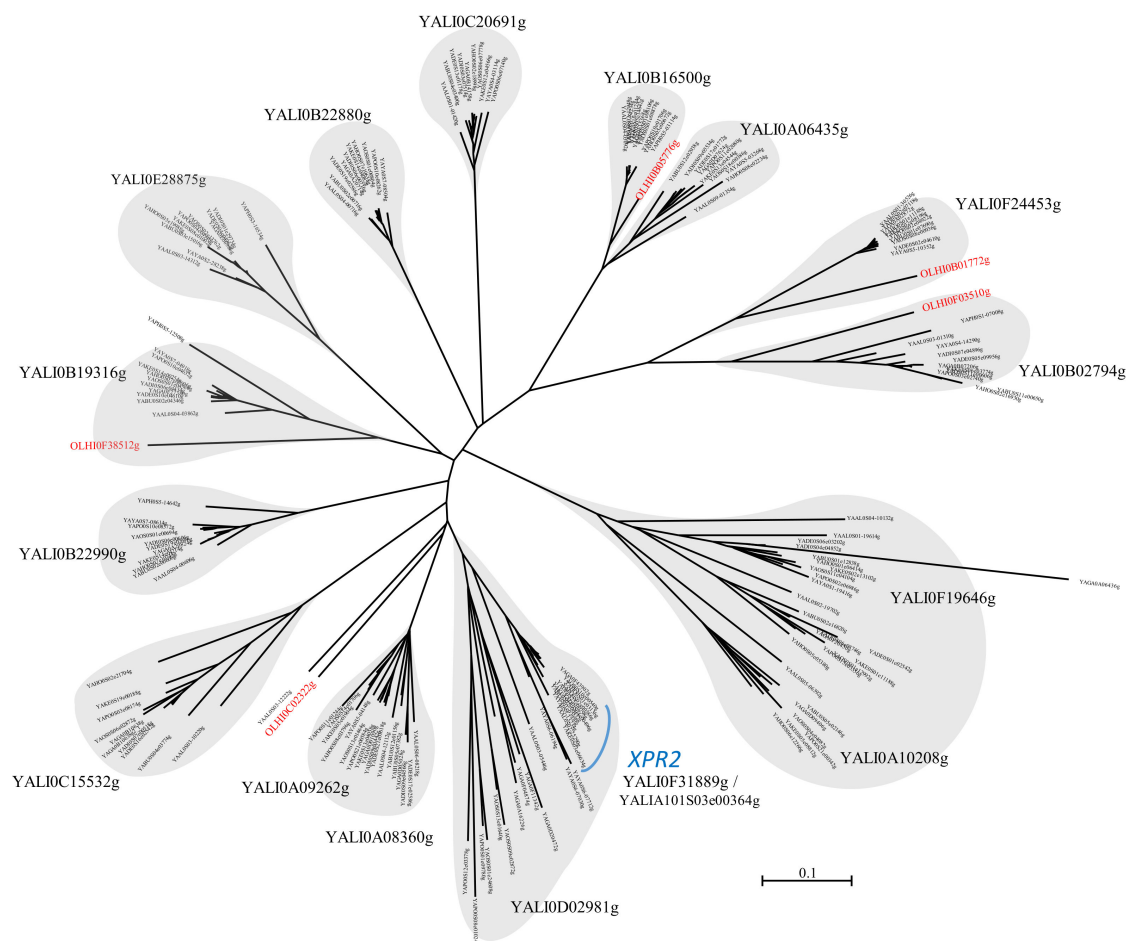


Figure 1. Unrooted circular phylogenetic tree showing the relationship between the alkaline proteases found in the genomes of *Yarrowia* clade species. The thirteen groups of proteins are depicted by grey clouds. The tree was constructed with phyML with a LG evolutionary model. Proteins closely related to *XPR2* are highlighted by a blue curve. Protein-coding genes of *Y. lipolytica* are in large characters, and those of *C. hispaniensis* are in red.

One exception to this rule is the conservation of synteny in the upstream region of YAOS0S01e24608g and YAPO0S01e09780g genes, which are probably derived from the same event (Figure S1). In *Y. yakushimensis*, YAYA0S05e13234g, the syntenic copy of *XPR2*, was successively duplicated three times on scaffold YAYA0S6. These duplication events involved not only *XPR2* but also the homolog of YALIOF31845g (F31845 in Figure S1).

In contrast, there is extensive synteny conservation in the region of *XPR2* close homologs (part of the *XPR2* group with short branches) with some insertions of tRNA genes, transposable elements, and intervening genes (Figure 2). Nevertheless, we observed a rearrangement occurring one gene upstream of the *XPR2* homolog (upstream of YALIOF31867g) in *Y. bubula*. An additional rearrangement generated a loss of synteny one gene downstream of *XPR2* (downstream from YALIOF31911g). As synteny is conserved in *Y. bubula*, *Y. hollandica*, and *Y. alimentaria*, which are basal species of the genus *Yarrowia*, the most parsimonious explanation is that the rearrangement occurred in the other species (grey arrow in Figure 2), leading to the actual order of genes in *Y. lipolytica* and closely related species.

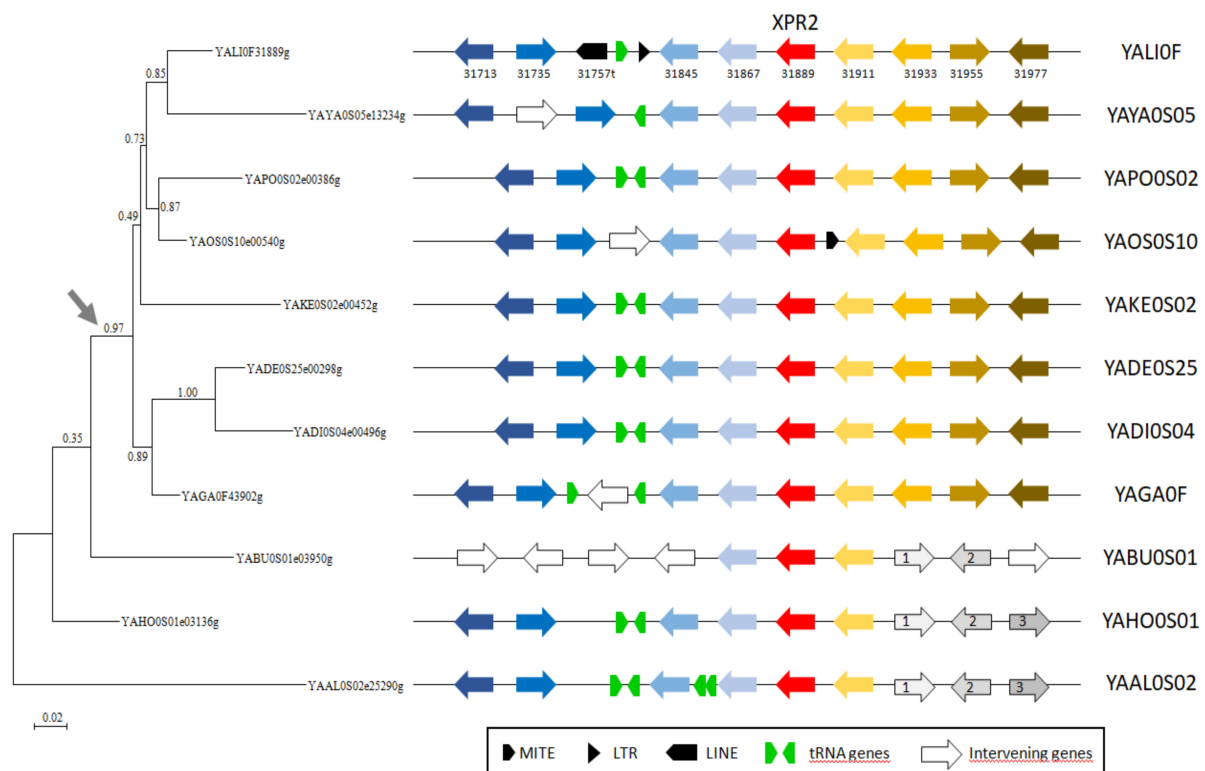


Figure 2. Synteny analysis of alkaline extracellular protease *XPR2* from different *Yarrowia* species. The phylogenetic tree was constructed from an alignment of 446 amino acids with phyML with a LG evolutionary model. *XPR2* orthologs are in red and flanking genes are in different blue or yellow to brown colors reflecting orthologs in the different species. Transposable elements (MITE, LTR, LINE) and tRNA genes are represented as described in the legend. The grey arrow close to the phylogenetic tree indicates the rearrangement event leading to the actual gene order in *Y. lipolytica* and closely related species.

2.2. Expression Analysis of *Y. lipolytica* W29 Alkaline Proteases in Various Culture Conditions and Signal Peptide Prediction

To verify which of the 16 putative proteases may play an important role in protein hydrolysis by the analyzed strains, we took advantage of previously published RNA-seq data of *Y. lipolytica* W29 [26] and unpublished data performed on a derivative of E150 (CLIB 122) (genotype: E150, *ku70::URA3, LEU2*). Twelve putative protease encoding genes showed low or no expression (Table 2). The *XPR2* gene is highly expressed in minimal medium with glucose but poorly in oleic acid and tributyrin. YALI0A06435g and YALI0A08360g were moderately expressed on the three tested carbon sources in yeast nitrogen base (YNB) medium. Surprisingly, YALI0B16500g, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* PRB1- protease B, is highly expressed in YPD medium at high and low pH. Previous studies showed that *XPR2* is induced by pH above 6 and/or by the presence of peptone [27]. Thus, we checked the expression of all putative protease encoding genes in these conditions and, as expected, *XPR2* was expressed on the YPD medium, although moderately, probably due to the genotype of E150 (CLIB 122) derivative (*his-1, ura3-302, leu2-270, xpr2-322, ku70::URA3, LEU2*). In turn, low expression of *XPR2* was observed on YPD glucose at pH 4 (Table 2). The highest expression was observed for YALI0B16500g on both YPD and YPD at pH 4. Furthermore, the functional annotation of YALI0B16500g predicts it to be localized in the vacuole. Thus, we checked all proteases for the presence of a putative signal peptide. It appeared that all of the putative proteases, including YALI0B16500p, could potentially be secreted (Table 2).

Table 2. Predictable expression of the alkaline proteases of *Y. lipolytica* in various culture conditions and prediction of putative signal peptide.

YALI Protease	YNB			Expression YPD	Expression on YPD at pH 4	Functional Annotation	Signal Peptide with SignalP-5.0	Signal Peptide with DeepLoc-1.0	Type of Signal Sequence
	Rank of Expression OA	Rank of Expression GLU	Rank of Expression TB						
YALI0A06435g	941	3795	4250	moderate	low	similar to uniprot P09232 <i>S. cerevisiae</i> YEL060C (ohnolog of YOR003W) PRB1 protease B, vacuolar	0.9911	0.9966	pre-pro?
YALI0A08360g	3831	3360	5852	low	low	weakly similar to uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.9894	0.999	pre-pro?
YALI0A09262g	6026	6038	6189	low	low	uniprot F2Z604/Q6H9N6 <i>Y. lipolytica</i> YALI0A09262g AEP2 Alkaline extracellular protease precursor	0.9858	0.9988	pre-pro?
YALI0A10208g	NE	NE	NE	NE	NE	similar to uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.996	0.9989	
YALI0B02794g	5431	5513	5001	low	low	similar to uniprot P25381 <i>S. cerevisiae</i> YCR045C Probable subtilisin-family protease with a role in the formation of the dihydroxy layer of the spore	0.9983	0.9914	
YALI0B16500g	213	308	246	high	high	similar to uniprot P09232 <i>S. cerevisiae</i> YEL060C (ohnolog of YOR003W) PRB1 protease B, vacuolar	0.9068	0.8928	pre-pro
YALI0B19316g	6162	6181	5646	low	low	similar to uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.9192	0.9999	pre-pro
YALI0B22880g	5772	5794	5898	low	low	similar to uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.9985	0.9992	pre-pro
YALI0B22990g	5953	5838	6124	low	low	weakly similar to uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.9942	0.997	
YALI0C15532g	NE	NE	NE	NE	NE	some similarities with uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.9897	0.6785	pre-pro
YALI0C20691g	5213	5520	5477	low	low	similar to uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.9912	0.9998	pre-pro
YALI0D02981g	5469	5561	5850	low	low	highly similar to uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.98	0.9994	degenerate pre-pro

Table 2. Cont.

YALI Protease	YNB			Expression YPD	Expression on YPD at pH 4	Functional Annotation	Signal Peptide with SignalP-5.0	Signal Peptide with DeepLoc-1.0	Type of Signal Sequence
	Rank of Expression OA	Rank of Expression GLU	Rank of Expression TB						
YALI0E28875g	5377	5182	5176	low	low	similar to uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> XPR2 Alkaline extracellular protease precursor	0.9668	0.9995	
YALI0F19646g	6201	6207	6117	NE	NE	weakly similar to uniprot P58371 <i>Magnaporthe grisea</i> Subtilisin-like proteinase Spm1 precursor	0.9939	0.9997	degenerate pre-pro
YALI0F24453g	5989	6046	5675	low	low	weakly similar to uniprot P25381 <i>S. cerevisiae</i> YCR045c similarity to serin proteases	0.9916	0.9996	
XPR2	5263	22	5880	moderate	low	uniprot P09230 <i>Y. lipolytica</i> Alkaline extracellular protease	0.9833	0.9995	degenerate pre-pro

Expression on YNB medium with OA, GLU, and TB was performed with W29 [26], whereas expression on YPD and YPD at pH 4 was performed with a derivative of E150 (CLIB 122) of genotype E150, *ku70::URA3, LEU2* (Neuvéglise, unpublished). OA—oleic acid; GLU—glucose; TB—tributyrin.

2.3. Analysis of Expression of XPR2 Alkaline Protease in the BSG Medium by *Y. lipolytica*

Expression analysis of all the genes encoding putative proteases in the BSG-based medium was performed. Due to the large number of genes to be tested, we analyzed the expression only in the *Y. lipolytica* W29 strain. Out of the 16 genes encoding putative proteases, 7 were expressed under the analyzed conditions. The highest expression was observed for XPR2, followed by the YALI0B16500 gene (Figure 3). These data are, however, in contrast with the proteomic studies, in which the analyzed bands on SDS-PAGE were covered mostly with Aep protein (details see Section 2.7). These results were further verified by overexpression of the YALI0B16500 gene in the PO1d strain (deleted for the XPR2 gene), where no protease activity was detected on skimmed milk agar medium at pH 6.8.

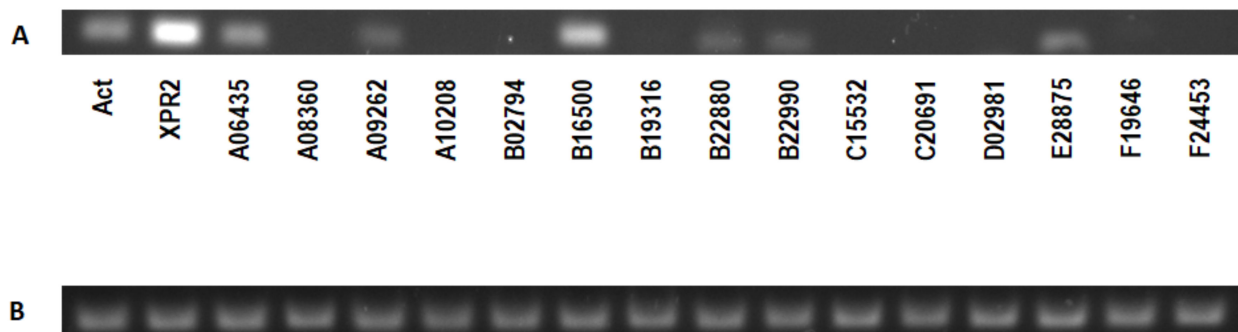


Figure 3. (A) Expression of alkaline proteases in *Y. lipolytica* W29 growing on BSG medium, (B) Verification of primers on genomic DNA. The numbers correspond to the analyzed genes, XPR2 refers to the alkaline extracellular protease, and Act refers to actin gene.

2.4. Investigation of the Proteolytic Activity of *Yarrowia* Clade Species

The proteolytic activity of the *Yarrowia* clade was analyzed using skimmed milk agar plates. Results showed huge diversity of the clade members in terms of their abilities to secrete proteases (Table 3).

Table 3. Proteolysis zone diameter of *Yarrowia* clade species growing on skimmed milk agar plates. The results are presented as mean values \pm SD. $n = 3$.

Tested Species	Control	<i>Y. lipolytica</i>	<i>Y. hollandica</i>	<i>Y. galli</i>	<i>Y. phangngaensis</i>	<i>Y. deformans</i>	<i>Y. keelungensis</i>	<i>Y. porcina</i>
Proteolytic zone diameter [mm]	-	14.80 (± 0.40)	8.83 (± 0.76)	11.14 (± 1.97)	-	-	14.02 (± 0.04)	12.90 (± 0.86)
Tested species	<i>Y. yakushimensis</i>	<i>C. hispaniensis</i>	<i>Y. bubula</i>	<i>Y. osloensis</i>	<i>Y. alimentaria</i>	<i>Y. divulgata</i>	<i>Y. parophonii</i>	<i>Y. brassicae</i>
Proteolytic zone diameter [mm]	15.05 (± 0.52)	-	9.18 (± 0.32)	9.05 (± 0.08)	13.51 (± 1.01)	9.52 (± 1.32)	9.73 (± 0.64)	8.33 (± 1.52)

Y. phangngaensis, *Y. deformans*, and *C. hispaniensis* showed no proteolytic activity, indicated by the lack of proteolysis zones on the skimmed milk agar (Table 3). The highest proteolytic activity was observed for *Y. yakushimensis* (15.05 ± 0.52), followed by *Y. lipolytica* (14.80 ± 0.40), *Y. keelungensis* (14.02 ± 0.04), and *Y. alimentaria* (13.51 ± 1.01) (Figure 4).

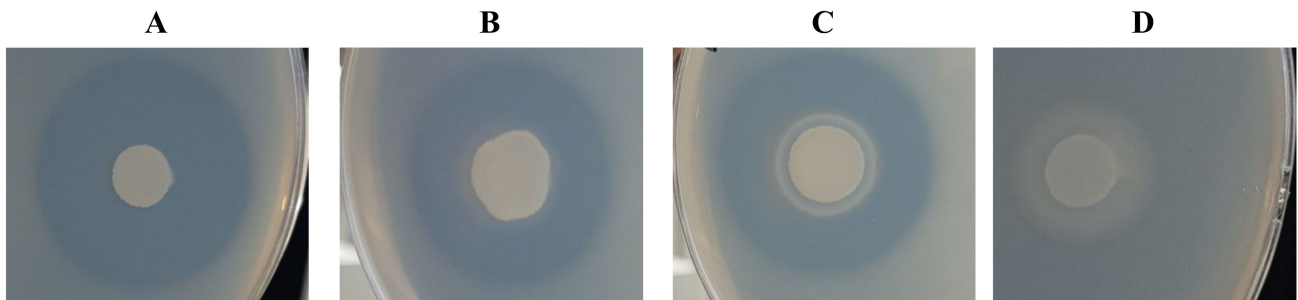


Figure 4. Proteolysis zone observed on the skimmed milk agar plate culture of (A) *Y. yakushimensis*, (B) *Y. keelungensis*, (C) *Y. alimentaria* presented strong proteolytic properties, and (D) *Y. brassicae* of the lower activity.

The proteolytic activity of fungal, yeast, and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese was investigated by Ozturkoglu-Budak and colleagues [28]. Among the five tested yeast species, only *Y. lipolytica* AF_335977 and *Debaryomyces hansenii* AF_210327 were able to secrete proteases. However, the proteolytic activity of AF_335977 was described as medium. At the same time, it was the best result among tested yeast species. In the studies by Gardini and colleagues [29], several yeast species isolated at different stages of Pecorino Crotonese production and ripening were characterized by their technological properties. However, only five strains, identified as *Y. lipolytica* and *D. hansenii*, were able to hydrolyze skimmed milk proteins.

Furthermore, *Y. lipolytica* and numerous other yeast species isolated from starter-free raw cow's milk cheeses were investigated for extracellular proteolytic activity. The highest activity of proteolytic enzymes was observed for *Y. lipolytica* and *K. lactis*, while the highest caseinolytic activity was presented by *Y. lipolytica* and *P. guilliermondii* [30]. Similarly, the proteolytic activity of yeast species isolated at different stages during the processing of pastirma (the most popular dry-cured meat product in Turkey) was investigated [23]. The yeast isolates, classified as *Candida zeylanoides* (the predominant species), *C. deformans*, *C. galli* as well as *C. alimentaria* (currently classified as *Yarrowia* genus), showed clear zones surrounding the colonies. Our results clearly confirm the potential of some *Yarrowia* species to secrete high amounts of proteases into the growth medium.

2.5. Characterization of the Proteolytic Activity of *Yarrowia* Clade Growing on BSG

The *Yarrowia* clade members differed significantly in terms of their proteolytic abilities. *Y. phangngaensis*, *Y. deformans*, and *C. hispaniensis* showed no proteolytic activity under the analyzed conditions (Figure 5). In *Y. lipolytica* W29, XPR2 is the highest expressed gene in the BSG medium (Figure 3). The absence of proteolytic activity in *Y. phangngaensis* and *C. hispaniensis* could be explained by the loss of the XPR2 homolog (Figure 1), which is, however, not the case in *Y. deformans*. The latter species was analyzed for the expression of XPR2 ortholog (YADE0S25e00298g) in BSG medium. However, no transcript was detected.

The proteolytic activity of *Y. hollandica*, *Y. porcina*, *Y. yakushimensis*, *Y. bubula*, *Y. osloensis*, *Y. divulgata*, and *Y. brassicae* did not exceed 0.5 U/mL (Figure 5). The highest proteolytic activity was detected for *Y. lipolytica* W29 with 2.47 U/mL/min (Figure 5). Other *Yarrowia* species showed strong proteolytic activities: *Y. galli* (1.96 U/mL/min), *Y. alimentaria* (1.38 U/mL/min), *Y. keelungensis* (1.07 U/mL/min), and *Y. parophonii* (0.80 U/mL/min). These results allow us to consider the above-mentioned strains as interesting producers of proteolytic enzymes with potential industrial applications in the future.

