



**Dr inż. Aneta Białkowska**

Politechnika Łódzka  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

**Autoreferat**

**przedłożony Centralnej Komisji  
do Spraw Stopni i Tytułów**

**1. Imię i nazwisko**

Aneta Monika Białkowska

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

2000

**Magister inżynier biotechnolog**

Specjalność: biochemia techniczna

Instytut Biochemii Technicznej

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechnika Łódzka

Tytuł pracy magisterskiej: „*Izolowanie i ogólna charakterystyka*

*zewnątrzkomórkowych proteinaz bakterii antarktycznych*”

Opiekun pracy: dr hab. Marianna Turkiewicz,  
prof. nadzw. PŁ

2005

**Stopień naukowy doktora nauk technicznych w zakresie technologii chemicznej**

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechnika Łódzka

Temat rozprawy doktorskiej: „*β-galaktozydazy drobnoustrojów antarktycznych*”

Promotor: prof. dr hab. Marianna Turkiewicz

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych**

2005 - 2006

Asystent

Instytut Biochemii Technicznej

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechnika Łódzka

2006 – obecnie

Adiunkt

Instytut Biochemii Technicznej

Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności

Politechnika Łódzka

4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

- A) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

### **EKSTREMOFILE JAKO ŹRÓDŁO UŻYTECZNYCH BIOTECHNOLOGICZNIE BIOPRODUKTÓW**

- B) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa, recenzenci wydawniczy)

**H-1** Makowski K., **Białkowska A**, Szczęsna-Antczak M, Kalinowska H, Kur J, Cieśliński H, Turkiewicz M. (2007) Immobilized preparation of cold-adapted and halotolerant Antarctic  $\beta$ -galactosidase as a highly stable catalyst in lactose hydrolysis. *FEMS Microbiol Ecol* 59:535-542

**MNiSW - 20\*** ; **IF<sub>2007</sub> = 3.039**, (5 letni IF=**4.295**) **Cit – 14**

**H-2** Makowski K, **Białkowska A**, Olczak J, Kur J, Turkiewicz M. (2009) Antarctic, cold-adapted  $\beta$ -galactosidase of *Pseudoalteromonas* sp. 22b as an effective tool for alkyl galactopyranosides synthesis. *Enzyme Microb Technol* 44:59-64

**MNiSW - 20\***, **IF<sub>2009</sub>= 2.638**, (5 letni IF=**2.962**) **Cit – 11**

**H-3** Florczak T, Daroch M, Wilkinson MC, **Białkowska A**, Bates AD, Turkiewicz M, Iwanejko LA. (2013) Purification, characterisation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of LipG7 an enantioselective, cold-adapted lipase from the Antarctic filamentous fungus *Geomyces* sp. P7 with unusual thermostability characteristics. *Enzyme Microb Technol* 53(1):18-24. doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.03.021. Epub 2013 Apr 4

**MNiSW - 30\***, **IF<sub>2013</sub>= 2.966**, (5 letni IF=**2.962**) **Cit – 22**

**H-4** **Białkowska A**, Szulczewska KM, Krysiak J, Florczak T, Gromek E, Kassassir H, Kur J, Turkiewicz M. (2017) Genetic and biochemical

characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples. *Polar Biol* 38:1-17. doi:10.1007/s00300-017-2102-

**MNiSW - 30\***, IF<sub>2016/2017</sub>= **1.95**, (5 letni IF=**2.070**) Cit -1

**H-5 Białkowska A**, Morawski K, Florczak T. (2017) Extremophilic proteases as novel and efficient tools in short peptide synthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol* 44(9):1325-1342. doi: 10.1007/s10295-017-1961-9

**MNiSW - 30\***, IF<sub>2016</sub>=**2.810**, (5 letni IF=**2.620**) Cit -0

**H-6 Białkowska A**, Krysiak J, Florczak T, Szulczewska K, Wanarska M, Turkiewicz M. (2018) The psychrotrophic yeast *Sporobolomyces roseus* LOCK 1119 as a source of a highly-active aspartic protease for the *in vitro* production of antioxidant peptides. *Biotechnol Appl Biochem*. doi: 10.1002/bab.1656 (published online in Wiley Online Library)

**MNiSW - 20\***, IF<sub>2016</sub>= **1.413**, (5 letni IF=**1.466**) Cit -0

**H-7 Białkowska A**, Gromek E, Krysiak J, Sikora B, Kalinowska H, Jędrzejczak-Krzepkowska M, Kubik C, Lang S, Schütt F, Turkiewicz M. (2015) Application of enzymatic apple pomace hydrolysate to production of 2,3-butanediol by alkaliphilic *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42(12):1609-21. doi:10.1007/s10295-015-1697-3

**MNiSW - 30\***, IF<sub>2015</sub>=**2.745**, (5 letni IF=**2.624**) Cit -0

**H-8 Białkowska A**, Jędrzejczak-Krzepkowska M, Gromek E, Krysiak J, Sikora B, Kalinowska H, Kubik C, Schütt F, Turkiewicz M. (2016) Effects of genetic modifications and fermentation conditions on 2,3-butanediol production by alkaliphilic *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100(6):2663-76. doi:10.1007/s00253-015-7164-2

**MNiSW - 15\***, IF<sub>2016</sub>= **3.42**, (5 letni IF=**3.72**) Cit -1

**H-9** Sikora B, Kubik C, Kalinowska H, Gromek E, **Białkowska A**, Jędrzejczak-Krzepkowska M, Schütt F, Turkiewicz M. (2016) Application of byproducts from food processing for production of 2,3-butanediol using *Bacillus*

*amyloliquefaciens* TUL 308. *Prep Biochem and Biotechnol* 46(6):610-9.  
doi:10.1080/10826068.2015.1085401

**MNiSW - 15\*, IF<sub>2016</sub>=1.361, (5 letni IF=1.185) Cit -3**

**H-10 Białkowska A.** (2016) Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. *World J Microbiol Biotechnol* 32:200. doi:10.1007/s11274-016-2161-x

**MNiSW - 15\*, IF<sub>2016</sub>= 1.658, (5 letni IF=1.818) Cit -6**

**H-11 Białkowska A,** Gromek E, Kalinowska H, Kubik C, Sikora B, Szczęsna – Antczak M, Turkiewicz M, Jędrzejczak-Krzepkowska M. (2017) Sposób wytwarzania 2,3-butanodiolu. Patent PL 227253 B1, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska

**MNiSW – 25**

\*pkt MNiSW – punkty zgodne z wykazem opublikowanym przez MNiSW na rok danej publikacji

Wymienione artykuły dołączone zostały w *Załączniku 5* i cytowane są w tekście z literą 'H' przed numerem odnośnika (np. [H-1]). Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów pracy określające indywidualny wkład w jej powstanie (*Załącznik 6*).

<b>PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO</b> <b>(DANE SCJENTOMETRYCZNE NA DZIEŃ 18.04.2018)</b>	
Sumaryczny <i>Impact Factor</i> cyklu publikacji będących podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk technicznych, w dyscyplinie biotechnologia (zgodnie z rokiem opublikowania)	<b>24</b>
Sumaryczny <i>Impact Factor</i> wszystkich prac (zgodnie z rokiem opublikowania)	<b>36.67</b>
Liczba punktów zgodnie z kryteriami Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego opublikowanymi w komunikacie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych (zgodnie z rokiem opublikowania)	<b>385</b>
Index Hirscha według Web of Science	<b>9</b>
Liczba cytowań według Web of Science	<b>251</b>
Liczba cytowań bez autocytowań według Web of Science	<b>236</b>

\* W przypadku gdy osiągnięciem naukowym albo artystycznym jest samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, habilitant załącza do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego oświadczenia wszystkich jej współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie. W przypadku gdy praca zbiorowa ma więcej niż pięciu współautorów, habilitant załącza oświadczenie określające jego indywidualny wkład w powstanie tej pracy oraz oświadczenia co najmniej czterech pozostałych współautorów

**C) omówienie celu naukowego/artystycznego ww.pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Podstawą wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego są oryginalne wyniki badań, przedstawione w cyklu 8 powiązanych tematycznie artykułów naukowych, dwie publikacje przeglądowe oraz jeden patent. Artykuły naukowe zostały opublikowane w czasopismach z *Thomson Reuters Master Journal List* (tzw. Listy filadelfijskiej) ujętych w zbiorach *Journal Citation Report* (JCR).

**EKSTREMOFILE JAKO ŹRÓDŁO UŻYTECZNYCH BIOTECHNOLOGICZNIE BIOPRODUKTÓW**

**1. Opis białek katalitycznych pozyskiwanych z zimnolubnych drobnoustrojów**

- część teoretyczna: ogólna charakterystyka enzymów i ich przydatność w biotechnologii; podkreślenie unikatowego charakteru enzymów psychrofilnych i konieczności ich stosowania w wybranych procesach technologicznych jako doskonałej i często jedynej alternatywy dla enzymów mezofilnych
- osiągnięcia: izolacja drobnoustrojów z ekstremalnych środowisk i ich identyfikacja taksonomiczna metodami biologii molekularnej, poszerzanie i nadzór nad kolekcją mikroorganizmów psychrofilnych i psychrotrofowych Instytutu Biochemii Technicznej, charakterystyka właściwości enzymów omawianych w ramach przedkładanego cyklu badań (np. lipazy, proteazy,  $\beta$ -galaktozydazy) oraz wskazanie ich potencjału aplikacyjnego
- nabyte umiejętności: charakterystyka genetyczna, fizjologiczna i biochemiczna mikroorganizmów ekstremofilnych, projektowanie skriningów funkcjonalnych i sekwencyjnych pod kątem poszukiwania konkretnych aktywności, opracowanie wydajnych metod izolacji i oczyszczania enzymów natywnych i rekombinowanych, charakterystyka kinetyczna i strukturalna biokatalizatorów z podkreśleniem ich adaptacji do działania w niekonwencjonalnych warunkach, sprawdzanie potencjału aplikacyjnego