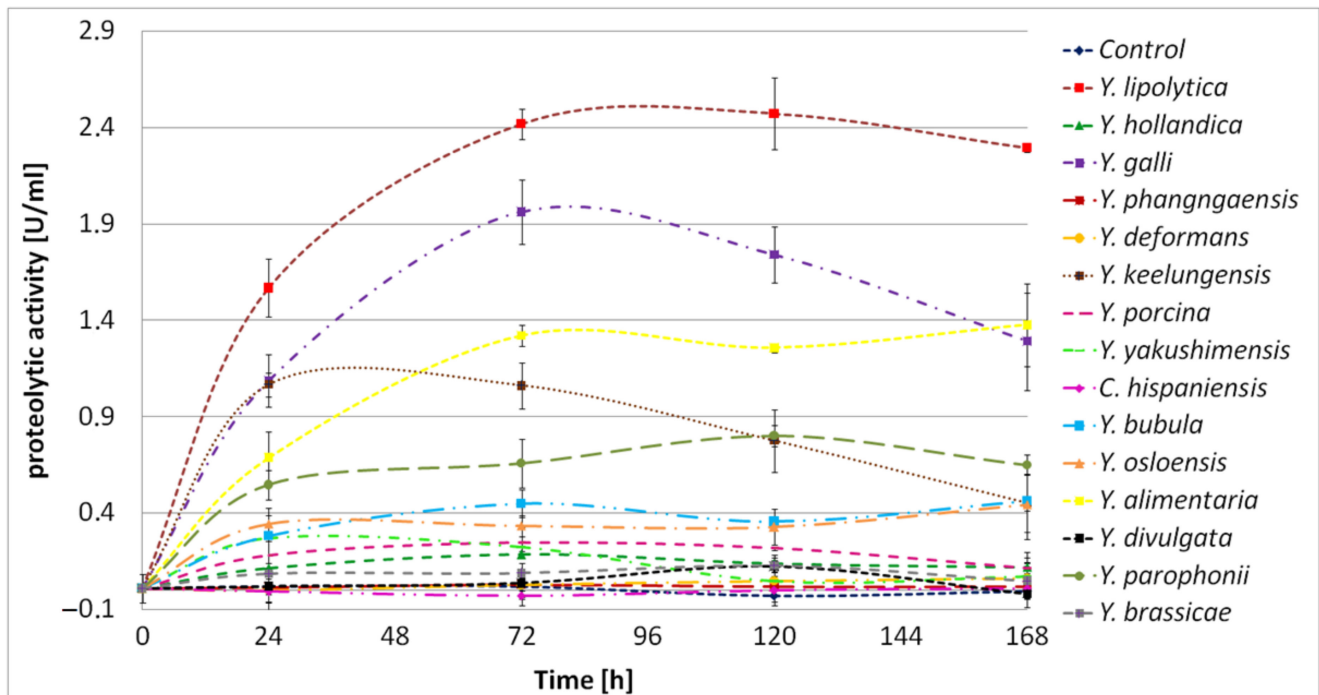


Figure 5. Proteolytic activity of *Yarrowia* clade species grown in BSG protein medium as a function of time. The results are presented as mean values \pm SD. $n = 3$.

In the cultures of *Y. lipolytica*, *Y. alimentaria*, and *Y. parophonii*, the proteolytic activity remained stable throughout the process, indicating continuous enzyme secretion and protein hydrolysis. In turn, in cultures of *Y. galli* and *Y. keelungensis*, a significant decrease in protease activity after reaching the maximum point was observed. It is possible that *Y. galli* and *Y. keelungensis* secreted a significant amount of enzymes at the beginning of the culture, allowing rapid protein hydrolysis and providing sufficient nutrients to decrease protease secretion.

The proteolytic activity of *Y. lipolytica* W29 and *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862, isolated from an estuary near Rio de Janeiro, were analyzed in the research of Braga and colleagues [31], who investigated the effect of lipase secretion on the γ -decalactone production. In a medium optimized for lipase production, the proteolytic activity reached 0.0034 U/mL/min and 0.00151 U/mL/min for W29 and IMUFRJ 50862, respectively. The difference in results obtained in our work, caused by the medium composition, clearly indicates the potential for using BSG as a substrate.

In the present work, high proteolytic activity was associated with significant hydrolysis of BSG protein. Furthermore, it caused the accumulation of hydrolysis products, expressed as free α -amino groups. In the culture of *Y. lipolytica*, *Y. galli*, *Y. alimentaria*, and *Y. keelungensis*, characterized already as leading proteolytic strains, the concentration of α -amino groups reached 4367 $\mu\text{g/mL}$, 4245 $\mu\text{g/mL}$, 3939 $\mu\text{g/mL}$, and 3885 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Figure 6).

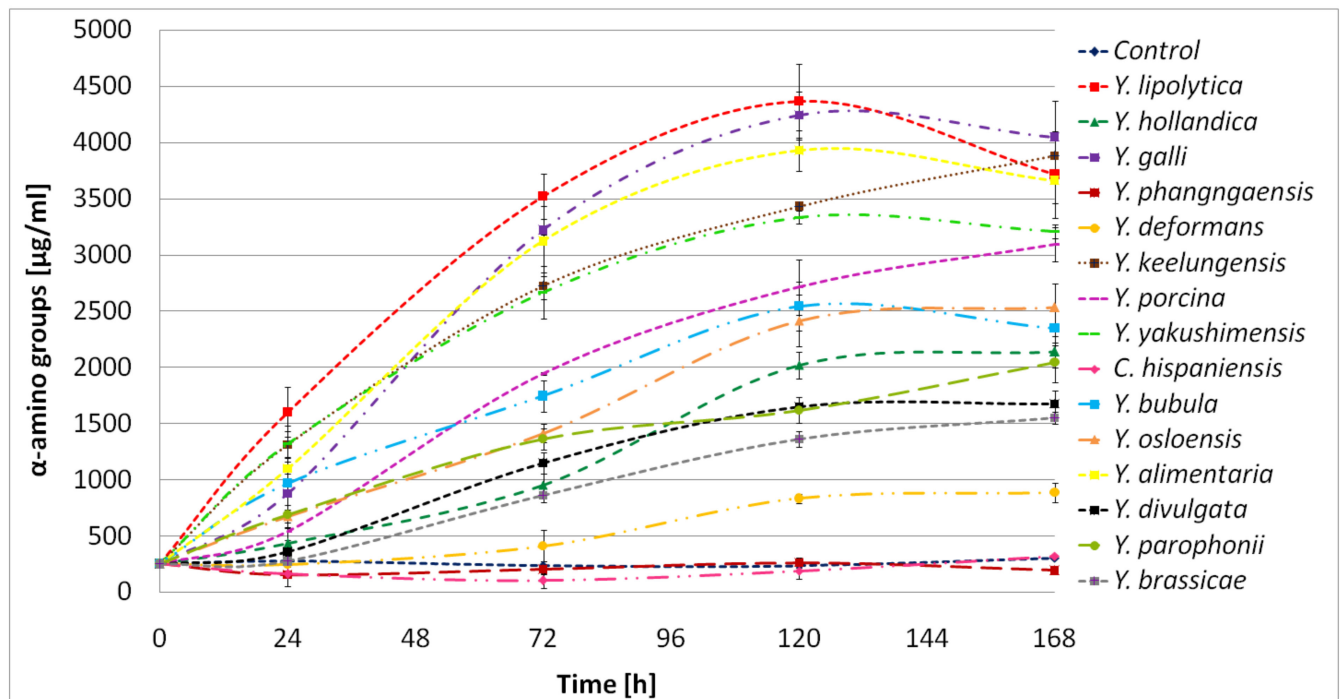


Figure 6. Free α -amino groups concentration in *Yarrowia* clade cultures grown in BSG protein medium as a function of time. The results are presented as mean values \pm SD. $n = 3$.

Interestingly, in our previous work using proteolytic bacteria, the concentration of free α -amino groups in the same BSG-based medium never exceeded 2600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [32]. This result clearly shows the benefits of using *Yarrowia* clade yeast when applying BSG.

Eight strains of *Y. lipolytica*, isolated from goat/water buffalo mozzarella cheese, were previously studied by Suzzi and colleagues [33] for their ability to breakdown milk proteins. *Y. lipolytica* isolates showed weak proteolytic activity (expressed as leucine concentration [mg] per 100 mL of milk) after 8 days of the process. However, between the 8th to the 14th day, a huge increase in proteolytic activity was observed. After 14 days, the concentration of leucine reached 300–600 mg/100 mL, while in our research, the concentration of free α -amino groups in the BSG medium reached a maximum of 350–450 mg/100 mL for the most active strains (Figure 6). It is worth pointing out that the time of culture in our research was only 5 days. This result further confirms the proteolytic abilities of *Yarrowia* clade members. For six out of fifteen tested species, the degree of BSG protein hydrolysis (DH%) exceeded 50% (Figure 7).

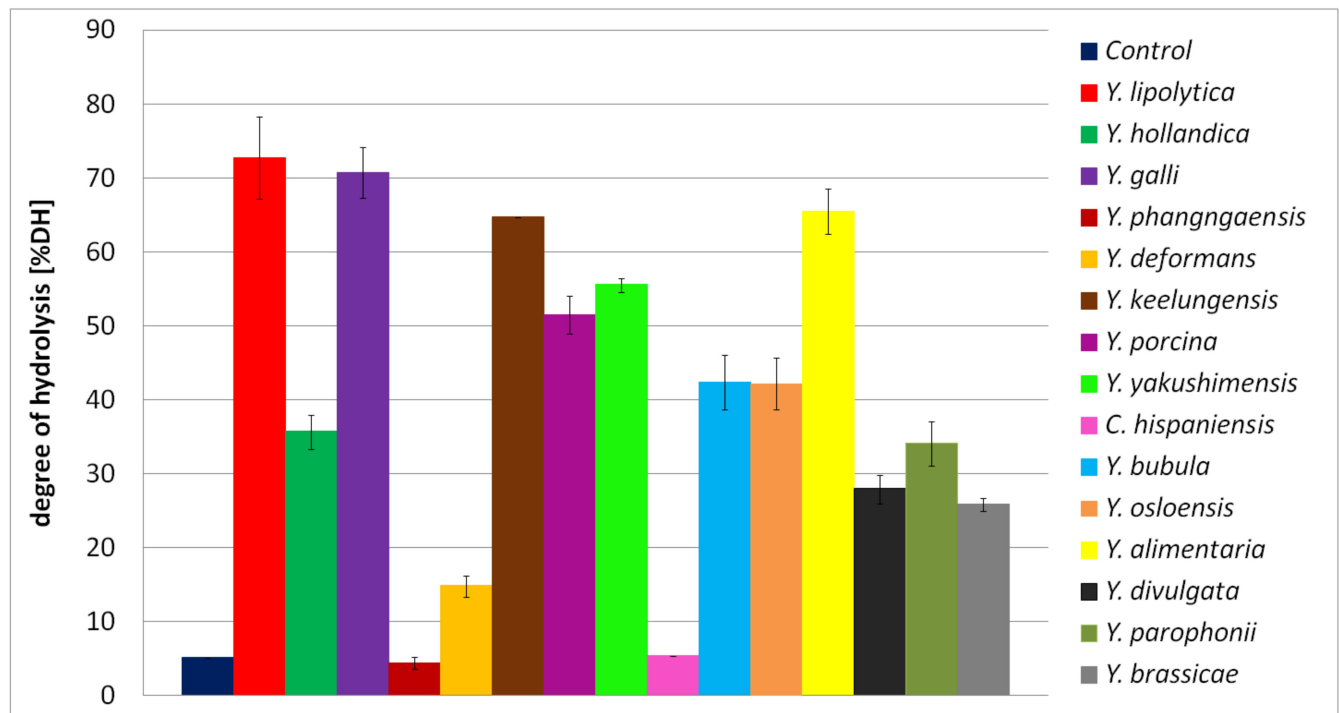


Figure 7. Degree of BSG protein hydrolysis (DH%) in the culture of *Yarrowia* clade species. The results are presented as mean values \pm SD. $n = 3$.

The best results were observed for *Y. lipolytica* with 72.78% hydrolyzed proteins. Therefore, we conclude that the hydrolysis performed by *Yarrowia* species enabled a major protein breakdown. Furthermore, in similar studies with *Rhizopus* sp., DH% of the BSG protein reached $59.0 \pm 5.4\%$ [34]. This further confirms that BSG proteins are strong inducers of the *Yarrowia* clade proteolytic enzymes and, thus, that it is an appropriate substrate for optimization studies. Moreover, given that filamentous fungi are common producers of hydrolytic enzymes, the results obtained by *Y. lipolytica*, *Y. galli*, *Y. alimentaria*, and *Y. keelungensis* are more than satisfactory.

The protein hydrolysis in the cultures of *Yarrowia* clade members was associated with environmental alkalization (Figure 8). As a result, the final pH fluctuated between 8.5 and 9. Only in the *Y. phangngaensis*, *Y. deformans*, and *C. hispaniensis* culture, where a lack of proteolytic activity and no hydrolysis of the BSG proteins were observed, did the pH not exceed 8.

Medium alkalization in the cultures of *Y. lipolytica* confirmed the previous studies in which *K. lactis*, *D. hansenii*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *S. cerevisiae*, *Candida* spp., and *Rhodotorula* spp., as well as 21 strains of *Y. lipolytica*, were analyzed for their properties influencing cheese production [30]. As a result, 16/21 and 10/21 of *Y. lipolytica* strains showed alkalizing properties on citrate agar and litmus milk, respectively.

To summarize the current information, species such as *Y. lipolytica*, *Y. alimentaria*, *Y. galli*, and *Y. keelungensis* are the most efficient and universal (in terms of medium composition) proteolytic enzyme producers.

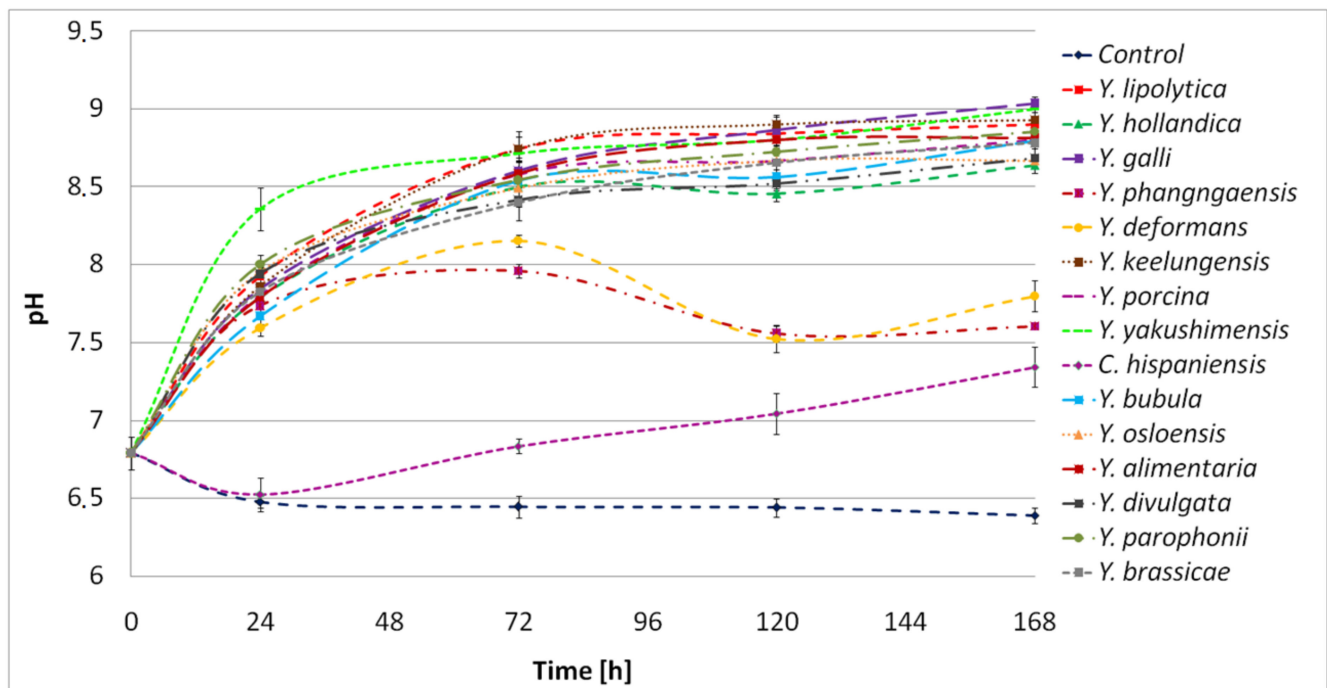


Figure 8. Kinetics of pH in the *Yarrowia* clade culture performed in BSG medium as a function of time. The results are presented as mean values \pm SD. $n = 3$.

2.6. Profile of *Yarrowia* Clade Proteolytic Enzymes Secreted in BSG-Based Medium

The gelatin zymography allowed for the detection of several proteolytic enzymes produced extracellularly during the growth of *Yarrowia* clade species in BSG medium (Figure S2). Molecular masses of proteolysis bands observed on zymography gel are summarized in Table 4. It is important to underline that some proteolysis bands represent protease complexes formed as a result of interactions between enzyme monomers. This can be confirmed in the *Y. lipolytica* example. The molecular weight of *Y. lipolytica* proteases is 40–90 kDa. Therefore, producing an enzyme with a molecular weight of 110 or 130 kDa is impossible. Nevertheless, based on obtained results, it is possible to define the enzymes/enzymes complex involved in BSG protein hydrolysis.

As shown, *Y. lipolytica* and *Y. alimentaria* were the most active species in proteolytic activity and the most efficient in BSG protein hydrolysis. The protease profile of *Y. lipolytica* and *Y. alimentaria* was represented by two main proteolytic bands at 110 and 130 kDa (Table 4). However, a proteolytic band at 130 kDa was also detected in *Y. brassicae* and *Y. divulgata* culture, where low proteolytic activity and $DH\% < 30$ were estimated. Therefore, we suggest a key role of the 110 kDa protein complex in BSG protein hydrolysis.

Furthermore, strong proteolytic activity in BSG medium as well as significant $DH\%$ of BSG protein, was demonstrated for *Y. galli*. The profile of proteolytic enzymes of *Y. galli* was represented by two bands with a molecular mass of 37–39 kDa and 40 kDa (Table 4). Nevertheless, the production of 40 kDa protease of low proteolytic activity (< 0.5 U/mL) was determined in the *Y. osloensis* culture medium. Following this, protease of 37–39 kDa seems significant for BSG protein hydrolysis. It is important to underline that the same enzyme profile as *Y. galli* was observed for *Y. parophonii*, in which proteolytic activity (0.80 U/mL/min) was almost twice as low as *Y. galli* (1.96 U/mL/min). An explanation for this is the difference in the expression level of the 37–39 kDa enzyme.

Table 4. Molecular masses of *Yarrowia* clade enzymes observed on gelatin gel.

Host	Molecular Mass [kDa]										Reference to Figure S2
	30	35	37–39	40	55	65	100	110	130	180	
<i>Y. lipolytica</i>								×	×		9A, lane 3
<i>Y. alimentaria</i>								×	×		9A, lane 6
<i>Y. hollandica</i>					×				×		9C, lane 11
<i>Y. divulgata</i>									×	×	9B, lane 10
<i>Y. brassicae</i>									×	×	9B, lane 8
<i>Y. porcina</i>	×									×	9C, lane 12
<i>Y. keelungensis</i>	×										9A, lane 5
<i>Y. galli</i>			×	×							9A, lane 4
<i>Y. parophonii</i>			×	×							9B, lane 7
<i>Y. osloensis</i>				×		×	×				9C, lane 13
<i>Y. bubula</i>							×				9B, lane 9
<i>Y. yakushimensis</i>		×									9C, lane 14

Finally, a protease of molecular mass 30 kDa, secreted in *Y. keelungensis* (Table 4), is a crucial factor affecting BSG protein hydrolysis as indicated by high proteolytic activity and significant DH%. Production of proteolytic enzymes of 30 kDa was also observed in the *Y. porcina* culture medium. However, based on the results of the proteomic analysis presented in Section 2.7, enzymes of *Y. keelungensis* and *Y. porcina* are, with a high probability, different compounds of similar molecular weight.

Production of proteolytic enzymes in *Y. lipolytica* was already reported. An alkaline extracellular protease of 35 kDa was produced by *Y. lipolytica* YITun15 [35]. This enzyme showed significant activity in a wide spectrum of factors tested. A *Y. lipolytica* coconut copra isolate produced protease of 61.5 kDa. The fish flower was applied as a substrate and enzyme production inductor [36]. In other studies, a 28 kDa protease was secreted by an auxotrophic recombinant strain of *Y. lipolytica* Po1d (JMY 1852). The enzyme was produced as an undesirable factor affecting human interferon alpha 2b production [37]. Another example involved the production of the intercellular protease of 97 kDa by *Y. lipolytica* strain IPN-MI-1 of the yogurt origin. The enzyme showed stable activity in the pH range of 5.0–9.0, and 37 °C was the optimal temperature [38].

In order to conduct proteomic analysis of *Yarrowia* clade enzymes, protein electrophoreses were performed. Unfortunately, despite a significant increase in protease concentration obtained using acetone precipitation, some of the proteases detected by gelatin zymography did not appear on the electrophoretic gel. Therefore, only the samples presented in Table S1 were subjected to proteomic investigation.

2.7. Protein Sequence Coverage of *Yarrowia* Clade Proteases to Other Fungal Enzymes

Proteomic analysis of the enzymes expressed in the BSG medium culture of *Y. lipolytica*, *Y. keelungensis*, and *Y. alimentaria* showed high protein sequence similarity to Aep of *Y. lipolytica* E150 (CLIB122) encoded by *XPR2* (Table S1). The amino acid sequence of the *Y. lipolytica* enzyme complex of 130 kDa and 110 kDa was 40% and 44% aligned to the sequence of Aep, respectively. Moreover, the protein sequence coverage of the *Y. alimentaria* enzyme complex (130 kDa) and *Y. keelungensis* enzyme (30 kDa) to Aep reached 42% and 35%, respectively.

In the analysis of these results, two factors were important. First, we used public databases of fungal proteins to analyze the proteomic data, but the proteomes of *Yarrowia* species are not available, except those of *Y. lipolytica* strains. Despite this, the results of the proteomic analysis confirmed close affinity between *Yarrowia* species. Moreover, matched

peptide sequences were found in the position range of 158–454, corresponding to the proper chain of Aep, which is converted into the active form of the enzyme upon signal peptide and propeptide cleavage.

The proteolytic enzyme of *Y. osloensis* (65 kDa) and *Y. parophonii* (65 kDa) were, to a great extent, 32% and 26%, respectively, aligned to alkaline extracellular protease of *Yarrowia* sp. E02 and *Yarrowia* sp. B02, while sequence coverage of *Y. porcina* (30 kDa) protease to the Carboxypeptidase of *Y. lipolytica* YB392 coded by B0171DRAFT_162965 gene reached 25%. The full set of *Yarrowia* clade enzymes proteomic analysis results is available in the Supplementary Materials (Table S1).

2.8. Antioxidant Activity of BSG Protein Hydrolysates

Three methods were applied in order to estimate the antioxidant activity of BSG protein hydrolysates obtained in the cultures of *Yarrowia* clade species. Significant antioxidant activity was detected using the ABTS method. The highest activity, reaching 2606.13 μM TEAC/g, was detected in the *Y. divulgata* culture medium (Figure 9). This result was followed by the activity of *Y. galli*, *Y. keelungensis*, and *Y. lipolytica* samples, reaching 1771.87 μM TEAC/g, 1730.73 μM TEAC/g, and 1722.63 μM TEAC/g, respectively. It was more than twice higher than the activity of the control sample (603.73 μM TEAC/g). According to our previous research, the antioxidant activity of the control samples is caused by the partial hydrolysis of BSG protein occurring during media sterilization [32]. High antioxidant activity of post-culture media of *Y. galli*, *Y. keelungensis*, and *Y. lipolytica* strains resulted mainly from the efficient hydrolysis of spent grain protein (DH% > 60%), which is not the case of *Y. divulgata*, where DH% did not exceed 30%.