**2. Opis możliwości wydajnego pozyskiwania użytecznego związku, tj. 2,3-butanodiolu z bakterii alkalofilnych z wykorzystaniem biomasy odpadowej**

- część teoretyczna: możliwości wykorzystania 2,3-butanodiolu, wydajna mikrobiologiczna produkcja diolu, metody ulepszania biosyntezy, np. na drodze genetycznej
- osiągnięcia: opracowanie wydajnych metod pozyskiwania 2,3-butanodiolu na drodze mikrobiologicznej syntezy w skali od małej laboratoryjnej (0,75L) do większej (fermentor 30L) z wykorzystaniem produktów odpadowych przemysłu rolno-spożywczego
- nabyte umiejętności: opracowanie enzymatycznych metod scukrzania biomasy roślinnej, projektowanie skriningów funkcjonalnych, ulepszanie biosyntezy 2,3-butanodiolu z wykorzystaniem alkalofilnych bakterii poprzez różne metody hodowli, immobilizację komórek producentów 2,3-butanodiolu oraz klonowanie i ekspresję wybranych genów szlaku metabolicznego.

### C.1. MIKROORGANIZMY ZIMNOLUBNE JAKO ŹRÓDŁO UNIKATOWYCH BOKATALIZATORÓW PRZYDATNYCH W BIOTECHNOLOGII

Wymagania, jakie stawia obecnie globalny rynek zmuszają do poszukiwania nowych, tanich technologii, które pozwolą na wydajną produkcję dóbr i towarów o niskich cenach i konkurencyjnej jakości. Tradycyjne procesy technologiczne oparte o reakcje chemiczne wymagają do uzyskania maksymalnej wydajności produkcji ściśle określonych, zazwyczaj drastycznych warunków. Bardzo niewielkie zmiany parametrów prowadzenia procesu mogą stać się przyczyną utraty kontroli nad kierunkiem zachodzącej reakcji chemicznej, a to powoduje powstawanie niepożądanych produktów ubocznych. W konsekwencji wydajność reakcji spada, wzrasta natomiast liczba etapów koniecznych do oczyszczenia oczekiwanego produktu końcowego, a więc następuje również podwyższenie kosztów produkcji. Rozwiązania wymienionych problemów upatruje się obecnie w rozwoju nowoczesnych biotechnologii, które wykorzystują do przemysłowej katalizy enzymy wyizolowane z mikroorganizmów lub też ich całe żywe komórki. Najczęściej są to enzymy izolowane z organizmów mezofilnych, które są jak dotąd najlepiej poznane, jednakże nie we wszystkich procesach przemysłowych mogą one znaleźć zastosowanie. W przypadkach, gdy korzystne jest zastosowanie specyficznych warunków technologicznych, np. niskiej czy wysokiej temperatury, pH innego niż obojętne, zwiększonego stężenia soli, enzymy drobnoustrojów mezofilnych nie wykazują pełnej aktywności. Z tego względu od kilku dekad rośnie zainteresowanie mikroorganizmami żyjącymi w środowiskach ekstremalnych oraz ich enzymami, często określanymi w literaturze terminem ekstremozymy. **W obszarze biotechnologii przemysłowej jest to obecnie jeden z istotnych kierunków badań.**

Prace nad ekstremozymami rozpoczęły się w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku i przez kilka dekad skupiały się głównie na enzymach hipertermofili i termofili, m.in. polimerazach DNA (polimeraza *Thermus aquaticus* (Taq), polimeraza *Pyrococcus furiosus* (Pfu), polimeraza *Pyrococcus woesei* (Pwo)), które okazały się niezwykle przydatnymi narzędziami dla biologii molekularnej. Obecnie znacząco wzrosła liczba prac poświęconych enzymom mikroorganizmów bytujących w zimnych środowiskach, zwłaszcza takich, które są poddawane nieustannej presji ustalonych niskich temperatur, jak np. środowiska polarne, czy wysokogórskie. Uważa się, że adaptowane do zimna biokatalizatory, zwane enzymami psychrofilnymi są szczególnie przydatne do niskotemperaturowych biotransformacji. Wdrożenie takich enzymów do procesów technologicznych prowadzonych na skalę przemysłową potwierdza ich bezsporną użyteczność [Tabela 1]. Wynika ona z faktu, że te białka charakteryzują się dwiema ważnymi cechami - wysoką aktywnością katalityczną w zakresie niskich temperatur i najczęściej także niską termostabilnością, które czynią je atrakcyjnymi katalizatorami w