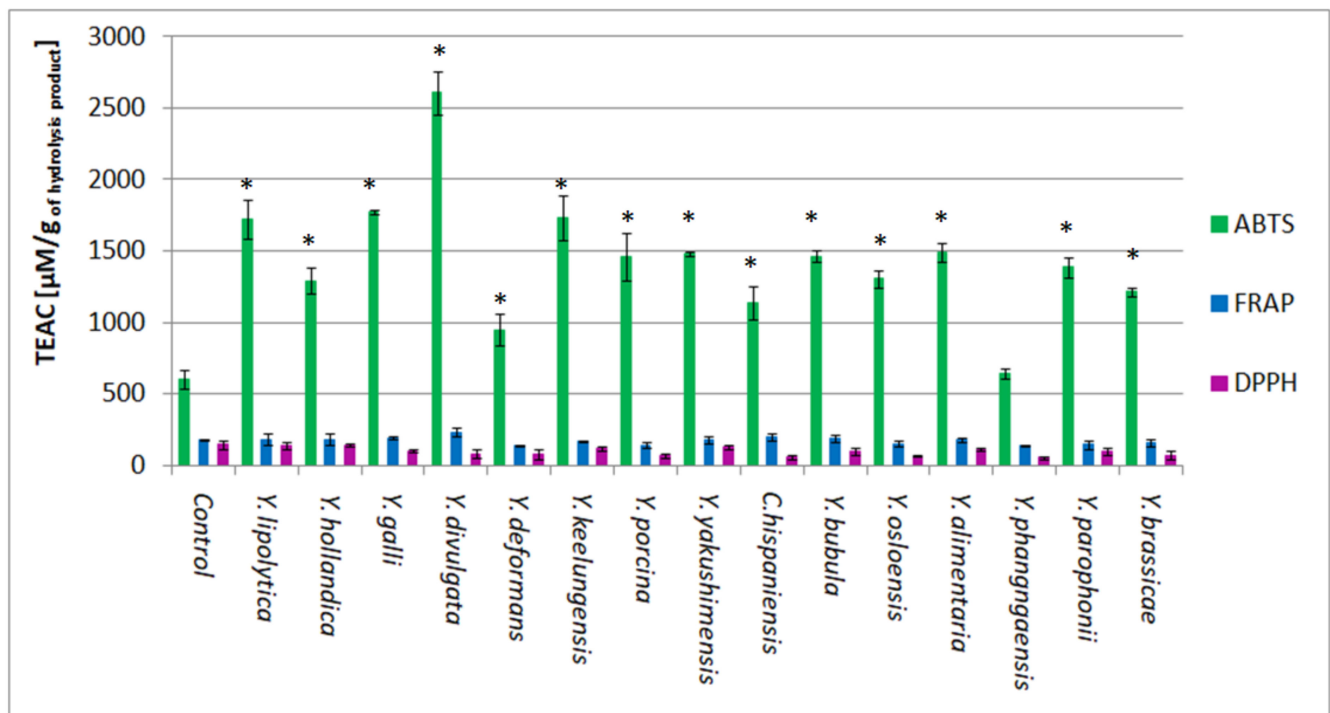


Figure 9. Comparison of antioxidant activity of BSG protein hydrolysates obtained in different yeast species cultures belonging to the *Yarrowia* clade. The results are presented as mean values \pm SD. $n = 3$. The significance level was set at $* p < 0.05$.

In studies where protein hydrolysis is carried out directly in microbial cultures, the antioxidant activity of hydrolysates may be affected by the products of microbial metabolism. BSG is a waste material containing, in addition to protein, cellulose (17–25%), non-cellulosic carbohydrates (25–35%), lignin (8–28%), lipids (10%), and ash (5%) [39]. Therefore, due to the hydrolysis, other compounds, such as phenolics, may be exposed or released to

the culture medium affecting the antioxidant activity of hydrolysate [40]. *Y. divulgata* is the object of extensive studies concerning erythritol production [22,41]. According to den Hartog et al. (2010), erythritol was recognized to possess strong antioxidant activity [42]. Therefore, simultaneous production of erythritol as a process accompanying BSG protein hydrolysis should be considered possible.

In our previous work, the antioxidant activity of BSG protein hydrolysates, obtained using the ABTS method directly in proteolytic bacteria cultures, ranged from 345.18 to 1621.31 $\mu\text{M TEAC/g}$ peptides [32]. In this work, most of the analyzed samples showed a total activity of about 1500 $\mu\text{M TEAC/g}$. Therefore, using some *Yarrowia* clade yeast proteolytic enzymes allowed us to obtain hydrolysates with higher antioxidant activity compared to bacterial enzymes. It is likely related to DH%, reaching higher values in the yeast cultures, showing that high antioxidant activity is strongly associated with a high degree of protein breakdown.

The other two methods did not demonstrate the significant antioxidant activity of hydrolysates compared to the control. The best result obtained using the DPPH method is 144.90 $\mu\text{M TEAC/g}$ in the culture medium of *Y. hollandica*, i.e., almost 10 times lower than the activity detected using the ABTS method (Figure 9). The antioxidant activity of *Yarrowia* clade culture samples did not reach the control activity (147.80 $\mu\text{M TEAC/g}$). However, these results align with the work of Wołosiak and colleagues [43], in which the limitation in the solubility of peptides and amino acids in the system of DPPH assay (free radical resuspended in ethanol solution) is underlined. In addition, numerous problems related to the formation of iridescence in the presence of amide compounds were described. Therefore, the authors recommended the ABTS method as appropriate for the research on the samples containing significant quantities of peptides. On the other hand, due to large differences in the DPPH and ABTS systems, when possible, it is still advisable to apply both methods.

The antioxidant activity of BSG protein hydrolysates was evaluated using a ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay in the work of Vieira and colleagues [44]. Activities of hydrolysates reached 0.062 mg TE/mg dw (247.71 $\mu\text{M TEAC/g}$), 0.098 mg TE/mg dw (391.55 $\mu\text{M TEAC/g}$), and 0.101 mg TE/mg dw (403.53 $\mu\text{M TEAC/g}$) when using brewery spent yeast extract, neutrase, and alcalase, respectively, for hydrolysis purposes. According to Vieira and colleagues, FRAP of protein hydrolysates depends not only on the molecular size of peptides but on the presence of specific peptide sequences and the amino acid composition of the hydrolysis products.

Antioxidant activities measured in *Yarrowia* clade cultures ranged between 140–240 $\mu\text{M TEAC/g}$ using the FRAP method, with the highest result obtained for the hydrolysate of *Y. divulgata* (233.13 $\mu\text{M TEAC/g}$) (Figure 9). In addition, the obtained activities were not significantly different from the control sample (181.46 $\mu\text{M TEAC/g}$). Presumably, due to their chemical properties, the peptides in our samples did not precipitate in the reduction reaction of Fe^{3+} into Fe^{2+} as electron donors, which is the basis of the FRAP method.

Nowadays, antioxidant peptides are increasingly applied in the production of nutraceuticals and functional food ingredients [45], pharmaceuticals [46], and in the field of dermatology [47]. As an aging population, we search for ingredients of increased potency. Therefore, peptides of the activity that result in diminished lines and wrinkles, smoother skin texture, and reduced redness and skin discoloration are highly sought after in the skincare industry [47]. Moreover, the unstable and reactive nature of free radicals results in cell damage leading to diseases such as hypertension, cardiovascular disease, cancer, diabetes mellitus, and neurodegenerative and inflammatory diseases. Therefore, antioxidant peptides protect the body by scavenging free radicals and inhibiting lipid peroxidation reactions, thus preventing oxidative damage [46]. In addition, antioxidant peptides are also applied in food systems to preserve food products against lipid oxidation leading to the development of undesirable off-flavors, odors, and potentially toxic reaction products [45]. Therefore, we believe that the peptides obtained as a result of BSG protein hydrolysis can be used in the food, pharmaceutical, and medical industries.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals, Microorganisms, and Materials

Ninhydrin (analytical grade), Trizma[®] base ($\geq 99.9\%$), Trichloroacetic acid (TCA, $\geq 99.0\%$), Triton X-100 (analytical grade), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS; $\geq 99\%$), Bromophenol Blue (analytical grade), 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS, $\geq 98\%$), potassium peroxodisulfate ($\geq 99\%$), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, $\geq 97\%$), iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\geq 97\%$), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ, $\geq 98\%$), Coomassie Brilliant Blue R 250 were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and 4 \times Laemmli Sample Buffer was purchased from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). All other chemicals used in the following studies were of analytical grade.

Yarrowia clade species: *Y. lipolytica* W29, *Y. hollandica* CBS 4855, *Y. galli* CBS 9722, *Y. phangngaensis* CBS 10407, *Y. deformans* CBS 2071, *Y. keelungensis* CBS 11062, *Y. porcina* CBS 12935, *Y. yakushimensis* CBS 10254, *Candida hispaniensis* CBS 9996, *Y. bubula* CBS 12934, *Y. osloensis* CBS 10146, *Y. alimentaria* CBS 10151, *Y. divulgata* CBS 11013, *Y. parophonii* CBS 12427, and *Y. brassicae* CBS 15225 were purchased from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, The Netherlands), stored in YPD (agar (15 g/L), bacteriological peptone (20 g/L), glucose (20 g/L), yeast extract (10 g/L)) slants and cultured in YPD broth at 25 °C, 180 rpm for 24 h before use.

BSG, used as a nutrient source and factor inducing the proteolytic enzyme secretion, was purchased from the Polish brewery Browar Stu Mostów (Wrocław, Poland), where it was collected after wort production. Initial wort was obtained from the malt composed of 30% barley and 70% wheat grains and therefore contained various proteins. Initially, in order to protect the raw material from the development of contaminating microflora, raw BSG was dried at 50 °C for approximately 48 h. During this process, the material was periodically mixed and controlled in terms of humidity.

3.2. Bioinformatic Analysis of *Yarrowia* Clade Proteolytic Enzymes

Protease sequences were extracted from the *Yarrowia* genomes previously published by Červenák and colleagues [48] by sequence homology to alkaline extracellular protease XPR2 (YALIA101S03e00364g) from *Y. lipolytica* A101. The blastp threshold for E-value was set to 1×10^{-20} . Protein sequences were aligned using Clustal Omega [49] in the multi-platform graphical user interface Seaview version 4.6.2 [50]. Gblocks [51] was used to select blocks of conserved sites useful for phylogenetic analysis. Trees were reconstructed by maximum likelihood using PhyML 3.0 [52] with an LG evolutionary model. Robustness of the trees was assessed by the approximate likelihood ratio test approach (aLRT). Synteny analyses were done manually using Artemis genome browser [53].

3.3. Analysis of Alkaline Proteases Expression in *Y. lipolytica* Grown in Various Culture Conditions and Prediction of Putative Signal Peptide

Previously published data [26] were used to estimate the expression level of each *Y. lipolytica* W29 alkaline protease on yeast nitrogen base (YNB) with oleic acid, glucose, and tributyrin. Additional unpublished data from cDNA sequence analysis (Neuvéglise and colleagues) were used for analyzing the expression of the same genes in YPD and YPD at pH 4.0. Signal peptide predictions were performed with SignalP-5.0 [54] and DeepLoc-1.0 [55].

3.4. Analysis of Alkaline Proteases Expression in *Y. lipolytica* Grown on Spent Grains

The analysis of gene expression encoding verified and putative alkaline protease in *Y. lipolytica* was performed in the yeast cells growing on BSG according to the methodology described in Section 3.5. After 72 h of culture, the biomass was filtered through Whatman filters and collected into 50 mL Falcon tubes. The biomass was divided into 2 mL samples, centrifuged at 15,000 rpm for 1 min, washed 3 times with sterile distilled water, and frozen in

liquid nitrogen. RNA was extracted from three biological replicates using RNeasy Micro Kit (Qiagen; Santa Clarita, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The obtained RNA was DNase digested (Thermo Fisher, Waltham, MI, USA) for reverse transcription reaction using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). The obtained cDNA was a template for PCR reaction using Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) and primers listed in Table 5. Similarly, expression of *Y. deformans* YADE0S25e00298g gene was analyzed following the above-described methodology. Actin gene (ACT1, YALI0D08272g) was chosen as a housekeeping gene in this analysis.

Table 5. Primers used for alkaline proteases expression analysis.

No	Gene	Primer Name	Sequence
1	YALI0F31889	qXPR2-F	AATCCAGAAGCTGGACTCTC
		qXPR2-R	CTCGGGGAGAGACACAATG
2	YALI0A06435	qA06435-F	TGCTTGGAAGCTGCGATATG
		qA06435-R	AGGGAGCGTCCAGTTCTTC
3	YALI0A08360	qA08360-F	CATCTTCAAGGACGGTGTTC
		qA08360-R	TGGTGACCAAGTCGGAGAAC
4	YALI0A09262	qA09262-F	GTATCAAGACCGCCTTTGAC
		qA09262-R	GTACCCTGGTACACGTTCTG
5	YALI0A10208	qA10208-F	CCAACAATACTGCAGGAAACG
		qA10208-R	AAATACGAGCCAGGTGATAGG
6	YALI0B02794	qB02794-F	CGATCGACTCTGGCATTG
		qB02794-R	TTCGACAGCGAAATCACCTC
7	YALI0B16500	qB16500-F	CTCACGAGTTGTGGGTTGAG
		qB16500-R	GTAGGCAATGTCCTTGTGTC
8	YALI0B19316	qB19316-F	GGATACCACGGGCTGTTTG
		qB19316-R	CCGGTTGACCTGGTTATCTC
9	YALI0B22880	qB22880-F	GTCGACGCGTTCACTGATG
		qB22880-R	ACTGGAAGTCTCGCTTGTG
10	YALI0B22990	qB22990-F	CGAGTCTGCTGTTGACATTG
		qB22990-R	ACCCGAATATTTTGAAGCCATC
11	YALI0C15532	qC15532-F	AAGGCATCACTGCTGACTTC
		qC15532-R	GGGAGCTGATCACAGTAGAC
12	YALI0C20691	qC20691-F	CTGACCTCGACTCTGACATC
		qC20691-R	AAAGGCATTGAGAGCATGTG
13	YALI0D02981	qD02981-F	CGAAGAGGACCGGTACATTG
		qD02981-R	GGTTCACGATGGTGGAGTTG
14	YALI0E28875	qE28875-F	AGACTCGAGAGGAGCACTAC
		qE28875-R	CTGTGTCGGCAGAGAAGTTG
15	YALI0F19646	qF19646-F	ACGTCGGAACCTTTTCCAAC
		qF19646-R	GGGTGTTTCGAGGGTTCTG
16	YALI0F24453	qF24453-F	TGCGTTCGGCAAGTTTAAAG
		qF24453-R	GGACAGTTCAGAGACATCATC

Table 5. Cont.

No	Gene	Primer Name	Sequence
17	YALI0D08272	qAct1-F	CAGTCCAAGCGAGGTATCC
		qAct1-R	TCTTCTCTCGGTTGGACTTG
18	YADE0S25e00298g1_1	qDE-00298-F	TCGCCGAAAGTTCAACTC
		qDE-00298-R	TAGCGTAGCTGCTTGC
19	YADE0S07e01684g1_1	qDE-Act1-F	GCACCACACCTTCTACAAC
		qDE-Act1-R	GAGAAACCGGAGTAGATGGG

3.5. Cultivation of *Yarrowia* Clade Species in the BSG Medium

The analyzed species belonging to the *Yarrowia* clade were cultured in a minimal medium supplemented with BSG as carbon and nitrogen sources to stimulate proteolytic enzyme secretion. Yeast cultures were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of the medium composed of BSG (50 g/L), MgSO₄ (1 g/L), KH₂PO₄ (0.1 g/L), K₂HPO₄ (0.13 g/L), CaCl₂ (0.5 g/L), and FeSO₄ × H₂O (0.01 g/L). After sterilization, the pH of the medium was adjusted to 7.0 by adding sterile 5 M NaOH (addition of approx. 320 µL per flask). Before inoculating the main culture, yeast was grown in YPD medium for 24 h under 180 rpm agitation at 25 °C, centrifuged for 10 min at 7500 rpm, and washed with distilled water. The optical density was standardized to reach OD₆₀₀ = 0.25 in the BSG medium. Non-inoculated medium was cultured under the same conditions and used as a control. Each culture was cultivated for 168 h at 25 °C on a rotary agitation (180 rpm). One milliliter samples were taken every 48 h and analyzed for proteolytic activity, and the concentration of free α-amino groups was estimated. As pH is an important factor affecting the type of proteases produced by *Yarrowia* clade species, appropriate pH measurements were performed.

3.6. Determination of Hydrolysis Efficiency

In order to define involvement of proteases secreted by *Yarrowia* clade species on the availability and solubilization of BSG proteins, %DH was estimated. For this purpose, the concentration of free α-amino groups was determined using ninhydrin method [56]. The maximum concentration of α-amino groups detected for each culture was compared to the data obtained for the protein hydrolysis using hydrochloric acid (total hydrolysis), performed as described previously [32]. The %DH was calculated according to the following equation:

$$\%DH = (BH \times 100) / TH \quad (1)$$

where TH (µg/mL) and BH (µg/mL) are the average concentration of α-amino groups obtained, respectively, as a result of the total hydrolysis (TH) or in the yeast culture (BH) calculated per 1 g of BSG sample.

3.7. Analysis of the Proteolytic Activity

In order to evaluate the proteolytic activity of the yeast species, the method of Anson was applied [57]. Shortly, proteolytic activity was estimated by mixing 0.45 mL of casein (1.1% in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5) with 0.5 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) and 0.05 mL of the analyzed sample. Reaction mixtures were incubated at 55 °C for 10 min, followed by adding 0.5 mL 8% (w/v) TCA to terminate the reaction. For each sample, appropriate negative controls were performed (no enzyme addition). As a positive control, protease from *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich, Germany) was applied. Finally, samples were centrifuged at 12,000 rpm for 15 min, and the absorbance of supernatants was determined at 280 nm. Tyrosine was used as a standard in the concentration range of 0–2 mM/L. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to

release 1 μM of tyrosine per 1 mL of culture medium within 1 min under the experimental conditions.

The proteolytic activity of the *Yarrowia* clade species was also detected using skimmed milk agar plates. For this purpose, the standardized biomass solutions ($\text{OD}_{600} = 1.0$) were spotted (5 μL) on the agar plates containing 2% (w/v) of agar and 10% of sterile skimmed milk (0.5%) (w/v). Inoculated plates were air dried under sterile conditions followed by 24 h incubation at 25 $^{\circ}\text{C}$. Finally, the proteolysis zones were measured. As a control, non-inoculated medium was spotted on the agar plates and incubated under the same conditions. Both types of proteolytic activity measurements were performed in triplicate.

3.8. Estimation of Proteolytic Enzyme Profiles

3.8.1. Determination of the Profile and Molecular Mass of *Yarrowia* Clade Proteases Using Gelatin Zymography and Electrophoresis

Gelatin zymography was carried out according to the methodology described previously [32]. The samples, collected after 72 h of *Yarrowia* clade cultivation in BSG medium, were filtered through 0.45 μm membrane and concentrated using Amicon Centrifugal Filters in order to apply approximately 5 μg of proteins on a gel well. Finally, samples were mixed 1:1 with a Sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.01% bromophenol blue, 2% SDS, and 25% glycerol), cooled down, and subjected to SDS-PAGE with a 10% gel containing 0.1% gelatin. Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA), 10 to 180 kDa was used as a molecular weight standard. The non-inoculated BSG medium was used as a control.

In order to conduct proteomic analysis of secreted proteases, SDS-PAGE electrophoresis was performed. Samples were collected at 72 h, and proteins were precipitated using acetone. Each sample, 400 μL , was cooled down on ice and mixed with 1600 μL of acetone, previously cooled to -80°C . Mixtures were shaken vigorously and incubated at -80°C for 1 h. Samples were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min. Supernatants were discarded, and final protein precipitates were evaporated using vacuum evaporator to remove residual acetone. Protein precipitates were dissolved in the 50 μL of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, in order to obtain 8 times concentrated samples. For strains *Y. divulgata*, *Y. hollandica*, *Y. bubula*, *Y. brassicae*, and *Y. yakushimensis*, the described procedure was not enough to obtain positive result of electrophoresis. The process was thus repeated with 1 mL of the medium concentrated 20-fold.

In order to run the SDS-PAGE, 8- and 20-times concentrated samples were mixed with 4 \times Laemmli Sample Buffer and loaded on 10% gel. Gels were run at 150 V followed by staining with Coomassie Brilliant Blue R250 (40% methanol, 10% acetic acid, 0.1% Coomassie blue) for 1 h and destained overnight (40% methanol, 10% acetic acid). Thermo Scientific™ PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, was applied as a molecular weight standard. Uninoculated BSG medium was used as a control.

3.8.2. Comparative Proteomic Analysis of the *Yarrowia* Clade Proteolytic Enzymes

Protein bands cut out from the SDS-PAGE gels were analyzed in the Laboratory of Mass Spectrometry, Institute of Biochemistry and Biophysics of Polish Academy of Sciences (Warsaw, Poland). Gel pieces were dried with ACN and reduced (treated) with 10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 for 30 min at 57 $^{\circ}\text{C}$. Cysteines were then alkylated with 0.5 M iodoacetamide in 100 mM NH_4HCO_3 (45 min in dark at room temperature). Proteins were digested overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$ with 10 ng/ μL of trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 (Promega). Afterward, samples were concentrated and desalted on an RP-C18 pre-column (Waters), and further peptide separation was achieved on a nano-Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) RP-C18 column (Waters, BEH130 C18 column, 75 μm i.d., 250 mm long). NanoACQUITY UPLC system, using a 45 min linear acetonitrile gradient, was applied. Column outlet was directly coupled to the Electrospray ionization (ESI) ion source of the Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo), working in the regime of data-dependent MS to MS/MS switch with HCD peptide fragmentation. The raw data files were pre-processed

with Mascot Distiller software (version 2.7, MatrixScience). The obtained peptide masses and fragmentation spectra were compared to libraries using the National Center Biotechnology Information (NCBI) non-redundant database nr 20210206 (349124773 sequences; 126215745164 residues), with “other Fungi” filter (16225947 sequences) using the Mascot search engine (Mascot Server v. 2.7, MatrixScience). The following search parameters were applied: enzyme specificity was set to trypsin, fixed modifications: Carbamidomethyl (C), variable modification: Oxidation (M), and one missed cleavage allowed. Finally, offline mass recalibration of peptide and fragment masses in individual LC-MS/MS runs was performed to reduce mass errors, with resulting parent mass window of around 5 ppm and fragment mass window of around 0.01 Da. Decoy Mascot option was activated, but the FDR computations were unsuccessful due to vastness of database and low number of spectra originating from samples of limited complexity. Therefore Mascot-provided score threshold of 45 was used for peptide/protein identification.