procesach przemysłowych, choćby ze względu na korzyści ekonomiczne płynące z ich zastosowania, m.in. oszczędność energii dzięki uniknięciu grzania bioreaktorów. Wysoka zwykle termolabilność psychrozymów powoduje, że można je łatwo zainaktywować, kiedy spełnią już swoje zadanie w procesie technologicznym. Prowadzenie reakcji w niskiej temperaturze ma również inną ważną zaletę, a mianowicie korzystnie wpływa na jakość produktu końcowego, który w podwyższonej temperaturze może ulec zmianom zmniejszającym jego atrakcyjność. Zastosowanie psychrozymów jest też korzystne, gdy substrat lub produkt reakcji ma charakter lotny. Za aplikacją enzymów zimnolubnych przemawia również i to, że reakcje chemiczne katalizowane enzymatycznie w niskich temperaturach są często bardziej wydajne i stereoselektywne, co pozwala uniknąć niepożądanych reakcji ubocznych. W przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, gdzie istotny problem stanowią zakażenia drobnoustrojami mezofilnymi, dzięki zastosowaniu enzymów psychrofilnych i niskich temperatur można uzyskać wysoką sterylność produkcji, a więc zmniejszyć zagrożenia ze strony mezofilnych mikroorganizmów chorobotwórczych oraz uniknąć strat produktu końcowego.

Dzięki ewidentnym korzyściom, jakie niesie zastąpienie w wielu procesach enzymów mezofilnych ich odpowiednikami pochodzącymi z organizmów psychrofilnych, mają one szansę znaleźć w przyszłości lub już znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu i różnorodnych technologiach. Tabela 1 przedstawia szerokie spektrum możliwości aplikacji najważniejszych enzymów izolowanych z organizmów zimnolubnych [1]. Obserwowana w ostatnich latach na całym świecie intensyfikacja badań nad enzymami psychrofilnymi sprawia, że coraz więcej tych biokatalizatorów jest już dostępnych komercyjnie [2]. Największym odbiorcą psychrofilnych enzymów jest przemysł detergentów przeznaczonych do prania w 30°C i w niższych temperaturach [1]. Jak duże znaczenie ma dostępność tego rodzaju produktów, świadczą wyniki szacunkowych wyliczeń oszczędności w zużyciu energii, które można by osiągnąć, gdyby np. we wszystkich gospodarstwach domowych Europy obniżyć temperaturę prania z 40°C do 30°C. Oszczędności te byłyby tak duże, że spowodowałyby redukcję konsumpcji energii elektrycznej o 30% i obniżenie emisji CO<sub>2</sub> o ok. 100g w przeliczeniu na jedno pranie [2]. Firma NovoNordisk produkuje specjalny preparat enzymatyczny, Stainzyme®, przeznaczony do prania w obniżonych temperaturach, a firma Genencor w podobnych celach oferuje preparaty zimnolubnych proteaz Purafect® premier i Properase®. Tego rodzaju enzymy są również wytwarzane w Japonii, która produkuje detergenty przeznaczone do prania nawet w temperaturze wody wodociągowej (8 – 10°C). W USA produkuje się adaptowaną do niskich temperatur subtilizynę antarktycznego szczepu *Bacillus* sp. TA41, która dodatkowo została ulepszona na drodze tzw. molekularnej ewolucji *in vitro*, dzięki czemu zwiększyła się stabilność termiczna tego białka. Prace te finansowała znana amerykańska firma Procter&Gamble, największy światowy potentat w

produkcji detergentów piorących.

Tabela 1. Potencjał biotechnologiczny wybranych enzymów psychrofilnych [1].

<b>Enzymy adaptowane do zimna</b>	<b>Zastosowanie w biotechnologii</b>
Metaloproteazy	Przemysł spożywczy, detergenty, biologia molekularna
Proteazy serynowe	Przemysł spożywczy, detergenty, biologia molekularna
Lipazy	Przemysł spożywczy, detergenty, kosmetologia
Alkaliczna fosfataza	Biologia molekularna
Dehydrogenaza alkoholowa	Synteza asymetryczna
Dehydrogenaza 3-izopropylgłównocjanowa	Synteza asymetryczna
Dehydrogenaza mleczanowa	Biotransformacje, biosensory
Dehydrogenaza waliny	Biotransformacje
$\beta$ -galaktozydaza	Przemysł mleczarski
Polimeraza RNA	Biologia molekularna
Polimeraza DNA	Biologia molekularna
Ligaza DNA	Biologia molekularna
Uracyl-DNA glikozylaza	Biologia molekularna
Endonukleaza restrykcyjna <i>UnbI</i>	Biologia molekularna
Izomeraza triozofosforanowa	Biotransformacje
Chitobiasa	Przemysł spożywczy, żywność funkcjonalna
Chitynaza A	Przemysł spożywczy, żywność funkcjonalna
Celulaza	Przemysł paszowy, tekstylny, detergenty
Poligalakturonaza	Przemysł spożywczy (produkcja serów, win i nektarów owocowych)
Liaza pektatowa	Przemysł spożywczy (dojrzewanie serów, produkcja win i soków owocowych)
Hydrataza nitylowa	Niskotemperaturowa synteza akrylamidu
Pululanaza	Hydroliza pululanu
Ksylanaza	Piekarnictwo, tworzenie protoplastów oraz produkcja win i napojów
Racemaza alaninowa	Przechowywanie żywności, czynnik antybakteryjny
$\alpha$ -amylaza	Detergenty, piekarnictwo, bielenie pulpy drzewnej
Glukoamylaza	Hydroliza skrobi
$\beta$ -laktamaza	Degradacja antybiotyków
Kinaza fosfoglicerynianowa	Biotransformacje, ochrona środowiska (uzdatnianie wody w przemyśle papierniczym, spożywczym i tekstylnych)
Karbamoiltransferaza asparaginianowa	Biotransformacje
Liaza izocytrynianowa	Biotransformacje
Syntaza jabłczanowa	Biotransformacje

Skomercjalizowana została także produkcja psychrofilnych lipaz CALA i CALB drożdży *Pseudozyma antarctica* (dawniej *Candida antarctica*). Większy sukces

aplikacyjny na rynku odniosła lipaza CALB; enzym ten jest nie tylko wykorzystywany jako składnik wspomnianych już niskotemperaturowych proszków do prania, ale też jako niezwykle efektywny i stereoselektywny katalizator różnorodnych syntez w środowisku rozpuszczalników organicznych. Unichem International stosuje CALB do wytwarzania estrów dla przemysłu kosmetycznego (np. mirystynian izopropylu), BASF wykorzystuje ją do rozdziału enancjomerów racemicznych amin, a Merck do produkcji chiralnych związków pośrednich stosowanych w syntezie 3-fluoroleucyny. Jest ona dostępna w handlu w postaci preparatów o różnej formie (stałej, ciekłej, immobilizowanej na różnych nośnikach) i składzie zależnym od producenta. Największym producentem enzymów, w tym lipazy B z *P. antarctica*, jest firma Novozymes Company (Dania), która produkuje enzym w postaci białka ekspymowanego w szczepie *Aspergillus niger* pod nazwą Lipozyme® CALB L i Novozym® 435, odpowiednio, dla rozpuszczalnej i immobilizowanej formy białka. Firma Roche Ind. (Niemcy) oferuje lipazę B *P. antarctica* w postaci liofilizowanej (Chirazyme L-2 c.-f.) i immobilizowanej (Chirazyme L-2 c.-f.) oraz lipazę A w preparacie Chirazyme L-5 [3].

Oprócz lipaz do stereoselektywnych biotransformacji nadają się także inne enzymy, takie jak esterazy, liazy, metylazy, oksydoreduktazy, racemazy, aminotransferazy, pochodzące z drobnoustrojów bytujących w permanentnie zimnych, a jednocześnie suchych środowiskach, np. w glebie antarktycznej. Są one adaptowane nie tylko do zimna, ale także do działania w warunkach niskiej aktywności wody, czyli są potencjalnie przydatne do biokatalizy mikrowodnej, a giętkość strukturalna ich cząsteczek sprawia, że nie ulegają one tak znacznemu usztywnieniu w ekstremalnych warunkach, aby stać się niezdolne do związania substratu i do jego przemiany w produkt. I tak, np. lipazę psychrofilnego szczepu *Pseudomonas* sp. P38 z powodzeniem wykorzystano do syntezy kaprylanu butylu (związek zapachowy) w n-heptanie [4]; prowadzi się także badania nad możliwością zastosowania adaptowanych do zimna proteaz w syntezie peptydów, która, podobnie jak synteza lotnych związków zapachowych i modyfikacje antybiotyków, zachodzi z wyższą wydajnością w niskich temperaturach.

Odbiorcą psychrozymów w sektorze przemysłu spożywczego jest obecnie głównie przemysł piekarniczy, który wykorzystuje do poprawy jakości pieczywa adaptowane do zimna ksylanazy, izolowane z antarktycznych bakterii. Ich użycie znacząco poprawia właściwości ciasta oraz jakość chleba zwiększając objętość bochenków. Producentem tych enzymów jest belgijska firma Puratos (Feller, Scientifica) [5]. Innymi, potencjalnie przydatnymi, zwłaszcza dla przemysłu mleczarskiego, enzymami byłyby np. psychrofilne  $\beta$ -galaktozydazy, nadające się do usuwania laktozy z mleka w warunkach chłodniczego przechowywania. Mleko bezlaktozowe jest przeznaczone dla osób z nietolerancją tego disacharydu (jedna trzecia światowej populacji osób dorosłych), który powoduje u nich uciążliwe dolegliwości gastryczno-jelitowe (biegunki, wzdęcia). U kilku gatunków bakterii

antarktycznych z rodzaju *Pseudoalteromonas* znaleziono już odpowiednie  $\beta$ -galaktozydazy, obecnie opracowuje się systemy ekspresji ich genów w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, co powinno umożliwić produkcję tych enzymów na przemysłową skalę [6].

Poszukuje się ponadto psychrofilnych pektynaz, przeznaczonych dla przetwórstwa owoców (redukcja lepkości miazgi owocowej przed filtracją, klarowanie soków w niskich temperaturach), a także proteaz, które można by zastosować w tenderyzacji (zmiękczeniu) i poprawie smaku mrożonego mięsa. Przemysł paszowy jest zainteresowany psychrofilnymi celulazami, fitazami oraz proteinazami, których zastosowanie poprawiłoby walory żywieniowe i przyswajalność pasz. Zaawansowane są prace nad wykorzystaniem adaptowanych do zimna oksydoreduktaz w biosensorach przeznaczonych do monitorowania skażeń środowiska w chłodnym i umiarkowanym klimacie [2].