3.9. Estimation of Antioxidant Activity of BSG Protein Hydrolysates

The antioxidant activity of the hydrolysates was investigated using two methods based on the depletion of the radical cation, ABTS and DPPH assay, and the FRAP method involving reduction of colorless, oxidized Fe^{3+} form of iron into a blue-colored Fe^{2+} form. All determinations were performed according to Cieurko et al. [58]. Despite a similar mechanism of action, there are significant differences between ABTS and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method, mostly related to the solubility of free radicals. In this research, ABTS radical was dissolved in water. Therefore, it was appropriate to estimate activity of water-soluble antioxidants, while DPPH radical, dissolved in ethanol solution, is more suitable to estimate activity of hydrophobic compounds. According to the work of Wołosiak and colleagues [43], deactivation of DPPH radical occurs predominantly via single electron transfer (SET) and uncommonly by hydrogen atom transfer (HAT), which has a dominant in the neutralization of ABTS radical. Differences in the described inactivation system cause recommendations for using both methods to determine the antioxidant activity of tested compounds. The antioxidant activity was estimated in samples after 120 h of the culture when DH% reached maximum value. Some modifications of DPPH assay were made: 10 μL samples were mixed with 190 μL of 0.1 mM DPPH radical solution in Eppendorf tubes (1.5 mL). Samples were incubated for 30 min in dark conditions, followed by centrifugation at 12,000 rpm for 6 min. After centrifugation, 100 μL of each sample was transferred to the microplate wells, and the absorbance at 517 nm was measured using Tecan instrument (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). As a control, uninoculated medium incubated in the same conditions was used. Trolox (a synthetic analog of α -tocopherol) was used to estimate Trolox equivalent antioxidant capacity. Standard curves were prepared for 0–2000 μM , 0–1000 μM , and 0–400 μM for ABTS, DPPH, and FRAP methods, respectively. The obtained results were calculated per gram of protein hydrolysis products. For this purpose, peptide concentration in every sample was analyzed according to the Lowry method [59], with some modifications. A sample with a value of 10 μL was mixed with 50 μL AB solution and incubated for 10 min at room temperature. AB solution was prepared by mixing reagent A, composed of 0.1 M NaOH and 0.2 M Na_2CO_3 , with reagent B containing 1% sodium citrate in a ratio of 50:1. After 10 min, 5 μL of Folin–Ciocalteu reagent was added to the mixture and incubated for additional 30 min at room temperature. Finally, the absorbance of each sample was measured at 750 nm using Tecan microplate reader. Peptide concentration was measured using peptide digest standard (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA) applied in a concentration range of 0–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results were expressed as mean \pm SD. Statistical significance was determined using Student’s *t*-test. The significance level was set at $p < 0.05$.

4. Conclusions

The major conclusion of this work is that species of the *Yarrowia* clade showed an important diversity of alkaline proteases with different secretion abilities. In addition, the

obtained data showed that the BSG could be used as a substrate for *Yarrowia* clade yeasts to obtain protein hydrolysates with antioxidant activity. Results presented in our work clearly confirm the potential of *Yarrowia* clade species to secrete high amounts of proteases into the growth medium.

The presented research is the basis for scientists who would like to develop knowledge about the proteolytic enzymes of the *Yarrowia* clade leading to their widespread commercial use. Based on the data presented here, further research can be performed on optimizing protease or bioreactor scale production. Another direction of further research may be the development of protease purification technology. In this study, proteolytic enzymes were used to produce bioactive peptides as a consequence of BSG protein breakdown, and hydrolysates with significant antioxidant activity were obtained. We believe that the presented research can contribute to the development of a system of biopeptide production, applied as a nutraceutical and functional food ingredient or as pharmaceutical and active cosmetic ingredients for the skin care industry.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24076514/s1>.

Author Contributions: D.C.: conceptualization, investigation, formal analysis, validation, visualization, methodology, writing—original draft. C.N.: conceptualization, investigation, formal analysis, methodology, writing—review, and editing. M.S.: investigation. Z.L.: formal analysis, methodology, supervision, writing—review, and editing. T.J.: conceptualization, resources, supervision, investigation, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The Article Processing Charge (APC) was financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences. Z.L. received financial support from the Polish National Agency for Academic Exchange within International Academic Partnership Programme under the project: Interdisciplinary international cooperation as the key to excellence in science and education (INCREaSE), Grant No: PPI/APM/2018/1/00013/U/00.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests.

References

1. Van der Walt, J.P.; von Arx, J.A. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1980**, *46*, 517–521. [\[CrossRef\]](#)
2. Sugita, T.; Takashima, M. Yeasts, A Taxonomic Study. *Med. Mycol. J.* **2011**, *52*, 927–929. [\[CrossRef\]](#)
3. Péter, G.; Dlačny, D.; Vasdinyei, R.; Tornai-Lehoczki, J.; Deák, T. *Candida galli* sp. nov., a new yeast from poultry. *Antonie van Leeuwenhoek* **2004**, *86*, 105–110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Kurtzman, C.P. New species and a new combination in the *Hyphopichia* and *Yarrowia* yeast clades. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **2005**, *88*, 121–130. [\[CrossRef\]](#)
5. Péter, G.; Nagy, E.S.; Dlačny, D. Systematics, diversity and ecology of the genus *Yarrowia* and the methanol-assimilating yeasts. In *Non-Conventional Yeasts: From Basic Research to Application*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 297–339. [\[CrossRef\]](#)
6. Quarterman, J.; Slininger, P.J.; Kurtzman, C.P.; Thompson, S.R.; Dien, B.S. A survey of yeast from the *Yarrowia* clade for lipid production in dilute acid pretreated lignocellulosic biomass hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 3319–3334. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Michely, S.; Gaillardin, C.; Nicaud, J.M.; Neuvéglise, C. Comparative Physiology of Oleaginous Species from the *Yarrowia* Clade. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63356. [\[CrossRef\]](#)
8. Madzak, C. *Yarrowia lipolytica* strains and their biotechnological applications: How natural biodiversity and metabolic engineering could contribute to cell factories improvement. *J. Fungi* **2021**, *7*, 548. [\[CrossRef\]](#)
9. Groenewald, M.; Boekhout, T.; Neuvéglise, C.; Gaillardin, C.; Van Dijck, P.W.M.; Wyss, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *40*, 187–206. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Park, Y.K.; Ledesma-Amaro, R. What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry? *Trends Biotechnol.* **2022**, *41*, 242–254. [\[CrossRef\]](#)

11. Liu, H.H.; Ji, X.J.; Huang, H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1522–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zinjarde, S.S. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chem.* **2014**, *152*, 1–10. [[CrossRef](#)]
13. Glover, D.J.; McEwen, R.K.; Thomas, C.R.; Young, T.W. pH-regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **1997**, *143*, 3045–3054. [[CrossRef](#)]
14. Ogrydziak, D.M.; Demain, A.L.; Tannenbaum, S.R. Regulation of extracellular protease production in *Candida lipolytica*. *BBA Gen. Subj.* **1977**, *497*, 525–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Matoba, S.; Ogrydziak, D.M. A novel location for dipeptidyl aminopeptidase processing sites in the alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6037–6043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Enderlin, C.S.; Ogrydziak, D.M. Cloning, nucleotide sequence and functions of XPR6, which codes for a dibasic processing endoprotease from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **1994**, *10*, 67–79. [[CrossRef](#)]
17. Ogrydziak, D.M. Yeast extracellular proteases. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1993**, *13*, 1–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Akpınar, O.; Uçar, F.; Yalçın, H.T. Screening and regulation of alkaline extracellular protease and ribonuclease production of *Yarrowia lipolytica* strains isolated and identified from different cheeses in Turkey. *Ann. Microbiol.* **2011**, *61*, 907–915. [[CrossRef](#)]
19. Yamada, T.; Ogrydziak, D.M. Extracellular acid proteases produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Bacteriol.* **1983**, *154*, 23–31. [[CrossRef](#)]
20. Young, T.W.; Wadeson, A.; Glover, D.J.; Quincey, R.V.; Butlin, M.J.; Kamei, E.A. The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: Sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology* **1996**, *142*, 2913–2921. [[CrossRef](#)]
21. Rakicka-Pustulka, M.; Miedzianka, J.; Jama, D.; Kawalec, S.; Liman, K.; Janek, T.; Skaradziński, G.; Rymowicz, W.; Lazar, Z. High value-added products derived from crude glycerol via microbial fermentation using *Yarrowia* clade yeast. *Microb. Cell Fact.* **2021**, *20*, 1–18. [[CrossRef](#)]
22. Rakicka, M.; Kieroń, A.; Hapeta, P.; Neuvéglise, C.; Lazar, Z. Sweet and sour potential of yeast from the *Yarrowia* clade. *Biomass Bioenergy* **2016**, *92*, 48–54. [[CrossRef](#)]
23. Ozturk, I. Presence, changes and technological properties of yeast species during processing of pastirma, a Turkish dry-cured meat product. *Food Control.* **2015**, *50*, 76–84. [[CrossRef](#)]
24. Joo, H.S.; Kumar, C.G.; Park, G.C.; Paik, S.R.; Chang, C.S. Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: Production and some properties. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 267–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lynch, K.M.; Steffen, E.J.; Arendt, E.K. Brewers' spent grain: A review with an emphasis on food and health. *J. Inst. Brew.* **2016**, *122*, 553–568. [[CrossRef](#)]
26. Meunchan, M.; Michely, S.; Devillers, H.; Nicaud, J.M.; Marty, A.; Neuvéglise, C. Comprehensive analysis of a yeast lipase family in the *Yarrowia* clade. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e63356. [[CrossRef](#)]
27. Śnieżewski, Ł.; Walczak, E.; Lazar, Z.; Robak, M. Low peptone dose as inducer of alkaline protease promoter used for invertase gene expression in *Yarrowia lipolytica*. *J. Life Sci.* **2012**, *6*, 1100–1108.
28. Ozturkoglu-Budak, S.; Wiebenga, A.; Bron, P.A.; de Vries, R.P. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *237*, 17–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Gardini, F.; Tofalo, R.; Belletti, N.; Iucci, L.; Suzzi, G.; Torriani, S.; Guerzoni, M.E.; Lanciotti, R. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 641–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Atanassova, M.R.; Fernández-Otero, C.; Rodríguez-Alonso, P.; Fernández-No, I.C.; Garabal, J.I.; Centeno, J.A. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* **2016**, *53*, 172–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Braga, A.; Gomes, N.; Belo, I. Lipase induction in *Yarrowia lipolytica* for castor oil hydrolysis and its effect on γ -decalactone production. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 1041–1047. [[CrossRef](#)]
32. Ciuurko, D.; Łaba, W.; Żarowska, B.; Janek, T. Enzymatic hydrolysis using bacterial cultures as a novel method for obtaining antioxidant peptides from brewers' spent grain. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 4688–4700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Suzzi, G.; Lanorte, M.T.; Galgano, F.; Andrighetto, C.; Lombardi, A.; Lanciotti, R.; Guerzoni, M.E. Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *69*, 69–77. [[CrossRef](#)]
34. Ibarruri, J.; Cebrián, M.; Hernández, I. Solid State Fermentation of Brewer's Spent Grain Using *Rhizopus* sp. to Enhance Nutritional Value. *Waste Biomass Valorization* **2019**, *10*, 3687–3700. [[CrossRef](#)]
35. Bessadok, B.; Masri, M.; Breuck, T.; Sadok, S. Characterization of the Crude Alkaline Extracellular Protease of *Yarrowia lipolytica* YITun15. *J. Fish.* **2017**, *11*, 19–24. [[CrossRef](#)]
36. Hernández-Martínez, R.; Sancho-Solano, A.; Loera-Corral, O.; Rojo-Domínguez, A.; Regalado-González, C.; Huerta-Ochoa, S.; Prado-Barragán, L.A. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease produced by *Yarrowia lipolytica*. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **2011**, *10*, 333–341.
37. Gasmí, N.; Ayed, A.; Nicaud, J.M.; Kallel, H. Design of an efficient medium for heterologous protein production in *Yarrowia lipolytica*: Case of human interferon alpha 2b. *Microb. Cell Fact.* **2011**, *10*, 38. [[CrossRef](#)]
38. Hernández-Montañez, Z.; Araujo-Osorio, J.; Noriega-Reyes, Y.; Chávez-Camarillo, G.; Villa-Tanaca, L. The intracellular proteolytic system of *Yarrowia lipolytica* and characterization of an aminopeptidase. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *268*, 178–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Del Río, J.C.; Prinsen, P.; Gutiérrez, A. Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *J. Cereal Sci.* **2013**, *58*, 248–254. [[CrossRef](#)]
40. Verni, M.; Pontonio, E.; Krona, A.; Jacob, S.; Pinto, D.; Rinaldi, F.; Verardo, V.; Díaz-de-Cerio, E.; Coda, R.; Rizzello, C.G. Bioprocessing of Brewers' Spent Grain Enhances Its Antioxidant Activity: Characterization of Phenolic Compounds and Bioactive Peptides. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1831. [[CrossRef](#)]
41. Eszterbauer, E.; Németh, Á. Optimization of Erythritol Fermentation by High-Throughput Screening Assays. *Hung. J. Ind. Chem.* **2022**, *50*, 7–10. [[CrossRef](#)]
42. Den Hartog, G.J.M.; Boots, A.W.; Adam-Perrot, A.; Brouns, F.; Verkooijen, I.W.C.M.; Weseler, A.R.; Haenen, G.R.M.M.; Bast, A. Erythritol is a sweet antioxidant. *Nutrition* **2010**, *26*, 449–458. [[CrossRef](#)]
43. Wołosiak, R.; Drużyńska, B.; Derewiaka, D.; Piecyk, M.; Majewska, E.; Ciecierska, M.; Worobiej, E.; Pakosz, P. Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by abts and dpsh assays—A practical approach. *Molecules* **2022**, *27*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Vieira, E.F.; da Silva, D.D.; Carmo, H.; Ferreira, I.M.P.L.V.O. Protective ability against oxidative stress of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Chem.* **2017**, *228*, 602–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sila, A.; Bougatef, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *J. Funct. Foods* **2016**, *21*, 10–26. [[CrossRef](#)]
46. Danquah, M.; Agyei, D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnol.* **2012**, *1*, 5. [[CrossRef](#)]
47. Fields, K.; Falla, T.J.; Rodan, K.; Bush, L. Bioactive peptides: Signaling the future. *J. Cosmet. Dermatol.* **2009**, *8*, 8–13. [[CrossRef](#)]
48. Červenák, F.; Juríková, K.; Devillers, H.; Kaffé, B.; Khatib, A.; Bonnell, E.; Sopkovičová, M.; Wellinger, R.J.; Nosek, J.; Tzfati, Y.; et al. Identification of telomerase RNAs in species of the *Yarrowia* clade provides insights into the co-evolution of telomerase, telomeric repeats and telomere-binding proteins. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13365. [[CrossRef](#)]
49. Dineen, S.A.; Gibson, D.; Karplus, T.J.; Li, K.; Lopez, W.; McWilliam, R.; Remmert, H.; Söding, M.; Thompson, J.; Higgins, J.D.; et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 539.
50. Gouy, M.; Guindon, S.; Gascuel, O. Sea view version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **2010**, *27*, 221–224. [[CrossRef](#)]
51. Castresana, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* **2000**, *17*, 540–552. [[CrossRef](#)]
52. Guindon, S.; Dufayard, J.F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. [[CrossRef](#)]
53. Carver, T.; Harris, S.R.; Berriman, M.; Parkhill, J.; McQuillan, J.A. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 464–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Armenteros, J.J.A.; Tsirigos, K.D.; Sønderby, C.K.; Petersen, T.N.; Winther, O.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 420–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Thummuluri, V.; Armenteros, J.J.A.; Johansen, A.R.; Nielsen, H.; Winther, O. DeepLoc 2.0: Multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, W228–W234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sun, S.W.; Lin, Y.C.; Weng, Y.M.; Chen, M.J. Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 112–117. [[CrossRef](#)]
57. Anson, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **1938**, *22*, 79–89. [[CrossRef](#)]
58. Ciuurko, D.; Czyżnikowska, Z.; Kancelista, A.; Łaba, W.; Janek, T. Sustainable Production of Biosurfactant from Agro-Industrial Oil Wastes by *Bacillus subtilis* and Its Potential Application as Antioxidant and ACE Inhibitor. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10824. [[CrossRef](#)]
59. Walker, J.M.; Kruger, N.J. The Bradford Method for Protein Quantitation. In *The Protein Protocols Handbook*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; pp. 17–24. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

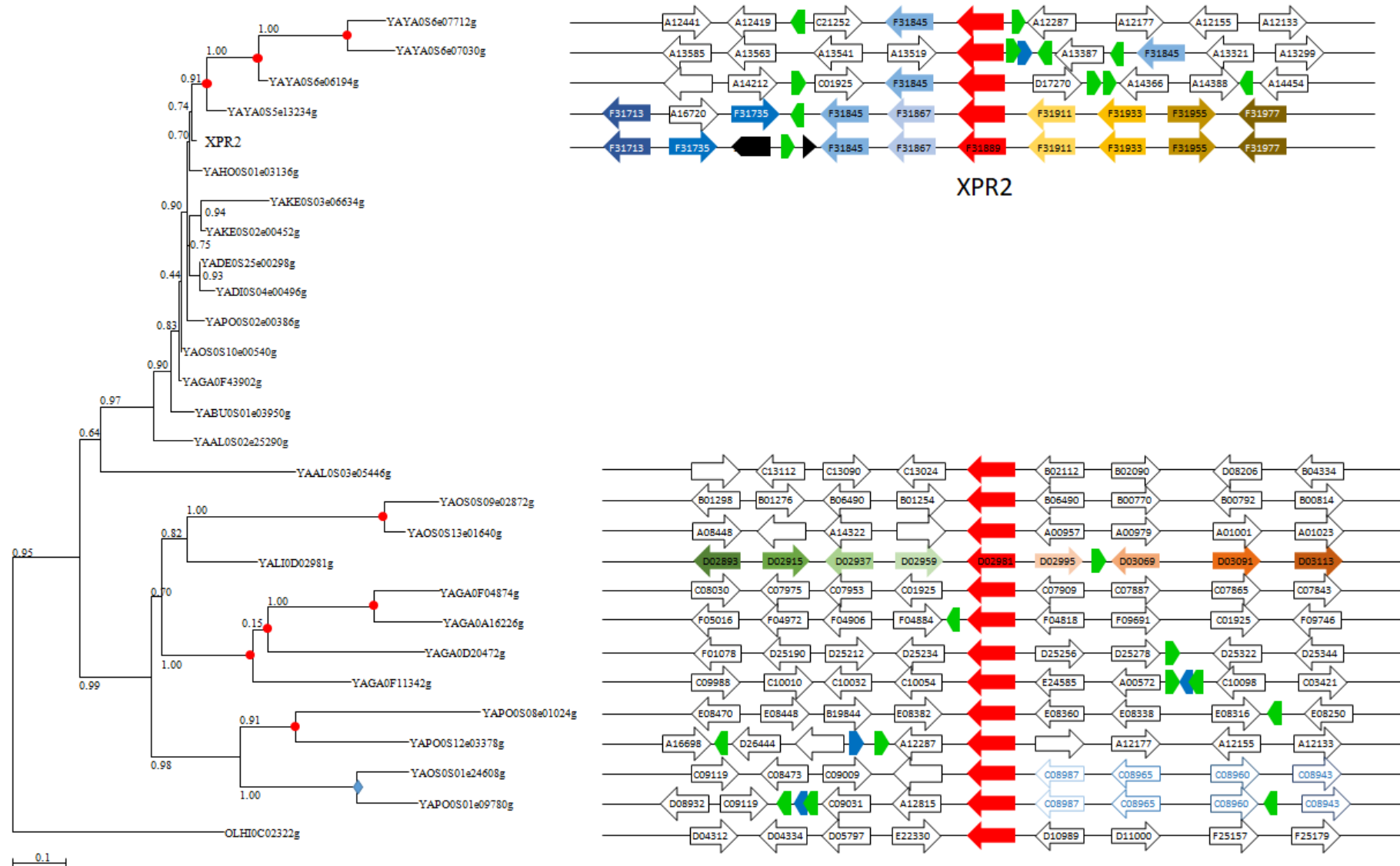


Figure S1. Synteny analysis of alkaline proteases, closely related to *XPR2* homologues emanating from successive duplication events in *Yarrowia* clade species. The phylogenetic tree was constructed from an alignment of 228 amino acids with phyML and a LG evolutionary model. *XPR2* orthologues are in red and flanking genes are in different blue or yellow to brown colours reflecting orthologues in the different species, as in Figure 1. Genes with no homology to each other are represented by white arrows and the name of their homologue in *Y. lipolytica* is written inside. A single exception concerns blue genes inside blue arrows in *Y. osloensis* and *Y. porcina* (see the blue diamond at the ancestral node). Red dots indicate species specific duplications.

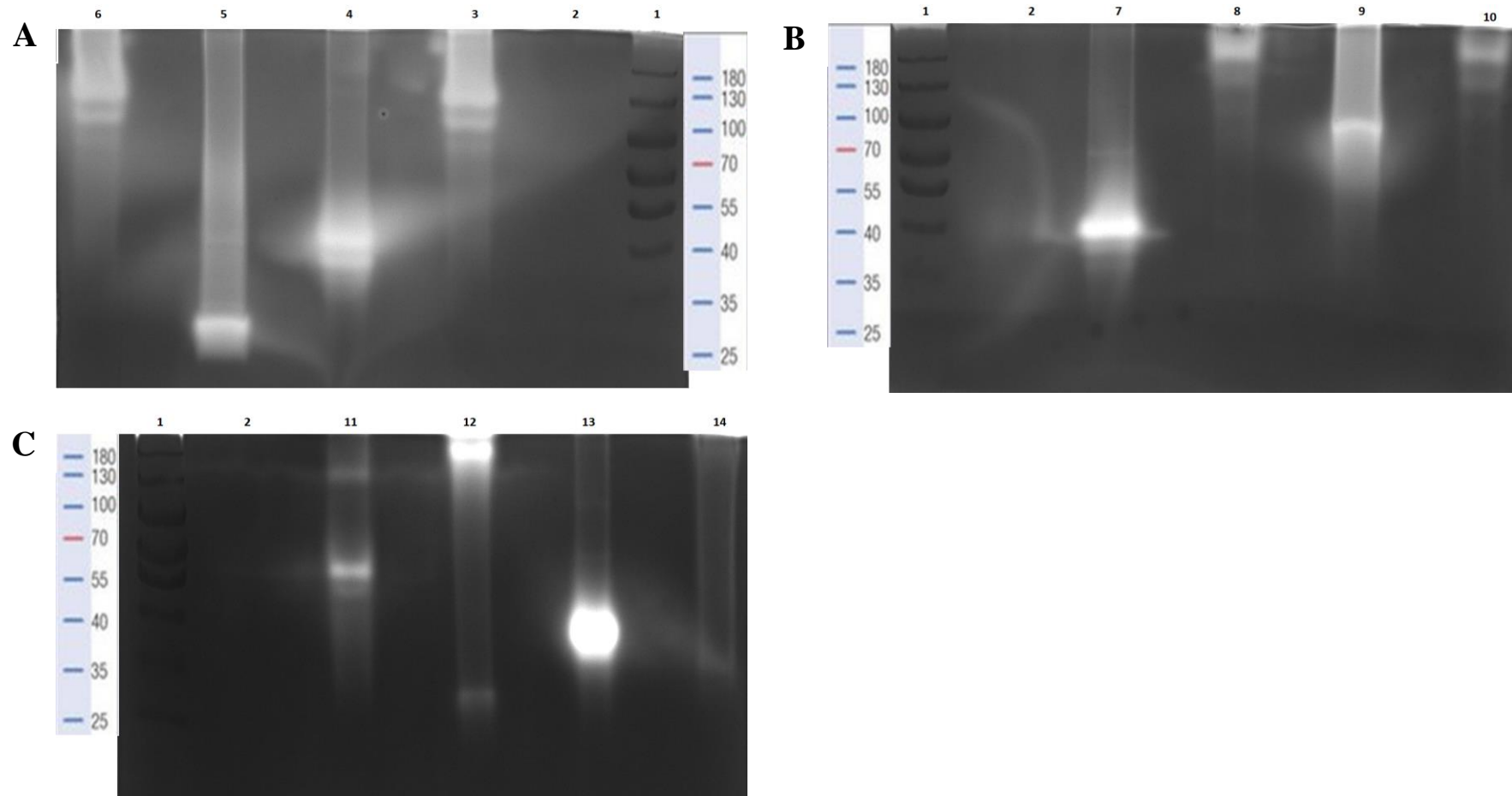


Figure S2. Gelatin zymogram of *Yarrowia* clade's proteolytic enzymes performed on 10% SDS-PAGE. (A) (Lane 1) Molecular mass marker, (lane 2) Control, (lane 3) *Y. lipolytica*, (lane 4) *Y. galli*, (lane 5) *Y. keelungensis*, (lane 6) *Y. alimentaria*. (B) (Lane 1) Molecular mass marker, (lane 2) Control, (lane 7) *Y. parophonii*, (lane 8) *Y. brassicae*, (lane 9) *Y. bubula*, (lane 10) *Y. divulgata*. (C) (Lane 1) Molecular mass marker, (lane 2) Control, (lane 11) *Y. hollandica*, (lane 12) *Y. porcina*, (lane 13) *Y. osloensis*, (lane 14) *Y. yakushimensis*.