Wysoki potencjał biotechnologiczny enzymów adaptowanych do zimna może być także wykorzystany w biologii molekularnej. Obecnie komercyjnie znane są jedynie dwie nukleazy degradujące każdą formę kwasu nukleinowego tj.: Cryonase® (Takara, Japonia) oraz Benzonase® (Merck, USA), przy czym tylko ta pierwsza pochodzi ze szczepu psychrotrofowego *Shewanella* sp. AC10, a druga z mezofilnej bakterii *Serratia marcescens*. Maksymalną aktywność oba enzymy wykazują w temperaturze 20°C, natomiast w temperaturach z zakresu 0-10°C obserwuje się drastyczny spadek aktywności nukleaz o 30 i 100% w przypadku, odpowiednio, Cryonase® i Benzonase®. Jest to negatywna cecha tych enzymów, uniemożliwiająca ich wydajne wykorzystanie w produkcji temperaturolabilnych biofarmaceutyków, dlatego intensywnie poszukuje się tego rodzaju enzymów działających wydajnie w temperaturach poniżej 20°C.

W Polsce badania nad izolacją zimnolubnych mikroorganizmów, ich identyfikacją oraz charakterystyką kinetyczno-strukturalną i praktycznym wykorzystaniem enzymów psychrofilnych, prowadzone są od ponad 20 lat w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej. Inicjatorem tych badań była moja mentorka i promotor mojego doktoratu prof. dr hab. Marianna Turkiewicz. O konieczności intensyfikacji tych badań może świadczyć fakt, że w wielu najnowszych publikacjach enzymy ekstremofilne nazywane są biokatalizatorami nowej generacji, dzięki którym możliwy jest intensywny rozwój biotechnologii [7]. W trakcie realizacji swojej pracy doktorskiej i później, aż do dnia dzisiejszego, kontynuuję badania nad poszukiwaniem unikatowych białek katalitycznych o szerokim wachlarzu zastosowań.

Początkowo moja uwaga skupiona była głównie na izolacji przydatnych dla biotechnologii psychrofilnych i psychrotrofowych bakterii, które stanowiły źródło adaptowanych do zimna enzymów. Dużym wyzwaniem było opracowanie metod pozwalających na wydajną izolację zimnolubnych bakterii z próbek gleby, czy wody

morskiej pochodzących z rejonów polarnych, tak aby oddawała ona w pełni bioróżnorodność danego środowiska. Większość tych szczepów identyfikowałam genetycznie poprzez sekwencjonowanie regionu 16S rDNA oraz charakteryzowałam fizjologicznie (wyznaczenie zakresu temperatur wzrostu) i biochemicznie (testy API ZYM; API System; bioMerieux, Francja oraz testy skryningowe na podłożach stałych wzbogaconych o induktory typowe dla biosyntezy pożądaných enzymów). Dzięki tym badaniom mogły powstać tzw. metryczki szczepów podające istotne informacje o danym rodzaju bądź gatunku, które m.in. umożliwiają wydajną pracę z danym mikroorganizmem poprzez stosowanie odpowiednich warunków hodowli, a także nakierowują wstępnie na jego potencjał biotechnologiczny. Takie podejście umożliwiło mi znalezienie wydajnych bakterii produkujących interesujące dla przemysłu enzymy, w tym np. esterazy i  $\beta$ -galaktozydazy (badania opublikowane, nie wchodzące w wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (pozycje IIA-1-8 i IIE-1-3)). Dzięki tym badaniom zorientowałam się, że praca z tego rodzaju mikroorganizmami może w istotny sposób zwiększyć możliwości biokatalizy stosowanej. Dokładna charakterystyka bakteryjnych enzymów (np. wyznaczenie  $T_{opt}$ ,  $pH_{opt}$ , specyficzności substratowej, stałych kinetycznych) uświadomiła mi ich duży potencjał aplikacyjny. Większe doświadczenie w pracy z tego rodzaju biokatalizatorami oraz w hodowli ich producentów pozwoliły mi skupić się w dalszych latach na konkretnych zastosowaniach tych białek i wskazywaniu zalet płynących z ich aplikacji w porównaniu do wciąż najszerszej stosowanych mezofilnych homologów. Ponadto zorientowałam się, że wiedza dotycząca eukariotycznych ekstremofili jest znacznie uboższa niż ta związana z prokariotami. Stało się to oczywiście impulsem do podjęcia badań nad tego rodzaju mikroorganizmami, głównie w kontekście zbadania ich potencjału aplikacyjnego. Towarzyszyło temu także duże zaangażowanie w powiększanie zasobów kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej w mikroorganizmy ekstremofilne.