Table S1. Results of comparative proteomic analysis of *Yarrowia* clade proteolytic enzymes secreted in the BSG medium.

No.	Host	Accession number	Gene name	Protein name	Size observed on gelatin gel	Taxonomy	Protein sequence coverage [%]	Matched peptide sequence	Peptide location Start-End Point
1.	<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	P09230	YALIOF31889g (XPR2)	Alkaline extracellular protease (AEP)	130	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	40	AIQTPVTQWGLSR	158 – 171
								KAQTGNAYVVR	176 – 186
								AQTGNAYVVR	177 – 186
								HPTVSYYVDSGIR	192 – 204
								TTHSEFGGR	205 – 213
								AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								TYGVDANTK	243 – 251
								TYGVDANTKLVAVK	243 – 256
								LVAVKVFAGR	252 – 261
								SAALSVINQGFTWALNDYISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								GVLNFSGGGPKSASQDALWSR	289 – 309
								SASQDALWSR	300 – 309
ATQEGLLVAIAAGNDAVDACNDSPGNIGGSTSGIITVGSIDSSDK	310 – 354								
2.	<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	P09230	YALIOF31889g (XPR2)	Alkaline extracellular protease (AEP)	110	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	44	AIQTPVTQWGLSR	158 – 171
								KAQTGNAYVVR	176 – 186
								AQTGNAYVVR	177 – 186
								ETVGKHPTVSYYVDSGIR	187 – 204
								HPTVSYYVDSGIR	192 – 204
								TTHSEFGGR	205 – 213
								AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								TYGVDANTK	243 – 251
								TYGVDANTKLVAVK	243 – 256
								LVAVKVFAGR	252 – 261
								SAALSVINQGFTWALNDYISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								SASQDALWSR	300 – 309
ATQEGLLVAIAAGNDAVDACNDSPGNIGGSTSGIITVGSIDSSDK	310 – 354								
GSPNAVAYNGVGI	442 – 454								
3.	<i>Yarrowia keelungensis</i>	P09230	YALIOF31889g (XPR2)	Alkaline extracellular	30	<i>Yarrowia lipolytica</i>	35	AIQTPVTQWGLSR	158 – 171
								AQTGNAYVVR	177 – 186

	CBS 11062			protease (AEP)		CLIB122		HPTVSYVVDSGIR	192 – 204	
				TTHSEFGGR				205 – 213		
				AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK				214 – 242		
				SAALSVINQGFTWALNDYISK				262 – 282		
				GVLNFSGGGPK				289 – 299		
				SASQDALWSR				300 – 309		
				ATQEGLLVAIAAGNDAVDACNDSPGNIGGSTSGIITVGSIDSSDK				310 – 354		
		Q6C080	YALIO_F27071g	Aspartyl protease		<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	22		YDSAASSYK	125 – 134
									FDGILGLAYDTISVNK	186 – 201
									IVPPVYNAVNR	202 – 212
									NQFSFLGDTNK	218 – 229
									GTDGGVATFGGVDEDFEGK	230 – 249
									ITWLPVR	250 – 256
									GWSGQYTVCECDK	310 – 321
		Q6CFP5	YALIO_B05104g	Peptide hydrolase		<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	21		SNLAEFTDFFR	130 – 141
									QVNQLAHGYK	158 – 167
									KPTVEYFAHPWGQPSIAR	172 – 190
									QYFTETK	272 – 278
4.	<i>Yarrowia osloensis</i> CBS 10146			Alkaline extracellular protease	65	<i>Yarrowia</i> sp. E02	32	AVETTPVTQWGLSR	158 – 171	
								ISHKQAQSGNYAYVR	172 – 186	
								QAQSGNYAYVR	176 – 186	
								ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204	
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204	
								TTHSEFGGR	205 – 213	
								AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242	
								TYGVDANAK	243 – 251	
								TYGVDANAKLVAVK	243 – 256	
								LVAVKVFAGR	252 – 261	
								SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282	
		GVLNFSGGGPK	289 – 299							
SASQDALWSR	300 – 309									
		Alkaline				<i>Yarrowia</i>	26	ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204	

				extracellular protease		sp.B02		YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
								TTHSEFGGR	205 – 213
								AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								TYGVDANAK	243 – 251
								TYGVDANAKLVAVK	243 – 256
								LVAVKVFAGR	252 – 261
								SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								GSPNAVAYNGVGL	442 – 454
5.	<i>Yarrowia parophonii</i> CBS 12427			Alkaline extracellular protease	65	<i>Yarrowia</i> <i>sp. E02</i>	32	AVETTPVTQWGLSR	158 – 171
								ISHKQAQSGNYAYVR	172 – 186
								QAQSGNYAYVR	176 – 186
								ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
								TTHSEFGGR	205 – 213
								AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								TYGVDANAK	243 – 251
								LVAVKVFAGR	252 – 261
				SAALSVINQGFTWALNDFISK		262 – 282			
				SAALSVINQGFTWALNDFISKR		262 – 283			
				GVLNFSGGGPK		289 – 299			
				SASQDALWSR		300 – 309			
				ETVGKYPTVAYVVDSGIR		187 – 204			
				YPTVAYVVDSGIR		192 – 204			
				TTHSEFGGR		205 – 213			
				AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK		214 – 242			
				TYGVDANAK		243 – 251			
LVAVKVFAGR	252 – 261								
SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282								
SAALSVINQGFTWALNDFISKR	262 – 283								
GVLNFSGGGPK	289 – 299								
GSPNAVAYNGVGL	442 – 454								
6.	<i>Yarrowia porcina</i> CBS 12935	A0A371CCQ4	B0I71DRAFT_162965	Carboxypeptidase	30	<i>Yarrowia lipolytica</i> YB392	25	AKDPSSLGLDK	75 – 85
								DPSSLGLDK	77 – 85
								QYSGYLDVEDEK	88 – 100

								QYDEYEPMACGK	254 – 265
								GGAPPVLDEPTCENMR	266 – 281
								KECDSGTSLCYK	330 – 341
								ECDSGTSLCYK	331 – 341
								DFICNWLGNK	409 – 418
								WTDELEWFGK	420 – 429
								ELSDWVVDGK	436 – 445
								VYEAGHMVPYDQPK	461 – 474
								NSLEMLNSWLAK	475 – 486
								DYSYGSK	487 – 493
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
								AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								TYGVDANAK	243 – 251
								SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								SASQDALWAR	300 – 309
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
								AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								TYGVDANAK	243 – 251
								SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								SASQDALWAR	300 – 309
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
								AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								TYGVDANAK	243 – 251
								SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								SASQDALWAR	300 – 309
								AIQTPVTQWGLSR	158 – 171
								HPTVSYYVDSGIR	192 – 204
								AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								SAALSVINQGFTWALNDYISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								SASQDALWSR	300 – 309
7.	<i>Yarrowia alimentaria</i> CBS 10151	P09230	YALIOF31889g (XPR2)	Alkaline extracellular protease (AEP)	130	<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	42	AIQTPVTQWGLSR	158 – 171
								KAQTGNAYYVR	176 – 186
								AQTGNAYYVR	177 – 186
								ETVGKHPTVSYYVDSGIR	187 – 204
								HPTVSYYVDSGIR	192 – 204
								TTHSEFGGR	205 – 213
								AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242

								TYGVDANTK	243 – 251
								TYGVDANTKLVAVK	243 – 256
								SAALSVINQGFTWALNDYISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								GVLNFSGGGPKSASQDALWSR	289 – 309
								SASQDALWSR	300 – 309
								ATQEGLLVAIAAGNDAVDACNDSPGNIGGSTSGIITVGSIDSSDK	310 – 354
								GSPNAVAYNGVGI	442 – 454
8.	<i>Yarrowia alimentaria</i> CBS 10151			Alkaline extracellular protease	110	<i>Yarrowia</i> <i>sp.</i> E02	29	ISHKQAQSGNYAYVR	172 – 186
								QAQSGNYAYVR	176 – 186
								ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
								TTHSEFGGR	205 – 213
								AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242
								TYGVDANAK	243 – 251
								TYGVDANAKLVAVK	243 – 256
								LVAVKVFAGR	252 – 261
								SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								SASQDALWSR	300 – 309
								ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
	TTHSEFGGR	205 – 213							
	AVWGANFADTTNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242							
	TYGVDANAK	243 – 251							
	TYGVDANAKLVAVK	243 – 256							
	LVAVKVFAGR	252 – 261							
	SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282							
	GVLNFSGGGPK	289 – 299							
	SASQDALWAR	300 – 309							
	GSPNAVAYNGVGL	442 – 454							
	AIQTPVTQWGLSR	158 – 171							
	HPTVSYYVDSGIR	192 – 204							
	TTHSEFGGR	205 – 213							
	AVWGANFADTQNADLLGHGTHVAGTVGGK	214 – 242							
			P09230	YALIOF31889g (XPR2)	Alkaline extracellular protease (AEP)		<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	28	

								LVAVKVFAGR	252 – 261
								SAALSVINQGFTWALNDYISK	262 – 282
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								SASQDALWSR	300 – 309
								GSPNAVAYNGVGI	442 – 454
9.	Yarrowia galli CBS 9722			Alkaline extracellular protease	40	Yarrowia sp. E02	17	ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
								TTHSEFGGR	205 – 213
								TYGVDANAK	243 – 251
								SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282
								SAALSVINQGFTWALNDFISKR	262 – 283
								GVLNFSGGGPK	289 – 299
								GVLNFSGGGPKSASQDALWSR	289 – 309
	SASQDALWSR	300 – 309							
			Alkaline extracellular protease	40	Yarrowia sp. B02	18	ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204	
							YPTVAYVVDSGIR	192 – 204	
							TTHSEFGGR	205 – 213	
							TYGVDANAK	243 – 251	
							SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282	
							SAALSVINQGFTWALNDFISKR	262 – 283	
							GVLNFSGGGPK	289 – 299	
GSPNAVAYNGVGL							442 – 454		
10.	Yarrowia galli CBS 9722			Alkaline extracellular protease	37-39	Yarrowia sp. B02	22	TTPVTQWGLSR	161 – 171
								ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204
								YPTVAYVVDSGIR	192 – 204
								TTHSEFGGR	205 – 213
								TYGVDANAK	243 – 251
								TYGVDANAKLVAVK	243 – 256
								LVAVKVFAGR	252 – 261
	SAALSVINQGFTWALNDFISK	262 – 282							
	GVLNFSGGGPK	289 – 299							
	GSPNAVAYNGVGL	442 – 454							
			Alkaline extracellular protease	37-39	Yarrowia sp. E02	19	ETVGKYPTVAYVVDSGIR	187 – 204	
							YPTVAYVVDSGIR	192 – 204	
							TTHSEFGGR	205 – 213	

Dominika Czurko

imię i nazwisko

Wrocław, 09.05.2023

(miejscowość i data)

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu,

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Chełmońskiego 37, 51-630,

Wrocław, Polska

afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Czurko D., Neuvéglise C., Szwecławowicz M., Lazar Z., Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications. International Journal of Molecular Sciences: 24 (7), 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>

mój udział polegał na ustaleniu koncepcji, metodologii oraz planu badań. Wykonaniu analizy aktywności proteolitycznej drożdży kladu *Yarrowia* w podłożu suplementowanym w młóto browarniane. Oznaczeniu kinetyki oraz stopnia hydrolizy białka młóta browarnianego. Wyznaczeniu profilu enzymów proteolitycznych kladu *Yarrowia*, przygotowaniu prób do analizy proteomicznej oraz zbadaniu aktywności antyoksydacyjnej pozyskanych hydrolizatów. Byłam odpowiedzialna za analizę i wizualizację otrzymanych wyników, przegląd i dyskusję dotychczasowych doniesień naukowych oraz przygotowanie wersji roboczej manuskryptu.

09.05.2023
Czurko Dominika
data i podpis

Dr. Cécile Neuvéglise

Montpellier, April 28 2023

SPO, Univ Montpellier,
INRAE, Institut Agro,
2 Pl. Pierre Viala
34060, Montpellier, France

STATEMENT

I declare that in the paper:

Ciurko D., **Neuvéglise C.**, Szwechłowicz M., Lazar Z., Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications. International Journal of Molecular Sciences: 24 (7), 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>

my contribution was to prepare a bioinformatics analysis of proteolytic enzymes from the *Yarrowia* clade including construction of the phylogenetic tree and analysis of the synteny as well as revising the manuscript for important intellectual content.



Dr. Cécile Neuvéglise

April 28 2023



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

inż. Maciej Szwechłowicz

Wrocław, 09.05.2023

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., Neuvéglise C., **Szwechłowicz M.**, Lazar Z., Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications. *International Journal of Molecular Sciences*: 24 (7), 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>

mój udział polegał na wykonaniu analizy aktywności proteolitycznej drożdży kladu *Yarrowia* na agarze wzbogaconym w mleko odtłuszczone.

Maciej Szwechłowicz



Załącznik nr 3

Prof. dr hab. inż. Zbigniew Lazar

Wrocław, 08.05.2023

imię i nazwisko

(miejsowość i data)

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., Neuvéglise C., Szwechłowicz M., **Lazar Z.**, Janek T. 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications. International Journal of Molecular Sciences: 24 (7), 6514. <https://doi.org/10.3390/ijms24076514>

mój udział polegał na wykonaniu analizy ekspresji genów domniemanych enzymów proteolitycznych *Y. lipolytica*, analizy bioinformatycznej proteaz kladu *Yarrowia*, w tym konstrukcji drzewa filogenetycznego i badaniu syntenii, jak również krytycznej weryfikacji manuskryptu pod kątem istotnych treści intelektualnych.

podpis

Zbigniew Lazar



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI

Dr Tomasz Janek

Wrocław, 09.05.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., Neuvéglise C., Szwechłowicz M., Lazar Z., **Janek T.** 2023. Comparative Analysis of the Alkaline Proteolytic Enzymes of *Yarrowia* Clade Species and Their Putative Applications. *International Journal of Molecular Sciences*: 24 (7), 6514.

mój udział polegał na ustaleniu koncepcji, metodologii oraz planu badań, krytycznej weryfikacji manuskryptu pod kątem istotnych treści intelektualnych oraz zatwierdzeniu finalnej wersji publikacji.

Tomasz Janek



Article

Sustainable Production of Biosurfactant from Agro-Industrial Oil Wastes by *Bacillus subtilis* and Its Potential Application as Antioxidant and ACE Inhibitor

Dominika Ciurko ¹, Żaneta Czyżnikowska ² , Anna Kancelista ¹ , Wojciech Łaba ¹ and Tomasz Janek ^{1,*}

¹ Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 51-630 Wrocław, Poland

² Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland

* Correspondence: tomasz.janek@upwr.edu.pl; Tel.: +48-71-320-7734

Abstract: The microbial conversion of agro-industrial oil wastes into biosurfactants shows promise as a biomass refinery approach. In this study, *Bacillus subtilis* #309 was applied to produce surfactin using rapeseed and sunflower cakes, the most common oil processing side products in Europe. Studies of the chemical composition of the substrates were performed, to determine the feasibility of oil cakes for surfactin production. Initially, screening of proteolytic and lipolytic activity was performed to establish the capability of *B. subtilis* #309 for substrate utilization and hence effective surfactin production. *B. subtilis* #309 showed both proteolytic and lipolytic activity. The process of surfactin production was carefully analyzed by measurement of the surfactin concentration, pH, surface tension (ST) and emulsification index (E₂₄). The maximal surfactin concentration in the sunflower and rapeseed cake medium reached 1.19 ± 0.03 and 1.45 ± 0.09 g/L, respectively. At the same time, a progressive decrease in the surface tension and increase in emulsification activity were observed. The results confirmed the occurrence of various surfactin homologues, while the surfactin C₁₅ was the dominant one. Finally, the analysis of surfactin biological function exhibited antioxidant activity and significant angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value for ACE inhibition was found to be 0.62 mg/mL for surfactin. Molecular docking of the surfactin molecule to the ACE domains confirmed its inhibitory activity against ACE. Several interactions, such as hydrophobic terms, hydrogen bonds and van der Waals interactions, were involved in the complex stabilization. To the best of our knowledge, this is the first report describing the effect of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by *B. subtilis* for multifunctional properties in vitro, namely the ACE-inhibitory activity and the antioxidant properties, using different assays, such as 2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). Thus, the ACE-inhibitory lipopeptide biosurfactant shows promise to be used as a natural antihypertensive agent.

Keywords: *Bacillus subtilis*; biosurfactant; bioactive lipopeptide; antioxidant; ACE inhibitors



Citation: Ciurko, D.; Czyżnikowska, Ż.; Kancelista, A.; Łaba, W.; Janek, T. Sustainable Production of Biosurfactant from Agro-Industrial Oil Wastes by *Bacillus subtilis* and Its Potential Application as Antioxidant and ACE Inhibitor. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>

Academic Editor: Juan Manuel Ruiz-Lozano

Received: 21 August 2022

Accepted: 12 September 2022

Published: 16 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Surfactants are chemical compounds widely used in industry, due to the ability to reduce surface tension between two phases. A surfactant molecule is built of two functional parts: a polar, hydrophilic head and a tail that is nonpolar and lipophilic. However, surfactants are manufactured with petroleum or derivatives, which contributes to their toxicity [1,2]. The cycle of toxicity includes synthesis, disposal and subsequent, not entirely controlled release to the environment [2]. In the first instance, surfactants released into the environment affect algae and other microorganisms through increased cell membrane permeability and the subsequent disintegration of the cell structure. When the concentration is high enough, a harmful effect is observed in relation to fish, which absorb chemicals

through their body surface, and to animals as well as humans because of meat consumption. Surfactants affect enzyme activity, causing a variety of severe afflictions [3]. Nowadays, due to the high attention to health and increasing environmental awareness, the growing popularity of biosurfactants can be observed.

Biosurfactants possess similar characteristic properties to synthetic surfactants, but are synthesized by living cells; hence, they are environmentally friendly. In addition, biosurfactants are described as compounds easily disintegrated by microorganisms, without posing any ecological harm. They are characterized by low toxicity, high selectivity and a low critical micellar concentration (CMC). Biosurfactants remain active under extreme temperatures, pH and salinity, and can be produced by yeast, filamentous fungi and bacteria from various substrates [4,5]. Classified as secondary metabolites, biosurfactants are produced when the culture reaches a certain physiological state and cell density, under nutrient availability. Biosurfactant synthesis involves various metabolic pathways and normally occurs in the stationary growth phase. However, it may also proceed under optimal growth conditions. Microbial synthesis of the hydrophilic and hydrophobic fractions occurs with the use of the same substrate, but through various biosynthetic pathways [6].

Biosurfactants possess a wide spectrum of medical applications. They can act as antibiotic, antiviral and antifungal agents. Cyclic lipopeptides such as surfactin, fengycin, iturin, bacillomycin and mycosubtilin produced by *B. subtilis*; lichenysin, pumilacidin and polymyxin B secreted, respectively, by *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus polymyxa*; daptomycin from *Streptomyces roseosporus*; and viscosin from *Pseudomonas* are the most widely reported classes of biosurfactants with antimicrobial activity [7].

Moreover, these compounds show antitumor activity and immunomodulatory properties [8]. Biosurfactants also can act as inhibitors of ACE, and therefore they can be applied as antihypertensive agents [9].

The most common classification of biosurfactants is based on the chemical nature. Biosurfactants are classified into glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, phospholipids, fatty acids (FAs), polymeric surfactants and particulate surfactants. Surfactin, one of the most active biosurfactants found in nature, is a bacterial cyclic lipopeptide produced by the genus *Bacillus* [5,10]. *B. subtilis* is the most common producer of surfactin but it can also be found in cultures of *B. pumilus*, *B. licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. The molecule of surfactin is composed of a heptapeptide (ELLVDLL) interlinked with a β -hydroxy fatty acid (FA). The FA chain adopts the form of a cyclic lactone ring and is composed of several carbon atoms ranging from 12 to 16. The molecule contains two negative charges thorough glutamyl and aspartyl residues in the structure of the peptide chain. Usually, several isoforms of surfactin, as a mixture of peptidic variants with a different aliphatic chain length, are secreted [11]. Surfactin represents an exceptionally wide spectrum of activity, which makes it an appropriate compound for medical applications. The antibacterial, antifungal, antiviral and anti-mycoplasmatic effects are only few among the wide range of properties. Surfactin is known to strongly interact with the process of biofilm formation. It prevents bacterial adhesion and decreases the potential for nosocomial *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* infections. In addition, surfactin exhibits strong anti-inflammatory, antitumor and thrombolytic activity [12]. In addition to the properties described above, surfactin has also been related to the inhibition of fibrin clot formation, the induction of ion channel formation in lipid bilayer membranes, the inhibition of cyclic adenosine monophosphate and the inhibition of platelet and spleen cytosolic phospholipase A2 (PLA2) [8].

The type of biosurfactant is strongly influenced by both the substrate and the production microorganism. As reported by Ribeiro et al. [6], the application of alternative carbon sources leads to the production of different chemical structures. In this time of ecological crisis, various industrial by-products are being investigated as potential substrates for biosurfactant production.

As described by Banat et al. [13], biosurfactants can be produced using agro-industrial wastes such as beet or sugarcane molasses, straw of wheat/rice, cassava flour wastewater

and hulls of soy/corn. In addition, animal fats and oil-processing wastes are extensively examined as substrates. There is growing interest in coconut, peanut or soybean cake, oil mill wastewater and canola meal. Biosurfactant production can be carried out with the participation of various residues from the coffee (coffee pulp or husks), fruit (banana waste, fruit pomace, carrot waste) and food (frying edible oils and fats, potato peels) industries.

The purpose of the present study was to produce a lipopeptide biosurfactant from *B. subtilis* #309 using low-cost agro-food wastes. Surfactin production was performed using rapeseed and sunflower cake, the most common oil processing side products in Europe, to maintain the cost-effectivity of the entire process. In order to confirm the suitability of the conditions used for surfactin production, detailed analysis of the substrate and the screening of the proteolytic and lipolytic activity of *B. subtilis* #309 was performed. Moreover, the surfactin was studied as a new potential antioxidant and ACE-inhibitory active substance. Finally, the molecular docking of surfactin was performed to confirm the possibility of surfactin's application as an effective ACE inhibitor.

2. Results and Discussion

2.1. Sunflower and Rapeseed Cake Composition

Sunflower and rapeseed cakes used in this study were characterized by high dry matter content, 93.8% and 93.1%, respectively (Table 1). However, there was a strong variation in the crude protein concentration, reaching 21.4% and 30.2% (in dry matter), respectively, for sunflower and rapeseed cake. Likewise, significant differences in the FA profiles were detected. Sunflower and rapeseed cake were significantly different in terms of oleic and linoleic acid concentrations. The content of oleic acid reached 34.96% and 77.84%, while the linoleic acid concentration totaled 55.67% and 8.05%, respectively, for sunflower and rapeseed cake. Analysis showed the presence of palmitic acid, as a third important fraction in the FA profiles of sunflower and rapeseed cake.

Table 1. Composition of oil seed cakes.

Component	Sunflower Cake	Rapeseed Cake
Dry Matter (DM), (%)	93.8 ± 0.5	93.1 ± 0.5
Crude Protein, (% of DM)	21.4 ± 0.8	30.2 ± 1.2
Fiber		
Neutral Detergent Fiber (NDF), (% of DM)	34.4 ± 1.7	22.6 ± 1.1
Acid Detergent Fiber (ADF), (% of DM)	29.4 ± 1.5	21.0 ± 1.0
Acid Detergent Lignin (ADL), (% of DM)	9.49 ± 0.9	8.79 ± 0.9
FA, (% of DM)	13.5 ± 0.3	12.9 ± 0.5
FA Composition, (%)		
Palmitic C _{16:0}	2.82 ± 0.1	2.44 ± 0.1
Oleic C _{18:1}	34.96 ± 0.2	77.84 ± 0.4
Linoleic C _{18:2}	55.67 ± 0.6	8.05 ± 0.2
Others	6.55 ± 0.2	11.67 ± 0.1
Ash, (% of DM)	5.85 ± 0.4	5.53 ± 0.3

The chemical composition of oil seed cake depends on numerous extrinsic factors, such as genetic traits, cultivation climate, soil and oil production process conditions [14], and hence some strong variations are often observed. According to Gültekin Subaşı et al. [15], the protein and fiber concentrations in sunflower cake vary in the range of 29.0–61.06% and 4.30–45.00%, respectively, while, according to Geneau-Sbartai et al. [14], the protein content varies between 29.4% and 35.0%.

The estimated FA composition of sunflower cake was in line with the results of research performed with the aid of sunflower oil. Studies of Kostik et al. [16] showed linoleic acid (59.5%) as the dominant fraction, followed by oleic (31.5%) and palmitic (3.7%) acid. Chowdhury et al. [17] further confirmed the presence of linoleic (46.02%), oleic (45.39%) and palmitic (6.52%) acid. In the studies of Leming and Lember [18], the estimated protein concentration of rapeseed cake (30.6%) was almost identical to the result obtained

in our research. A comparable result was found in the study of Jeong et al. [19], where the protein concentration reached 31.58%.

The content of oleic acid in rapeseed cake reported in our research was high, compared to the results of rapeseed oil analysis performed by other authors. According to the literature sources, the oleic acid concentration of rapeseed oil totaled 59.5% [16], 61% [20] or 62.5% [21]. Significant differences were also noted in the content of linoleic and palmitic acid. In research involving rapeseed oil, the linoleic acid concentration was estimated at 18.8% [16], 21% [20] or 19.6% [21], and palmitic acid at 5.2% [16], 7% [20] and 4.3% [21].

Due to the high protein concentration and the presence of saturated and unsaturated FA, both sunflower and rapeseed cakes are by-products with great application potential for biosurfactant production, providing the essential chemical constituents. In addition, with reference to the theory of hydrophilic and hydrophobic inducers of biosurfactant production, the FAs of sunflower and rapeseed cakes serve as a secondary carbon source for microbial growth and assist the biosynthesis of the FA moieties of biosurfactant molecules [22]. Moreover, due to the significant variation in the FA profile of the sunflower and rapeseed cake, a study of the FAs' effects on the production of surfactin homologues can be performed.

2.2. Kinetics of Surfactin Production in *B. subtilis* #309 Culture on Oil Cakes

The surfactin production process in the cultures of *B. subtilis* #309 in the sunflower and rapeseed cake medium displayed a similar course. After 24 h, a significant drop in the ST from the initial 46.5 ± 0.3 mN/m to 31.5 ± 0.2 mN/m in the sunflower cake medium and from 48.2 ± 0.3 mN/m to 31.2 ± 0.1 mN/m in the rapeseed cake medium was observed (Figure 1a,b).

Till the end of the biosynthesis process, the ST remained low and stable, reaching minimal values of 30.1 ± 0.1 mN/m and 29.7 ± 0.2 mN/m, respectively. In addition, the emulsification index (E_{24} (%)) increased rapidly after 24 h of *B. subtilis* #309 cultivation, reaching $62.2 \pm 2.1\%$ in the sunflower and $63.2 \pm 0.3\%$ in the rapeseed cake medium. The maximum value of E_{24} (%) was estimated at $66.1 \pm 0.3\%$ and $67.1 \pm 0.4\%$, respectively (Figure 1a,b). A logarithmic increase in the surfactin content was observed. The maximum concentration was detected at 120 h of the culture. In the sunflower cake medium, surfactin production reached 1.19 ± 0.03 g/L, while, in the rapeseed cake medium, the surfactin concentration was nearly 20% higher, quantified at 1.45 ± 0.09 g/L (Figure 1a,b). Surfactin biosynthesis was additionally monitored using the pH value. However, no significant variations were observed. Slight alkalization of the culture medium occurred, from the initial 6.29 ± 0.23 in the sunflower and 6.03 ± 0.14 in the rapeseed cake medium to 8.91 ± 0.12 and 8.98 ± 0.09 , respectively.

Several by-products have been previously studied as substrates for biosurfactant production. Among them, waste automobile oil was applied in cultures of native and chemically mutated strains of *B. subtilis*. The emulsification index (E_{24}) has been used to determine the presence of microbial surfactant. In the culture of the native strain, the emulsification index reached 42%, while the best result, obtained for the mutant *B. subtilis* MS1, totaled 50.53% [23].

In other studies, unconventional substrates, such as waste glycerol, cheese whey, clarified cashew apple juice and sunflower oil, were used for biosurfactant production by *B. subtilis* ICA56. Biosurfactant production by this strain, previously isolated from a Brazilian mangrove soil, occurred with the best efficiency in the waste glycerol medium. In this condition, the produced biosurfactants promoted a significant reduction in the ST (28 mN/m) and the formation of a stable emulsion in motor oil (92%). However, a significant ST reduction (36 mN/m) and relevant emulsification activity (90%) were detected in addition for the sunflower medium broth [24].

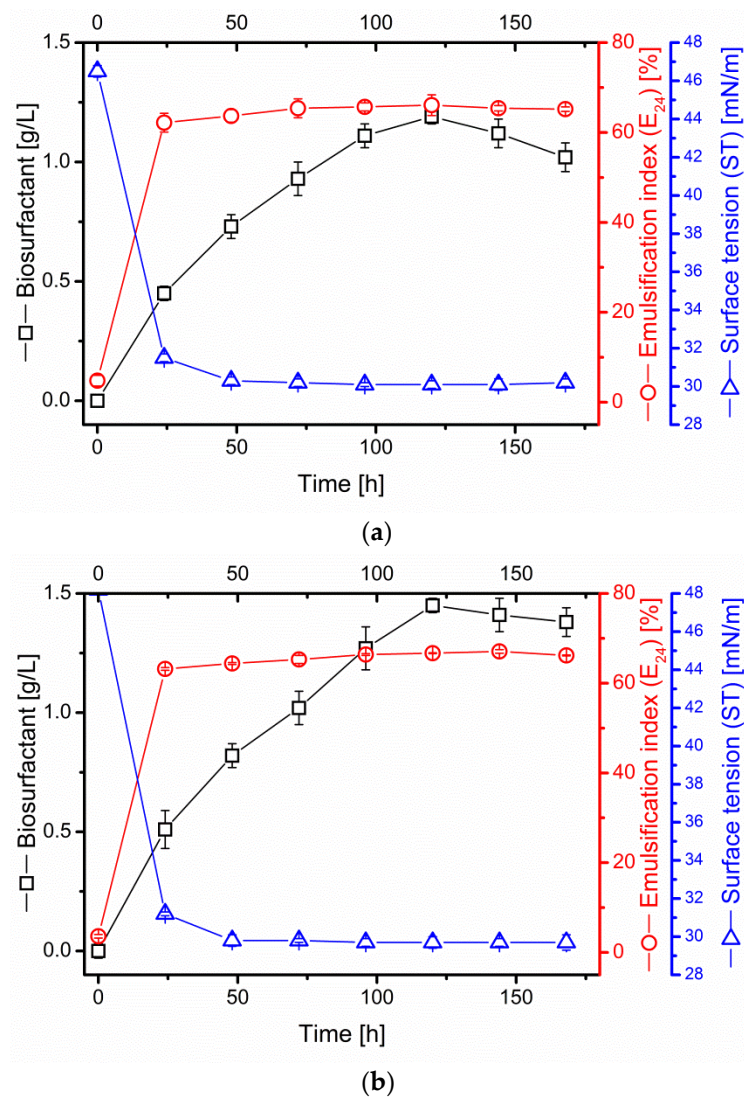


Figure 1. Effect of (a) sunflower and (b) rapeseed oil cake substrates (5% *w/v*) in shake-flask cultures on biosurfactant production, pH, emulsification index (E_{24}) and surface tension (ST). The cultures were performed at 37 °C and 160 rpm for 168 h. The results represent the mean \pm standard deviation of triplicate assays.

Waste frying oils were the subject of interest of Vedaraman and Venkatesh [25]. However, research performed using *B. subtilis* MTCC 2423 as a surfactin producer demonstrated lower usefulness of frying sunflower oil (WFSO) and rice bran oil (WFRBO) compared to oil cakes as substrates. The yield of surfactin production was lower, compared to the studies described in this paper. The surfactin production, after 120 h of bacterial cultivation, reached approximately 0.7 g/L (WFSO) and 0.45 g/L (WFRBO). At the same time, a similar ST reduction, from the initial, approximate value of 60 mN/m to the final value of 31.9 mN/m (WFSO) and 34.5 mN/m, was observed (WFRBO). As in our studies, emulsification of the culture broth, facilitating the microbial access to the substrates, was detected [25].

Solids of waste frying oil were applied by Oliveira and Garcia-Cruz (2013) for biosurfactant production using *B. pumilus* CCT 2487. The best result of surface tension reduction was 45 mN/m. At the same time, the cell-free broth did not form an emulsion with toluene [26]. In another study, olive oil mill waste (OMW), a common residue in the Mediterranean area, obtained after the extraction of olive oil, was applied at three concentrations (2%, 5% and 10%) as a carbon source for surfactin production [27]. However, in the culture of *B. subtilis* N1, a negative impact of the increasing substrate concentration on the surface tension was observed, resulting in its increase from 39.3 mN/m to 46.6 mN/m. Similar

effects were noticed in relation to the lipopeptide production yield. Maximum production (3.12 mg/L) was detected in the culture with the lowest tested substrate concentration (2%). The inhibitory effect of olive oil mill waste for surfactin production was attributed to the abundance of phenolics found in OMW [27].

One more example of the use of oil wastes for biosurfactant production is the work of Abas et al. [28], where the treated palm oil mill effluent (POME) was applied. POME, applied at different concentrations as a carbon source for surfactin production, was efficiently utilized by *B. subtilis* ATCC 21332. The maximal surfactin concentration, quantified in the media containing 50% of POME, was 30–35 mg/L. The results of our study, as well as literature examples, support the suitability of sunflower and rapeseed cakes as substrates for the surfactin production process. We observed a substantial reduction in the ST, a significant increase in the emulsification index and the efficient production of surfactin, at a low production cost. Against the background of the cited examples, the production of surfactin using sunflower and rapeseed cakes is highly efficient. Moreover, such a high yield points to the lack of an inhibitory effect of oil cake compounds on bacterial metabolism.

2.3. The Profile of Proteolytic and Lipolytic Enzymes Involved in Oil Cake Decomposition

Initial screening of the proteolytic and lipolytic activity of *B. subtilis* #309, performed on a skim milk agar plate and tributyrin plate, confirmed the ability of this strain to secrete proteases and lipases. We observed clear hydrolysis zones, surrounding bacterial colonies, both after 24 and 96 h of incubation (Figure 2a,b). Expansion of the hydrolysis zones, indicating the progressive hydrolysis of the substrates, was observed over time.

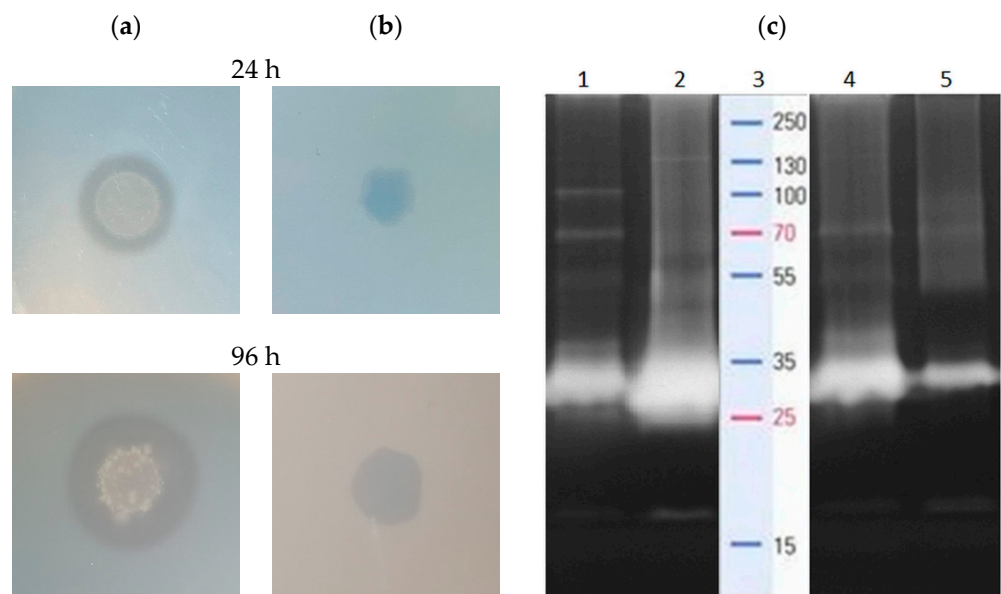


Figure 2. Proteolytic (a) and lipolytic (b) activity of *B. subtilis* #309. (c) Gelatin zymogram shows clear proteolytic bands of protein cleavage on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the hours following *B. subtilis* culture conducted in the rapeseed and sunflower cake medium. Lane 1: rapeseed cake (24 h), lane 2: rapeseed cake (96 h), lane 3: molecular mass marker, lane 4: sunflower cake (24 h), lane 5: sunflower cake (96 h).

B. subtilis #309 protease secretion was strongly induced by the presence of rapeseed cake protein in the culture medium, as determined with zymographic analysis. Although no proteolytic bands were observed after medium inoculation, significant activity was detected in the following hours. A wide spectrum of proteolytic enzymes with relative molecular masses of 130, 100, 70, 50, 40, 28 and 16 kDa were secreted after 24 h of bacterial cultivation (Figure 2c, lane 1). However, in the 96th hour, the intensity of the bands corresponding to the enzymes with molecular weights of 130, 28 and 16 kDa increased markedly, while the visibility of bands representing enzymes with molecular masses of 100,

70 and 55 kDa was clearly reduced (Figure 2c, lane 2). This pointed to the involvement of various proteolytic enzymes at different stages of rapeseed cake utilization. Likewise, several enzymes with molecular weights of 130, 70, 50, 40, 28 and 16 kDa were detected at the early stage of sunflower cake protein decomposition (24 h) (Figure 2c, lane 4). However, the gradual disappearance of the proteolysis band was observed as the process progressed. After 96 h of protein hydrolysis, a single proteolytic band of 28 kDa remained, as evidenced on the zymogram (Figure 2c, lane 5).

The profile of *B. subtilis* PF1 proteolytic enzymes, associated with the biosurfactant production process, was examined in the work of Bhangue et al. [29]. In a medium composed of feather meal, potato peel and rapeseed cake, optimized for proteolytic and amylolytic activity and to maximize biosurfactant yield, the presence of four proteases, ranging from 97.4 to 45 kDa, was confirmed. At the same time, biosurfactant production, described with the emulsification index, reached approximately 40%. The performed research evidenced the production of numerous proteolytic enzymes involved in sunflower and rapeseed cake protein disintegration. The significant activity of the hydrolytic enzymes ensured the accessibility of building compounds essential for surfactin biosynthesis process.

2.4. Surfactin as an Oil Recovery Agent

Surfactin, due to its excellent surface activity, can readily release trapped oil and significantly improve oil recovery. In addition, its considerable emulsification activity facilitates the emulsification of oil released into the mobile phase. These two properties meet the requirements for microbially enhanced oil recovery (MEOR). This points to surfactin as an agent of great potential for application in ex situ processes, supporting oil extraction from reservoirs and oil recovery from contaminated soils [30].

The oil removal efficiency of cell-free supernatants of *B. subtilis* #309 increased gradually with the surfactin concentration. Maximum rates of crude oil recovery, obtained at 120 h of culture, were 31.6% in sunflower and 37.1% in rapeseed cake supernatant (Table 2), in which the respective surfactin concentrations were 1.19 and 1.45 g/L (Figure 1).

Table 2. Percentages of oil recovered with the biosurfactant produced by *B. subtilis* #309 in the medium containing 5% sunflower cake or rapeseed cake.

Raw Material	Time (h)	Oil Recovered (%)
Sunflower cake	0	0.8 ± 0.2
	24	14.5 ± 0.6
	48	23.1 ± 1.1
	72	26.8 ± 0.4
	96	30.4 ± 0.1
	120	31.6 ± 0.8
	144	31.0 ± 1.1
	168	30.4 ± 1.0
Rapeseed cake	0	1.2 ± 0.3
	24	22.6 ± 1.2
	48	25.2 ± 0.8
	72	27.1 ± 0.2
	96	31.3 ± 0.2
	120	37.1 ± 0.9
	144	36.2 ± 0.4
	168	33.1 ± 1.2

In this study, the percentages of oil recovery were analyzed for the unpurified surfactin, due the high cost of the purification process. The intention was to develop a simple and cost-effective procedure, with prospective environmental application. Therefore, the application of cell-free fermentation media, containing significant amounts of highly active biosurfactant, produced on low-cost agri-food residues, fits this concept.

A similar approach was presented in the research of Bezza and Chirwa [31], where the cell free-supernatant containing a lipopeptide biosurfactant, produced in the culture of *B. subtilis* CN2 as the glycerol minimal salt medium (MSM), was investigated. The biosurfactant allowed the removal of $84.6 \pm 7.1\%$ of motor oil from contaminated sands. In another work, the ability of *B. atrophaeus* 5-2a (KP314029) to produce biosurfactants was evaluated using two media: BB containing beef extract, peptone and brown sugar, and BU using brown sugar and urea as the carbon and nitrogen sources. The efficiency of the cell-free fermentation broths for crude oil removal was significant, reaching $94.0 \pm 0.092\%$ (BB) and $90.0 \pm 0.057\%$ (BU) [32].

Another approach was presented in the research of Liu et al. [33], where two standard media, glucose and Luria–Bertani (LB) medium, were applied for surfactin production using modified *B. subtilis* BS-37. At the concentration of 300 mg/L purified surfactin, produced on LB and glucose media, the authors could recover $96.8 \pm 1.0\%$ and $96.7 \pm 1.4\%$ of oil from sand, respectively. However, the use of a genetically modified strain, standard laboratory medium and purified biosurfactant has some drawbacks. In addition to the increased cost of this process, genetic modification and biosurfactant purification processes are time- and work-consuming procedures.

All the aspects of the selected production methodology should be considered before process development. The implementation of genetic engineering and synthetic culture media may positively impact the final oil recovery, but, at the same time, they render the entire procedure unsuitable for large-scale environmental applications.

2.5. The Profile of Surfactin Homologues in the Sunflower and Rapeseed Cake Media

According to the gas chromatography results, the surfactin C₁₅ homologue was the dominant fraction in the sunflower (47%) and rapeseed (53%) cake post-culture media (Figure 3). In both media, the concentration of the surfactin C₁₄ homologue (31–32%) was also detected. However, significant variability in the concentration of the surfactin C₁₃ homologue was noted, reaching 16% in the sunflower and 10% in the rapeseed cake post-fermentation media.

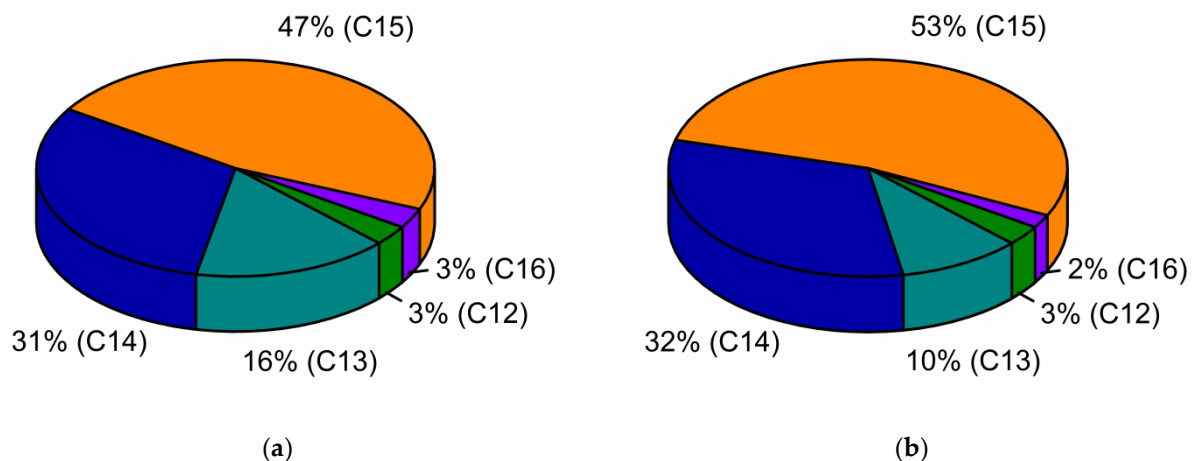


Figure 3. Effect of sunflower cake (a) and rapeseed cake (b) media on the production of surfactin homologues.