### **C.1.1. Identyfikacja taksonomiczna izolatów pochodzących z ekstremalnych środowisk oraz ich charakterystyka fizjologiczna i biochemiczna**

Większość prowadzonych przeze mnie badań nad unikatowymi i interesującymi z biotechnologicznego punktu widzenia zimnolubnymi enzymami rozpoczęła się znalezieniem wydajnego mikrobiologicznego psychrofilnego lub psychrotrofowego producenta o pożądaných uzdolnieniach katalitycznych. Było to możliwe dzięki unikatowej w skali kraju kolekcji drobnoustrojów antarktycznych (bakterie, drożdże, grzyby strzępkowe) należącej do Instytutu Biochemii Technicznej PŁ. Kolekcja zawiera obecnie 80 taksonów, a wśród nich np. nowy gatunek bakterii – *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov, który został zdeponowany w Collection de L'Institut Pasteur, (Francja) pod nr CIP 106830<sup>T</sup> oraz w Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and

Zellkulturen pod nr DSM 13887<sup>T</sup>. Pierwotnymi źródłami, z których izolowano większość mikroorganizmów kolekcyjnych były: gleba pobrana z okolic Polskiej Antarktycznej Stacji im. Arctowskiego, woda morska Zatoki Admiralicji oraz wnętrzości 2 gatunków antarktycznego kryła *Euphausia superba* Dana i *Thysanoessa macrura*. Kolekcja jest systematycznie powiększana o nowe mikroorganizmy przez zespół, którego kierownictwo systematycznie przejmowałam po Pani prof. Turkiewicz. Dbam o to, aby każdy nowy szczep wzbogacany był o metryczkę informującą o jego przynależności taksonomicznej, morfologii, fizjologii oraz wybranych cechach biochemicznych. Takie postępowanie daje duże nadzieje na szybkie skomercjalizowanie tej kolekcji w ciągu najbliższych lat.

Obecnie kilka szczepów wyizolowanych przez mój zespół zostało zdeponowanych (z zastrzeżeniem zgody na zakup) w Kolekcji Czystych Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych (ŁOCK, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej), należącej do Światowej Federacji Kolekcji Kultur (WFCC, *ang. World Federation of Culture Collection*). Takie podejście poszerza bioróżnorodność mikroorganizmów kolekcyjnych. Na świecie znaleźć można kolekcje dedykowane tylko tego rodzaju mikroorganizmom, w Polsce natomiast takie zasoby nie istnieją, a liczba psychrofilnych i psychrotrofowych drobnoustrojów zdeponowanych w kolekcjach komercyjnych wciąż jest ograniczona.

Jednym z moich osiągnięć jest wzbogacenie kolekcji IBT o 18 szczepów drożdży, które wyizolowałam w postaci czystych kultur z próbek gleby antarktycznej otrzymanych dzięki uprzejmości dr Doroty Górniak z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Warto zaznaczyć, że próbki gleby zostały pobrane z różnych miejsc Antarktyki, np. z okolic morenki Lodowca Ekologii (Wyspa Króla Jerzego, Szetlandy Południowe), leżącej w starym gnieździe *skuy*, z miejsc porośniętych mchami i porostami oraz z miejsc bytowania pingwinów. Uważam, iż wzbogacenie kolekcji w nowe izolaty drożdży jest szczególnie cenne, ponieważ jak dotąd w literaturze najmniej informacji można znaleźć właśnie o adaptowanych do zimna drożdżach, mimo że charakteryzują się one zaskakującą zdolnością do przetrwania w środowiskach ekstremalnych. Sugeruje się nawet, że w przypadku zimnolubnych siedlisk, drobnoustroje te są lepiej zaadaptowane do życia w niskich temperaturach niż bakterie. Nadal jednak ich potencjał enzymatyczny nie jest w pełni poznany. Wyniki tych badań przedstawiłam w publikacji „Genetic and biochemical characterization of yeasts isolated from Antarctic soil samples” [*Polar Biol* 38:1-17, (2017); H-4]. Pokazują one, że wstępna izolacja obejmująca etapy uaktywnienia mikroorganizmów w glebie, właściwego namnożenia oraz ostatecznej izolacji doprowadziła do pozyskania aż 57 izolatów drożdży. Wykonane przeze mnie dla każdego z nich obserwacje makroskopowe wzrostu w pożywce stałej i płynnej, charakterystyki morfologiczne obejmujące ocenę rozmiaru i kształtu komórek, charakterystyki fizjologiczne oceniające zdolności wzrostu w zakresie temperatur 4-37 °C w stałym i