In general, the composition of culture media affects the final surfactin homologue's profile, in which the profile of FAs is the most important factor. According to de Oliveira Schmidt [34], FAs, as abundant compounds of sunflower and rapeseed cake, act as hydrophobic inducers of biosurfactant production. The oleic and palmitic acid significantly affected the production of surfactin homologues, while the oleic acid induced the greatest diversity of produced homologues. While the concentration of palmitic acid in the sunflower and rapeseed cake was at the same level, 2.82% and 2.44%, significant differences in

the oleic acid content (34.96% in sunflower and 77.84% in rapeseed cake) certainly affected the final surfactin homologues' distinction (Table 1).

Another factor affecting the hydroxyl FA moiety of surfactin molecules is the amino acid composition in the culture medium [35]. In the media applied in this research, the only sources of amino acids were the hydrolysis products of sunflower and rapeseed cake proteins. Sunflower and rapeseed cake vary in terms of protein concentration (21.4% and 30.2%, respectively) and, most importantly, amino acid composition [36,37]. Hence, as a result of protein hydrolysis, different amino acids were released to the culture media and used in the surfactin molecule biosynthesis process. According to the Hu et al. [35], the presence of Arg, Gln or Val in the culture medium increased the proportion of surfactin homologues with even β -hydroxy FA components (C_{14} and C_{16}), whereas the bioavailability of Cys, His, Ile, Leu, Met and Ser enhanced the odd β -hydroxy FAs' synthesis prevalence.

We demonstrated that variation in the sunflower and rapeseed cake composition affected to a great extent the final proportion of surfactin homologues.

2.6. Antioxidant Activity of Surfactin

Several examples of the use of biosurfactants as antioxidant agents have been previously reported by Nitschke and Silva [38] and Kumar et al. [39]. In another work, the detailed characteristics of surfactin, as an antioxidant agent, were presented. Surfactin, produced in the culture of *B. amyloliquefaciens* NS6, showed both ferric-reducing antioxidant power FRAP and DPPH radical scavenging ability. The reducing capacity of surfactin was lower as compared to that of ascorbic acid, but, at the same time, it was around twice as high as in the case of tested rhamnolipids. Moreover, the radical scavenging activity of surfactin was comparable to that presented by a well-known antioxidant, butylated hydroxyanisole (BHA), commonly used as a preservative in food, food packaging, animal feed, cosmetics, rubber and petroleum products [40]. However, the outcomes of our research contradict the results described above. Surfactin produced by *B. subtilis* #309 showed trace antioxidant activity, measured using FRAP, DPPH and ABTS assays (Table 3).

Table 3. The antioxidant and angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity of surfactin secreted by *B. subtilis* #309.

Surfactin	Antioxidant Activity		
	ABTS	DPPH	FRAP
TEAC [μ M/g]	3.77 \pm 0.22	11.67 \pm 0.8	0.76 \pm 0.096
	ACE-Inhibitory Activity		
IC ₅₀ [mg/mL]	0.62 \pm 0.04		

The lack of surfactin activity against DPPH free radicals was demonstrated in another recently published report by Dussert et al. [23]. Here, commercial surfactin, likely produced by *B. subtilis* SD901 (FERM BP-7666) (according to the patent WO2012/043800), was tested at various concentrations (100, 200, 300, 400 and 500 mg/L) for DPPH radical scavenging activity. Eventually, no inhibitory effect was observed.

The structure of the surfactin molecule could be the reason for such a great difference occurring in the research results of different authors. According to Yalçın and Çavuşoğlu [41], the reduction capacity of lipopeptide biosurfactants, regarding DPPH activity, may be related to the presence of hydroxyl groups in their molecular structure. The chemical structure of surfactin incorporates a common peptide loop of seven amino acids (L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu), although there exist some homologues that vary in terms of their peptide sequence, such as [Val7] surfactin, [Ile7] surfactin, [Ala4] surfactin, [Asp1, Glu5] surfactin [42]. The number of hydroxyl groups in the surfactin molecule is related to the presence of Glu and Asp, and is constant among all homologues. Moreover, as described in the work of Shao et al. [42], the opening of the lactone ring through the hydrolysis and methylation of the peptide loop chain of surfactin may affect

surfactin's properties. Another aspect that can affect the reducing power of surfactin is the presence of hydrophobic amino acids (Val and Leu) and acidic amino acids (Asp and Glu) in its molecule structure [43]. Surfactin homologue [Ala4], containing alanine in the place of Val, may present reduced activity. Therefore, the final antioxidant activity of surfactin may depend on the structural nuances.

2.7. Surfactin as an Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Agent

ACE is a key component of the rennin-angiotensin system, whose main function is the conversion of angiotensin I to angiotensin II, facilitated by the removal of a dipeptide from the C-terminus of angiotensin I. The role of ACE in mammals is related to the maintenance of stable blood pressure and electrolyte balance. Mammalian ACE activity is typically recognized by measuring the reduction in substrate cleavage in the presence of specific ACE inhibitors such as captopril and lisinopril. Most medical applications involve searching for inhibitors capable of regulating ACE activity in relation to the control of hypertension [44].

Surfactin produced by *B. subtilis* #309 revealed a strong inhibitory effect against ACE activity. The IC_{50} value in the performed studies was 0.62 mg/mL (Table 3). In another work, where enhanced biosurfactant production using isolated *B. mojavensis* I4 was described, a similar effect of the lipopeptide biosurfactant on the ACE activity was detected. A biosurfactant mixture, produced under optimal conditions using glucose and glutamic acid, showed concentration-dependent ACE-inhibitory activity. The highest activity was observed at the concentration of 3 mg/mL in a dose-dependent pattern. The IC_{50} value detected for ACE inhibition was similar to that obtained in our studies and reached 0.7 mg/mL. Moreover, the biosurfactant tested in this research exhibited similar retention times of peaks to those of surfactin, suggesting surfactin as a major biosurfactant in the lipopeptide mixture [45].

Biosurfactants' inhibitory activity was analyzed *in vitro* as well as *in vivo*, using an animal model, in the work of Zouari et al. [9]. The lipopeptide mixture used in this study, produced by *B. subtilis* SPB1, was found to comprise surfactin, iturin and fengycin isoforms, as well as two new clusters of lipopeptide isoforms. Lipopeptides, analyzed *in vitro*, exhibited good ACE inhibition activity (IC_{50} value 1.37 mg/mL) in a dose-dependent pattern. Moreover, the administration of *B. subtilis* SPB1 lipopeptides or atorvastatin *in vivo*, to hypercaloric high-fat-high-fructose diet (HFFD) rats, decreased significantly the activity of ACE in serum. Notably, the effect of lipopeptide supplementation was better than that induced by atorvastatin, the conventional medication used to treat high cholesterol and limit the risk of stroke, heart attack or other heart complications in patients with type 2 diabetes, coronary heart disease and other risk factors. When lipopeptides were applied throughout 75 days of the experiment, the reduction in ACE activity in serum reached 42%, while the effect of the final 30 days of supplementation was 27.25%, as compared with rats fed HFFD. In comparison, the administration of atorvastatin reduced ACE activity only by 24% [9].

The obtained results showed the suitability of surfactin for therapeutic or pharmaceutical purposes as an effective antihypertensive agent.

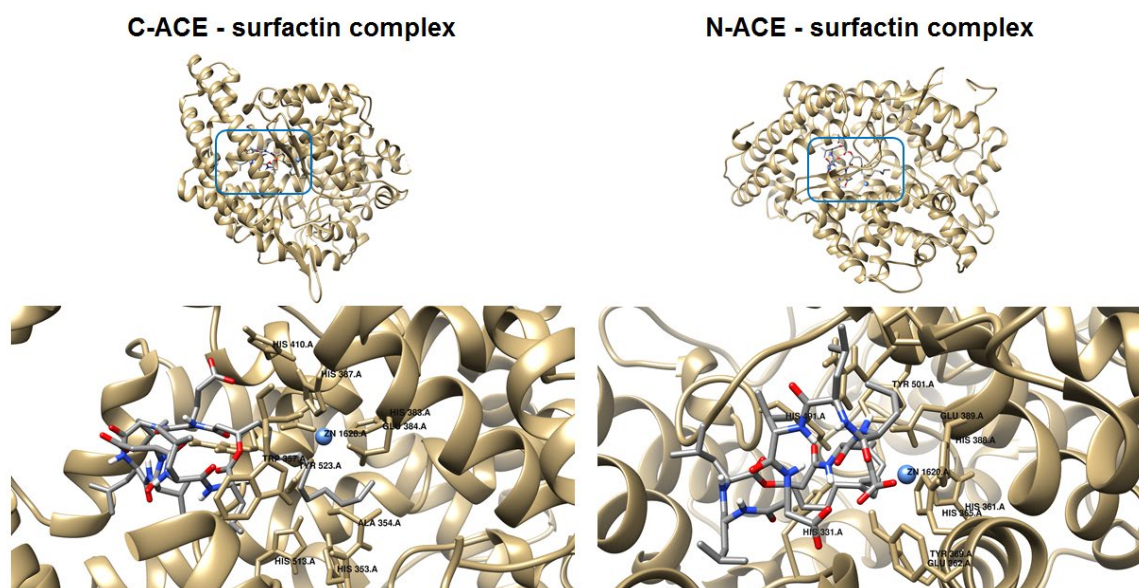
2.8. Molecular Docking of Surfactin C_{15} Homologue to the C- and N-Domains of ACE

The binding affinity of a ligand to the protein-binding site is directly related to the Gibbs energy of binding, which depends on many factors evaluated during molecular docking studies. Due to the properties of the hydrophobic tail, the polar head group and the presence of the donor and acceptor of hydrogen bonds, surfactin- C_{15} could be a potential ACE inhibitor. Therefore, in the present study, we obtained the binding modes of surfactin- C_{15} to the C- and N-domains of ACE. We also analyzed in detail the origins of the stabilization of enzyme-surfactant complexes (Table 4). The results indicated that the origins of stabilization are non-covalent interactions, mainly hydrophobic terms but also hydrogen bonds and van der Waals interactions (with Zn^{2+} ion).

Table 4. The origins of stabilization of ACE domain–surfactin C₁₅ complexes.

Complex	$\Delta G_{\text{binding}}$ [kcal/mol]	$\Delta G_{\text{intermolecular}}$ [kcal/mol]	ΔG_{vdw} ΔG_{hbond} ΔG_{desolv} [kcal/mol]	Electrostatic Energy [kcal/mol]	Hydrogen Bonds	Hydrophobic Interactions
C-ACE–surfactin C ₁₅	−9.5	−17.0	−17.1	0.1	Gly104 Glu123 Arg522	Ala63 Asn66 Asn70 Gly104 Glu123 Trp220 Met233 His353 Ala354 Ser355 Ala356 Trp357 Asp358 Tyr360 His383 Glu384 His387 Glu403 Pro407 His410 Glu411 Ser516 Ser517 Val518 Pro519 Arg522 Tyr523
N-ACE–surfactin C ₁₅	−9.2	−16.7	−16.8	0.1	Asp336 Tyr369	Val36 Ser39 Trp201 Gln256 His331 Ala332 Ser333 Trp335 Asp336 His361 Glu362 His365 Tyr369 Arg381 Gly382 Pro385 His388 Glu389 Tyr489 Phe490 His491 Val492 Asn494 Thr496 Arg500 Tyr501

In both considered cases, the molecules of the surfactant can bind in close proximity to zinc-binding catalytic sites. The interactions with some amino acid residues that are crucial for the molecular recognition process were identified and are presented in Figure 4.

**Figure 4.** Binding mode of surfactin to C-ACE and N-ACE domains.

In the case of binding in the C-domain of ACE, surfactin-C₁₅ is involved in hydrophobic interactions with His353, Ala354, His382, Glu384 and Tyr523, similar to captopril, which is reported as a catalytic ACE inhibitor. Additionally, the amino acids Ala63, Trp220, Met223, Val518 and Pro519 are localized in close proximity to the ligand, which corresponds to the method of binding previously described for ACE inhibitors [46]. As can be seen in Figure 5, in this case, three hydrogen bonds are formed. One of them involves the H-N group of Arg522 and the oxygen atom of surfactin-C₁₅ (2.84 Å). The second hydrogen bond is created between the nitrogen atom of Gly104 and the carboxyl moiety of the lipopeptide. The last hydrogen bond is formed between the oxygen atom of Glu123 and nitrogen of the ligand. According to results, the value of the free energy of binding is equal to −9.5 kcal/mol.

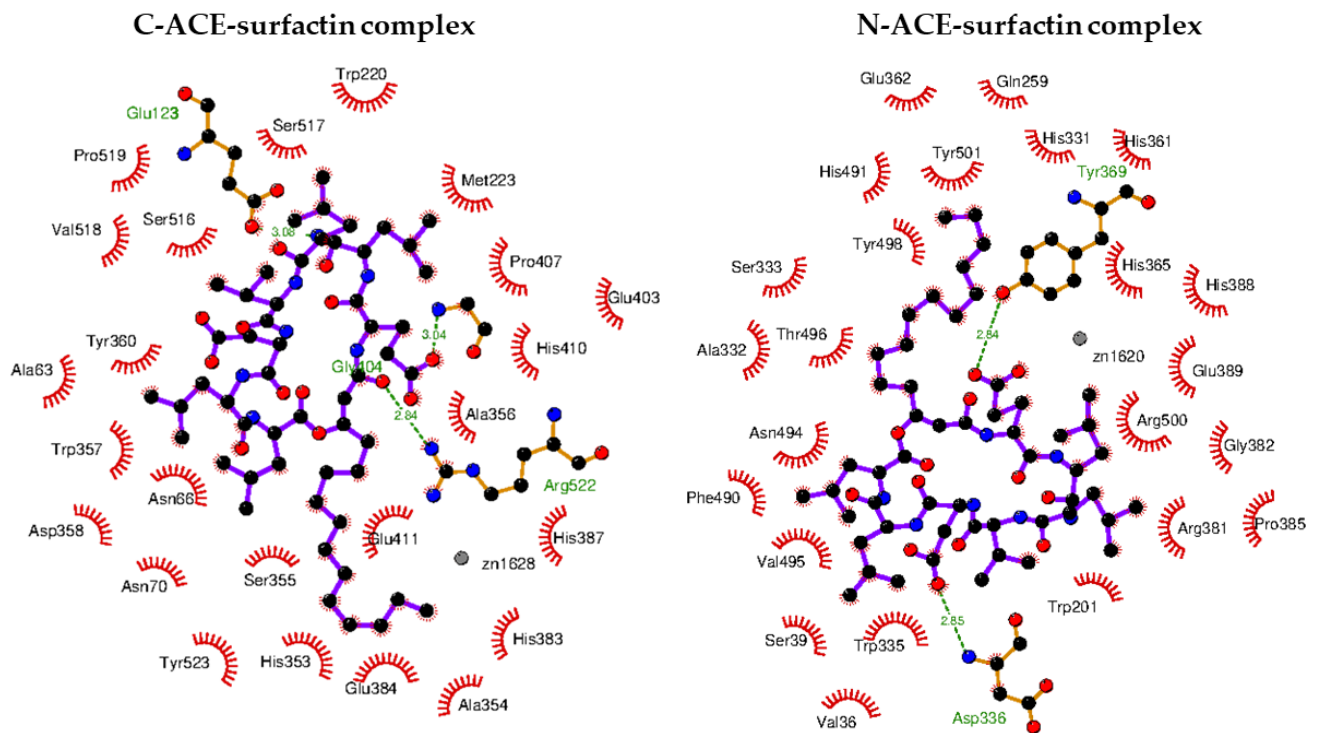


Figure 5. Intermolecular interaction between C-ACE and N-ACE domains with surfactin molecule.

The favorable orientation of the ligand to interact with the zinc-binding catalytic site was also obtained in the case of the N-domain of ACE. This particular orientation is stabilized by hydrogen bonds, hydrophobic forces and van der Waals interactions (Table 4 and Figure 5). The hydrophobic tail of the ligand is located in the cavity formed by His331, Ala322, His491 and Tyr501. The head of the surfactant is surrounded by polar and charged amino acid residues such as Trp201, His365, His388, Asn494, Arg381, Glu389 and Arg500. Carboxyl moieties of surfactin-C₁₅ form two hydrogen bonds with the side chain residues of Asp336 and Tyr369 of donor–acceptor distance 2.85 Å and 2.84 Å, respectively. In this case, the free energy of binding is equal to -9.2 kcal/mol.

3. Materials and Methods

3.1. Oil Seed Cakes and Composition Analysis

The sunflower and rapeseed cake used in this study were obtained after the process of cold pressing of oils as a generous gift from OlejTo, a local Polish company, producing a wide range of oil-based products (Wrocław, Poland).

The chemical composition of oil seed cakes was determined in the National Laboratory for Feedingstuffs, National Research Institute of Animal Production (Lublin, Poland). Dry matter (DM, (%)), neutral detergent fiber (NDF, (% of DM)), acid detergent fiber (ADF, (% of DM)), acid detergent lignin (ADL, (% of DM)) and ash (% of DM) were estimated using gravimetric methods. The crude protein concentration (% of DM) was determined by a Kjeldahl titration method. Sunflower and rapeseed cakes' fatty acid compositions (FAs, (% of DM)) were determined using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). The FAs were esterified at 80 °C for 2 h with a methanol solution of 2.5% (*v/v*) sulfuric acid. Subsequently, fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted with *n*-hexane and analyzed on a GC-MS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Zebron ZB-FAME capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.20 μm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Helium (99.999% purity) was applied as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. According to the program applied, the temperature rose from 100 °C to 210 °C at the rate of 3 °C min⁻¹; split ratio 1:20. The injector was maintained at 250 °C and the electron impact ion source was maintained at 220 °C. The FAs were identified by comparing the

retention time with the FAMES of the commercial standard (Supelco 37 Component FAME mix, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.2. Surfactin Production Process Specificity in the Culture of *B. subtilis* #309 Performed on Oil Seed Cake Medium

B. subtilis #309, used in this study, was originally isolated from a crude oil sample from a Brazilian oil field [47]. The bacterial strain was stored in the form of glycerol stock (20% *v/v*) at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ at the Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences (Wrocław, Poland). In order to perform studies regarding biosurfactant production, *B. subtilis* #309 was cultured in 300 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of the oil cake medium composed of (g/L): sunflower/rapeseed cake (50), MgSO_4 (1), KH_2PO_4 (0.1), K_2HPO_4 (0.13), CaCl_2 (0.5), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.01). Each flask was inoculated using 1% (*v/v*) of *B. subtilis* #309 culture. The bacterial inoculum was grown at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 160 rpm for 24 h in the LB medium, composed of (g/L): NaCl (10), tryptone (10), yeast extract (5), pH 7 (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland). The surfactin production process was conducted for 168 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with rotary agitation (160 rpm). Every 24 h, one flask was collected, centrifuged at $9500\times g$ for 20 min, and the cell-free supernatant was tested for the surfactin concentration (g/L), pH, surface tension reduction (ST, (%)) and emulsification index (E_{24} , (%)).

In order to determine the surfactin concentration, 100 μL of culture supernatant was dissolved in 900 μL of methanol (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) and analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC, (Shimadzu, Kyoto, Japan)) equipped with a Hypersil GOLD column (5 μm ; $4.6\times 150\text{ mm}$). Samples were injected onto a column in a 10 μL value, and eluted with a flow rate of 0.5 mL/min by a 25-min-long program. As the mobile phase, solvent A (0.1% trifluoroacetic acid) and solvent B (0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile) were run according to the following scheme: (% A:B *v/v*): 0 min (50:50), 5 min (20:80), 9 min (10:90), 15 min (0:100), 21 min (0:100), 24 min (50:50) and 25 min (50:50). Detection was performed at $\lambda = 210\text{ nm}$. The surfactin concentration was calculated according to a calibration curve previously prepared with a surfactin standard ($\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Trifluoroacetic acid (99%) and HPLC-grade acetonitrile (99%) were provided by Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA). Surface tension (ST) reduction was determined using du Noüy's ring technique with the aid of a Krüss K6 tensiometer (Krüss, Hamburg, Germany), as described elsewhere [48]. Before each measurement, the tensiometer was calibrated using ultra-pure water. The surface tension of each sample was measured in triplicate at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Emulsification activity, i.e., the ability of the emulsion to retain its structure over a defined time period, was estimated as described previously [49]. Supernatant in the volume of 2 mL was mixed with 2 mL of n-hexadecane in a glass test tube and vortexed for 2 min. The mixture was left to stand for 24 h. Finally, the height of the emulsion layer and total height of the mixtures were measured. Each determination was performed for three independent replications. The stability of the emulsion was calculated according to the following equation:

$$E_{24} (\%) = \frac{\text{height of the emulsion layer}}{\text{total height of the mixtures}} \times 100 \quad (1)$$

3.3. Proteolytic and Lipolytic Properties of *B. subtilis* #309

3.3.1. Skim Milk and Tributyrin Agar Plate Assay

Proteolytic and lipolytic properties are important factors affecting substrate utilization and therefore the final surfactin production. The lipolytic activity of *B. subtilis* #309 was examined on tributyrin agar plates (1% of peptone, 0.5% of yeast extract and 1% of tributyrin). Here, 5 μL of bacterial culture ($\text{OD}_{600} = 1.0$) was spotted on an agar plate and incubated for 24 and 96 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A clear zone around the colonies indicated lipase activity.

The screening for proteolytic activity was conducted using skim milk agar plates. Standardized bacterial culture ($\text{OD}_{600} = 1.0$) was dropped in the volume of 5 μL on the agar plate (2% agar, 10% sterile skim milk (0.5%)). Plates were incubated for 24 and 96 h

at 37 °C. A clear zone surrounding bacterial colonies, on a milky background, pointed to proteolytic activity. Uninoculated media (5 µL) spotted both on the tributyrin and skim milk agar plates served as a control. Assays were performed in triplicate.

3.3.2. Proteolytic Enzyme Profile Determination

Proteolytic enzymes secreted in the rapeseed and sunflower cake medium were analyzed using gelatin zymography. The PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (10 to 250 kDa) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) was applied as a molecular weight standard. Analysis was performed for samples taken at 0 (control), 24 and 96 h of culture and analyzed according to Zhang et al. [50], with our own modifications. Initially, each sample was diluted in the loading buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 25% glycerol, 0.01% bromophenol blue) in a 1:1 ratio. Then, samples were cooled to a temperature of 0 °C and subjected to SDS-PAGE in 10% Tris-glycine SDS-polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin. Electrophoresis was carried out at 150 V, under non-denaturing conditions, with maintenance of a low temperature, preventing excessive digestion of the enzyme migration pathway. Then, gels were washed three times in a 30 min cycle, in Triton solution (2.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl), and incubated overnight in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), containing 5 mM CaCl₂ and 150 mM NaCl, at 28 °C. Finally, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (0.1% Coomassie blue, 40% methanol, 10% acetic acid) for 3 h, and then destained (40% methanol, 10% acetic acid) until a clear proteolytic band against a blue background became visible.

3.4. Oil Recovery Assay

The applicability of the crude biosurfactant produced by *B. subtilis* #309 in enhanced oil recovery was studied using artificially contaminated sand containing 12.5% (*w/w*) crude motor oil. All the experiments were performed in triplicate at room temperature, as described by Gudiña et al. [51].

3.5. Biosurfactant Recovery and Purification

Biosurfactant production was performed according to the methodology described in Section 3.2. Due to the highest surfactin concentration, the production process was terminated after 120 h in both sunflower and rapeseed cake medium. Post-culture medium was centrifuged (9500 × *g* for 20 min at 4 °C) and the supernatant was acidified with 6 M HCl until pH 2.0 to precipitate surfactin. The mixture was kept overnight at 4 °C to facilitate the precipitation process. Afterwards, the mixture was centrifuged at 9500 × *g* for 20 min at 4 °C in order to separate the crude surfactin pellet. The pellet was dissolved sequentially in deionized water, and the pH was adjusted to 7.0 using concentrated NaOH [52]. An additional purification of surfactin was conducted using solid-phase extraction (SPE). Crude biosurfactant solution was loaded onto cartridges of the Chromabond C₁₈ SPE system (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and eluted with acetonitrile gradient (40, 60, 80 and 100% acetonitrile-water (*v/v*)). Then, the 80% acetonitrile-water (*v/v*) solution (containing surfactin) was concentrated with nitrogen drying. Mass spectrometry of the purified surfactin revealed a purity greater than 99%.

3.6. Surfactin Homologue Profile Determination with Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS)

The purified surfactin solution was hydrolyzed with 6 mol HCl at 100 °C for 24 h, as described previously [48]. The FAs were extracted at least three times with diethyl ether. The FAs were esterified with 2.5% (*v/v*) sulfuric acid in methanol at 80 °C for 2 h. The fatty acid methyl esters (FAMES) were extracted with *n*-hexane and analyzed on a GC-MS-QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Zebron ZB-FAME capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.20 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Helium with 99.999% purity was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. The temperature was programmed from 100 °C to 210 °C at the rate of 3 °C min⁻¹; split ratio, 1:20. The

injector was maintained at 250 °C and the electron impact ion source was maintained at 220 °C. FAMES were identified and analyzed using the NIST database.

3.7. Antioxidant Activity

The surfactin antioxidant activity was measured using ABTS, DPPH and FRAP assays. Each measurement was performed in triplicate. The ABTS assay was conducted according to Re et al. [53]. In the first instance, radical cation (ABTS^{•+}) solution was prepared by mixing 7 mM ABTS stock solution (Sigma-Aldrich) with 2.45 mM potassium persulfate solution (Sigma-Aldrich). The mixture was incubated in the dark at room temperature for 12–16 h. Then, the reagent absorbance was adjusted to 0.7 (± 0.02) at 734 nm, using distilled water as a blank. The antioxidant activity of the biosurfactant was determined by mixing 10 μ L of surfactin (1 mg/mL) with 990 μ L of ABTS^{•+} solution. The absorbance was measured after 5 min incubation in the dark, using the Spark multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland), at 734 nm. The standard curve was prepared for Trolox ethanol solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the range of 0–2000 μ M. The activity of surfactin was expressed as the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC [μ M/g]).

In addition, the antioxidant activity of surfactin, expressed as the ability to scavenge DPPH free radicals, was investigated according to Xu et al. [54]. Initially, 190 μ L of DPPH ethanol solution (0.1 mM) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) was mixed with 10 μ L of surfactin solution (1 mg/mL), vortexed and incubated for 30 min in the dark. A corresponding blank was prepared as follows: 10 μ L of surfactin was mixed with 190 μ L of ethanol solution. The sample was centrifuged (12000 rpm) and the absorbance was measured using the Spark multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) at 517 nm. The antioxidant activity of surfactin was expressed as Trolox equivalent (TEAC [μ M/g]). The standard curve was prepared in the range of 0–1000 μ M.

Finally, the FRAP assay was conducted according to Benzie et al. [55]. The reaction, performed at pH = 3.6, involved the reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺ in the presence of 2,4,6-trypyridyl-s-triazine, followed by the formation of a colored complex. Initially, a surfactin sample (50 μ L at 1 mg/mL) was mixed with 150 μ L of the working solution (1A:1B:10C) prepared as follows: A ((10 mM TPTZ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 40 mM HCl), B (20 mM FeCl₃ × 6H₂O (Sigma Aldrich)), C (0.3 M acetate buffer pH = 3.6). The mixture was incubated for 10 min at room temperature, and then centrifuged (12,000 rpm), and the absorbance was measured with the Spark multimode microplate reader (Tecan Group Ltd.) at 593 nm. Trolox methanol solution in the range of 0.05–0.5 μ M/mL was used to prepare calibration curves.

3.8. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity

The ACE-inhibitory activity assay was performed according to Udenigwe and Aluko [56] and quantified by a regression analysis of ACE-inhibitory activity (%) versus surfactin concentration. The IC₅₀ value, i.e., the surfactin concentration (μ g/mL) that causes 50% inhibition of ACE activity, was determined. The assay was carried out in triplicate.

3.9. Molecular Docking of Surfactin to the C- and N-Domains of ACE

The molecular structure of surfactin was optimized at the PM6 level of theory by using the Gaussian 09 package [57]. Solvent effects were included based on the polarizable continuum model (PCM) [58]. In order to perform molecular docking studies, we applied the AutoDock4.2 program [59]. The structures of the C- and N-domains of human angiotensin I-converting enzyme were taken from the Protein Data Bank (PDB ID: 2XY9 and 2XYD, respectively) [46,60]. The Lamarckian genetic algorithm with local search was employed, with a total of 500 runs for both domains. The calculation included the population of 150 individuals with 27,000 generations and 250,000 energy evaluations.

Free energy of binding ($\Delta G_{\text{binding}}$), estimated during molecular docking, defines the affinity of the ACE–surfactin complex and can be expressed by the following equation:

$$\Delta G_{\text{binding}} = [\Delta G_{\text{intermolecular}} + \Delta G_{\text{internal}} + \Delta G_{\text{tors}}] - \Delta G_{\text{unbound}} \quad (2)$$

The intermolecular interaction energy ($\Delta G_{\text{intermolecular}}$) is the sum of dispersion, hydrogen bonding, electrostatics and desolvation energies according to the following expression:

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{intermolecular}} = & W_{vdw} \\ & + \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\ & + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ & + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_i + S_j V_j) e^{\left(\frac{-r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right)} \end{aligned} \quad (3)$$

The analysis of the obtained results was carried out using the UCSF Chimera System and LIGPLOT v.4.5.3 package [61,62].

4. Conclusions

Initial studies on the proteolytic and lipolytic activity showed the capability of *B. subtilis* #309 to produce hydrolytic enzymes and therefore to utilize oil cake substrates. The chemical compositions of the sunflower and rapeseed cakes promoted high yields for surfactin production. This was due to the high protein concentration, the source of amino acids for surfactin biosynthesis and the presence of FAs. The conducted research demonstrates the numerous application possibilities of *B. subtilis* #309 surfactin. Depending on the needs, surfactin can be synthesized to reduce ST. It can act as an emulsifier, widely used in the cosmetic industry to stabilize the complex, labile structures of cosmetics, or in the food industry, in order to provide a silky, thick consistency that makes the food more attractive to the consumer and improves the taste. Wide-scale application is possible due to the cost-effective production technology based on agri-food by-products. Therefore, large-scale bioremediation becomes possible. Studies showed *B. subtilis* #309 as an agent of great potential to remove oil-derived pollutants from a contaminated environment. Finally, according to our studies, surfactin can act as an effective inhibitor of ACE. In terms of future directions, our results enable subsequent works aimed at introducing surfactin to the market as a safe, environmentally friendly and successful antihypertensive drug.

Author Contributions: Conceptualization, D.C. and T.J.; Methodology, D.C., Ź.C. and T.J.; Validation, D.C. and T.J.; Formal Analysis, D.C. and T.J.; Investigation, D.C., Ź.C., A.K., W.L. and T.J.; Resources, T.J.; Writing—Original Draft Preparation, D.C. and Ź.C.; Writing—Review and Editing, W.L. and T.J.; Visualization, D.C.; Supervision, T.J.; Project Administration, T.J.; Funding Acquisition, T.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed by the National Science Centre, Poland, project 2020/37/B/NZ9/01519. The Article Processing Charge (APC) was financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: Z.C. gratefully acknowledges the allotment of the CPU time at the Wrocław Center of Networking and Supercomputing (WCSS). Molecular graphics were obtained with UCSF

Chimera, developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from NIH P41-GM103311.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rodríguez, A.; Gea, T.; Sánchez, A.; Font, X. Agro-wastes and Inert Materials as Supports for the Production of Biosurfactants by Solid-state Fermentation. *Waste Biomass Valoriz.* **2020**, *12*, 1963–1976. [[CrossRef](#)]
2. Rebello, S.; Asok, A.K.; Mundayoor, S.; Jisha, M.S. Surfactants: Toxicity, remediation and green surfactants. *Environ. Chem. Lett.* **2014**, *12*, 275–287. [[CrossRef](#)]
3. Drakontis, C.E.; Amin, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2020**, *48*, 77–90. [[CrossRef](#)]
4. De, S.; Malik, S.; Ghosh, A.; Saha, R.; Saha, B. A review on natural surfactants. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 65757–65767. [[CrossRef](#)]
5. Domínguez Rivera, Á.; Martínez Urbina, M.Á.; López y López, V.E. Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, 155. [[CrossRef](#)]
6. Ribeiro, B.G.; Guerra, J.M.C.; Sarubbo, L.A. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnol. Prog.* **2020**, *36*, e3030. [[CrossRef](#)]
7. Banat, I.M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M.G.; Fracchia, L.; Smyth, T.J.; Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 427–444. [[CrossRef](#)]
8. Rodrigues, L.; Banat, I.M.; Teixeira, J.; Oliveira, R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 609–618. [[CrossRef](#)]
9. Zouari, R.; Hamden, K.; El Feki, A.; Chaabouni, K.; Makni-Ayadi, F.; Sallemi, F.; Ellouze-Chaabouni, S.; Ghribi-Aydi, D. Evaluation of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant effects on hyperglycemia, angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity and kidney function in rats fed on high-fat–high-fructose diet. *Arch. Physiol. Biochem.* **2017**, *123*, 112–120. [[CrossRef](#)]
10. Shoeb, E.; Akhlaq, F.; Badar, U.; Jameela Akhter, S.I. Classification and Industrial Applications of Biosurfactants. *Acad. Res. Int. Part-I Nat. Appl. Sci.* **2013**, *4*, 243–252.
11. Peypoux, F.; Bonmatin, J.M.; Wallach, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 553–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Seydlová, G.; Svobodová, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent. Eur. J. Med.* **2008**, *3*, 123–133. [[CrossRef](#)]
13. Banat, I.M.; Satpute, S.K.; Cameotra, S.S.; Patil, R.; Nyayanit, N.V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Geneau-Sbartai, Č.; Leyris, J.; Silvestre, F.; Rigal, L. Sunflower cake as a natural composite: Composition and plastic properties. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11198–11208. [[CrossRef](#)]
15. Gültekin Subaşı, B.; Vahapoğlu, B.; Capanoglu, E.; Mohammadifar, M.A. A review on protein extracts from sunflower cake: Techno-functional properties and promising modification methods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 6682–6697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kostik, V.; Memeti, S.; Bauer, B. Fatty acid composition of edible oils and fats. *J. Hyg. Eng. Des.* **2013**, *4*, 112–116.
17. Chowdhury, K.; Banu, L.; Khan, S.; Latif, A. Studies on the Fatty Acid Composition of Edible Oil. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* **2007**, *42*, 311–316. [[CrossRef](#)]
18. Leming, R.; Lember, A. Chemical composition of expeller-extracted and cold-pressed rapeseed cake. *Agraarteadus* **2005**, *16*, 96–109.
19. Jeong, H.S.; Kim, H.Y.; Ahn, S.H.; Oh, S.C.; Yang, I.; Choi, I.G. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for extraction of pectin from rapeseed cake (*Brassica napus* L.) using commercial enzymes. *Food Chem.* **2014**, *157*, 332–338. [[CrossRef](#)]
20. Sakhno, L.O. Variability in the fatty acid composition of rapeseed oil: Classical breeding and biotechnology. *Cytol. Genet.* **2010**, *44*, 389–397. [[CrossRef](#)]
21. Lewinska, A.; Zebrowski, J.; Duda, M.; Gorka, A.; Wnuk, M. Fatty acid profile and biological activities of linseed and rapeseed oils. *Molecules* **2015**, *20*, 22872–22880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Paraszkiwicz, K.; Bernat, P.; Kuśmierska, A.; Chojniak, J.; Płaza, G. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. *J. Environ. Manag.* **2018**, *209*, 65–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Asgher, M.; Afzal, M.; Qamar, S.A.; Khalid, N. Optimization of biosurfactant production from chemically mutated strain of *Bacillus subtilis* using waste automobile oil as low-cost substrate. *Environ. Sustain.* **2020**, *3*, 405–413. [[CrossRef](#)]
24. De França, Í.W.L.; Lima, A.P.; Lemos, J.A.M.; Lemos, C.G.F.; Melo, V.M.M.; De Sant'ana, H.B.; Gonçalves, L.R.B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catal. Today* **2015**, *255*, 10–15. [[CrossRef](#)]
25. Vedaraman, N.; Venkatesh, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. *Braz. J. Chem. Eng.* **2011**, *28*, 175–180. [[CrossRef](#)]
26. De Oliveira, J.G.; Garcia-Cruz, C.H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2013**, *56*, 155–160. [[CrossRef](#)]

27. Moya Ramírez, I.; Tsaousi, K.; Rudden, M.; Marchant, R.; Jurado Alameda, E.; García Román, M.; Banat, I.M. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresour. Technol.* **2015**, *198*, 231–236. [[CrossRef](#)]
28. Abas, M.R.; Kader, A.J.A.; Khalil, M.S.; Hamid, A.A.; Isa, M.H.M. Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 by Using Treated Palm Oil Mill Effluent (POME) as fermentation media. *Int. Conf. Food Agric.* **2013**, *55*, 87–93.
29. Bhang, K.; Chaturvedi, V.; Bhatt, R. Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. *Biotechnol. Rep.* **2016**, *10*, 94–104. [[CrossRef](#)]
30. Long, X.; He, N.; He, Y.; Jiang, J.; Wu, T. Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. *Bioresour. Technol.* **2017**, *241*, 200–206. [[CrossRef](#)]
31. Bezza, F.A.; Chirwa, E.M.N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *101*, 168–178. [[CrossRef](#)]
32. Zhang, J.; Xue, Q.; Gao, H.; Lai, H.; Wang, P. Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Liu, Q.; Lin, J.; Wang, W.; Huang, H.; Li, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. *Biochem. Eng. J.* **2014**, *95*, 31–37. [[CrossRef](#)]
34. Schmidt; de Oliveira, V.K. Hydrophobic Inducers to Enhanced Surfactin Production Using Cassava Wastewater as Low-Cost Culture Medium: A Prospection on New. Ph.D. Thesis, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil, 2022.
35. Hu, F.; Liu, Y.; Li, S. Rational strain improvement for surfactin production: Enhancing the yield and generating novel structures. *Microb. Cell Fact.* **2019**, *18*, 42. [[CrossRef](#)]
36. González-Pérez, S.; Vereijken, J.M. Sunflower proteins: Overview of their physicochemical, structural and functional properties. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 2173–2191. [[CrossRef](#)]
37. Chmielewska, A.; Kozłowska, M.; Rachwał, D.; Wnukowski, P.; Amarowicz, R.; Nebesny, E.; Rosicka-Kaczmarek, J. Canola/rapeseed protein—nutritional value, functionality and food application: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 3836–3856. [[CrossRef](#)]
38. Nitschke, M.; e Silva, S.S. Recent food applications of microbial surfactants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 631–638. [[CrossRef](#)]
39. Kumar, A.; Singh, S.K.; Kant, C.; Verma, H.; Kumar, D.; Singh, P.P.; Modi, A.; Droby, S.; Kesawat, M.S.; Alavilli, H.; et al. Microbial biosurfactant: A new frontier for sustainable agriculture and pharmaceutical industries. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1472. [[CrossRef](#)]
40. Abdollahi, S.; Tofighi, Z.; Babaei, T.; Shamsi, M.; Rahimzadeh, G.; Rezvani, H.; Saeidi, E.; Amiri, M.M.; Ashtiani, Y.S.; Samadi, N. Evaluation of anti-oxidant and anti-biofilm activities of biogenic surfactants derived from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran. J. Pharm. Res.* **2020**, *9*, 115.
41. Yalçın, E.; Çavuşoğlu, K. Structural analysis and antioxidant activity of a biosurfactant obtained from *Bacillus subtilis* RW-I. *Turk. J. Biochem.* **2010**, *35*, 243–247.
42. Shao, C.; Liu, L.; Gang, H.; Yang, S.; Mu, B. Structural diversity of the microbial surfactin derivatives from selective esterification approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 1855–1872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Tabbene, O.; Gharbi, D.; Slimene, I.B.; Elkahoui, S.; Alfeddy, M.N.; Cosette, P.; Mangoni, M.L.; Jouenne, T.; Limam, F. Antioxidative and DNA protective effects of bacillomycin D-like lipopeptides produced by B38 strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *168*, 2245–2256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Coates, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 769–773. [[CrossRef](#)]
45. Ghazala, I.; Bouassida, M.; Krichen, F.; Manuel Benito, J.; Ellouz-Chaabouni, S.; Haddar, A. Anionic lipopeptides from *Bacillus mojavensis* I4 as effective antihypertensive agents: Production, characterization, and identification. *Eng. Life Sci.* **2017**, *17*, 1244–1253. [[CrossRef](#)]
46. Akif, M.; Schwager, S.L.; Anthony, C.S.; Czarny, B.; Beau, F.; Dive, V.; Sturrock, E.D.; Acharya, K.R. Novel mechanism of inhibition of human angiotensin-1-converting enzyme (ACE) by a highly specific phosphinic tripeptide. *Biochem. J.* **2011**, *436*, 53–59. [[CrossRef](#)]
47. Gudiña, E.J.; Pereira, J.F.B.; Rodrigues, L.R.; Coutinho, J.A.P.; Teixeira, J.A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2012**, *68*, 56–64. [[CrossRef](#)]
48. Janek, T.; Łukaszewicz, M.; Rezanka, T.; Krasowska, A. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 6118–6123. [[CrossRef](#)]
49. Janek, T.; Gudiña, E.J.; Połomska, X.; Biniarz, P.; Jama, D.; Rodrigues, L.R.; Rymowicz, W.; Lazar, Z. Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. *Molecules* **2021**, *26*, 3488. [[CrossRef](#)]
50. Zhang, H.; Xu, L.; Xiao, D.; Xie, J.; Zeng, H.; Wang, Z.; Zhang, X.; Niu, Y.; Shen, Z.; Shen, J.; et al. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: Significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. *J. Clin. Pathol.* **2007**, *60*, 555–561. [[CrossRef](#)]
51. Gudiña, E.J.; Fernandes, E.C.; Rodrigues, A.I.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, L.R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 59.
52. Janek, T.; Rodrigues, L.R.; Gudiña, E.J.; Czyżnikowska, Ż. Metal-Biosurfactant Complexes Characterization: Binding, Self-Assembly and Interaction with Bovine Serum Albumin. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]

54. Xu, B.J.; Chang, S.K.C. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, H19–H27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Udenigwe, C.C.; Aluko, R.E. Multifunctional Cationic Peptide Fractions from Flaxseed Protein Hydrolysates. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2012**, *67*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Stewart, J.J.P. Application of the PM6 method to modeling proteins. *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 765–805. [[CrossRef](#)]
58. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3093. [[CrossRef](#)]
59. Morris, G.; Huey, R.; Linkstrom, W.; Sanner, M.; Belew, R.; Goodsell, D. Olson AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2010**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)]
60. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [[CrossRef](#)]
61. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)]
62. Wallace, A.C.; Laskowski, R.A.; Thornton, J.M. Ligplot: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng. Des. Sel.* **1995**, *8*, 127–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Dominika Czurko
imię i nazwisko

Wrocław, 09.05.2023
(miejsowość i data)

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

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Czurko D., Czyżnikowska Ż., Kancelista A., Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. *International Journal of Molecular Sciences*: 23 (18), 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>

mój udział polegał na ustaleniu koncepcji, metodologii oraz planu badań. Analizie kinetyki produkcji surfaktyny w hodowli *B. subtilis* #309 oraz wyznaczeniu profilu enzymów lipolitycznych i proteolitycznych bakterii. Oznaczeniu aktywności przeciwutleniającej i inhibitorowej surfaktyny wobec konwertazy angiotensyny (ACE) oraz możliwości jej zastosowania jako środka do odzysku oleju. Byłam odpowiedzialna za wyznaczenie profilu homologów surfaktyny w medium pochodzącym. Ponadto odpowiadałam za analizę i wizualizację pozyskanych wyników, przegląd i dyskusję dotychczasowych doniesień naukowych oraz przygotowanie wersji roboczej manuskryptu.

09.05.2023
Czurko Dominika
data i podpis

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
PODSTAW NAUK CHEMICZNYCH
samodzielny referent

Załącznik nr 3

mgr Monika Liebenthal

Żaneta Czyżnikowska

imię i nazwisko

Wrocław, 9.05.2025

(miejsowość i data)

Uniwersytet Medyczny

im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Katedra i Zakład Podstaw Nauk Chemicznych

ul. Borowska 211a, 50-556

Wrocław, Polska

afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., **Czyżnikowska Ż.**, Kancelista A., Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. International Journal of Molecular Sciences: 23 (18), 10824.

<https://doi.org/10.3390/ijms231810824>

mój udział polegał na przeprowadzeniu analizy dokowania molekularnego surfaktyny do domeny C i N konwertazy angiotensyny (ACE), opracowaniu i opisanu pozyskanych wyników.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD
PODSTAW NAUK CHEMICZNYCH
kierownik
Żaneta Czyżnikowska
dr hab. Żaneta Czyżnikowska

Anna Kancelista

imię i nazwisko

Wrocław, 08.05.2023

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

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., Czyżnikowska Ż., **Kancelista A.**, Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. International Journal of Molecular Sciences: 23 (18), 10824. <https://doi.org/10.3390/ijms231810824>

mój udział polegał na przeprowadzeniu analizy składu makuchu rzepakowego i słonecznikowego.

08.05.2023

Anna Kancelista

Wojciech Łaba
imię i nazwisko

Wrocław 08.05.2023
(miejsowość i data)

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

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., Czyżnikowska Ż., Kancelista A., Łaba W., Janek T. 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. International Journal of Molecular Sciences: 23 (18), 10824.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810824>

mój udział polegał na krytycznej weryfikacji manuskryptu pod kątem istotnych treści intelektualnych oraz zatwierdzeniu finalnej wersji manuskryptu.

08.05.2023
data i podpis



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOSCI

Dr Tomasz Janek

Wrocław, 09.05.2023

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy:

Ciurko D., Czyżnikowska Ż., Kancelista A., Łaba W., **Janek T.** 2022. Sustainable production of biosurfactant from agro-industrial oil wastes by *Bacillus subtilis* and its potential application as antioxidant and ACE inhibitor. *International Journal of Molecular Sciences*: 23 (18), 10824.

mój udział polegał na ustaleniu koncepcji, metodologii oraz planu badań, krytycznej weryfikacji manuskryptu pod kątem istotnych treści intelektualnych oraz zatwierdzeniu finalnej wersji publikacji.

Tomasz Janek



CELLENCE IN RESEARCH

UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I MIKROBIOLOGII ŻYWNOSCI
ul. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław
tel. 71 3207738
e-mail: tomasz.janek@upwr.edu.pl • www.upwr.edu.pl