płynnym podłożu, a także charakterystyki biochemiczne dotyczące badania zdolności do asymilacji różnych źródeł węgla oraz detekcji aktywności enzymatycznych w oparciu o testy API 20C AUX i API ZYM pozwoliły stwierdzić, że część z nich wykazuje identyczne cechy fenotypowe. W związku z powyższym wstępnie sklasyfikowane 57 izolatów przypisałam do jednej z 18 tzw. grup fizjologicznych. Aby potwierdzić swoje założenia określiłam przynależność taksonomiczną wszystkich izolatów drożdży w oparciu o techniki biologii molekularnej. Amplifikowałam i sekwencjonowałam fragmenty DNA kodujące region D1/D2 należący do dużej podjednostki 26S rDNA oraz region ITS1&ITS2 leżący pomiędzy genami kodującymi podjednostki 18S i 26S rDNA. Jest to nowe podejście stosowane w IBT do identyfikacji drożdży, zazwyczaj bowiem stosowano standardową reakcję amplifikacji regionu 18S rDNA. Ważną zaletą regionu D1/D2 jest jego występowanie w genomowym DNA w wielu kopiach, ponadto charakteryzuje go wysoka zmienność międzygatunkowa, dzięki czemu analiza tych sekwencji daje szansę na dopasowanie badanego drobnoustroju do określonego gatunku. Region ITS1&ITS2, oprócz elementów zmiennych (ITS), zawiera wysoce konserwatywny fragment, w którym znajduje się gen kodujący fragment 5,8S rDNA. Podobnie jak region D1/D2, występuje on w wielu kopiach, a zmienność sekwencji ITS jest wystarczająco duża, żeby umożliwić rozróżnienie blisko spokrewnionych gatunków. Dodatkową zaletą zastosowanej przeze mnie metodyki i wyżej wymienionych regionów DNA jest obecność licznych zbiorów kodujących je sekwencji w bioinformatycznej bazie danych GenBank, są one dostępne niemal dla wszystkich zidentyfikowanych do tej pory szczepów drożdży. Identyfikacja taksonomiczna potwierdziła właściwe uszeregowanie 57 izolatów w odpowiednich grupach fizjologicznych. Sekwencje 18 amplikonów zostały zgłoszone do NCBI GenBank i każdy z nich otrzymał swój numer akcesyjny [H-4].

Dzięki dogłębnej charakterystyce morfologicznej, fizjologicznej, biochemicznej i genetycznej wykazałam, iż bioróżnorodność gleby antarktycznej jest mniejsza niż mogłyby na to wskazywać wstępne wyniki. Wykazałam, iż najbardziej rozpowszechnioną grupą taksonomiczną są drożdże z rodzaju *Cryptococcus*, które stanowią ok. 60% wszystkich wyizolowanych szczepów, a najliczniejszymi przedstawicielami tego rodzaju okazały się mikroorganizmy należące do gatunku *Cryptococcus gilvescens* (przeklasyfikowany na *Goffeauzyma gilvescens*), które zostały wyizolowane z gleby pobranej z najstarszej morenki Lodowca Ekologii, w starym gnieździe *skuy*. Dla większości z 18 antarktycznych drożdży dokonałam oszacowania zawartości DNA w komórce i określiłam ich kariotyp wykorzystując do tego celu metodę cytometrii przepływową (FCM) oraz elektroforezę w polu pulsacyjnym (PFGE). Dodatkowo, porównanie wielkości genomu z długością chromosomów umożliwiło mi oszacowanie ploidalności antarktycznych drożdży i przeprowadzenie analizy polimorfizmu chromosomalnego szczepów zaklasyfikowanych genetycznie do tego samego gatunku,

ale różniących się właściwościami fizjologicznymi i biochemicznymi. I tak, np. dla szczepów *Rhodotorula mucilaginosa* nie zaobserwowałam różnic w liczbie i długościach chromosomów pomiędzy czterema szczepami tego gatunku. Ich identyczny kariotyp składał się z 10 chromosomów o łącznej wielkości ok. 15 Mb. Podobnie w przypadku wszystkich szczepów *G. glivescens* nie zaobserwowałam polimorfizmu chromosomalnego. **Warto zaznaczyć, iż publikacja H-4 stanowi pierwsze doniesienie dotyczące wielkości genomów i kariotypów antarktycznych drożdży *G. glivescens*, *Naganishia globosa*, *Goffeauzyma gastrica* i *Naganishia albida*.** Ponadto wykazałam, że większa część z 18 szczepów drożdży antarktycznych może stanowić źródło istotnych przemysłowo hydrolaz, np. amylaz, lipaz, proteaz,  $\beta$ -galaktozydaz i fitaz. Uważam, że badanie bioróżnorodności środowiska antarktycznego z okolic Polskiej Stacji Antarktycznej obejmujące fizjologiczną, biochemiczną i molekularną charakterystykę psychrotolerancyjnych drożdży daje duży wgląd w mikrobiologię ekologiczną tego unikatowego ekosystemu oraz wskazuje potencjalnych producentów pożądaných biokatalizatorów. Ta tematyka jest w moim zespole nadal rozwijana przez mgr inż. Katarzynę Szulczewską w ramach jej pracy doktorskiej zatytułowanej „Fizjologiczna i molekularna charakterystyka zimnolubnych grzybów mikroskopowych z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej”, której jestem promotorem pomocniczym (promotor: prof. Marianna Turkiewicz). Należy także podkreślić, iż omawiane wyniki były częścią badań prowadzonych w ramach projektu PBS pt. „Nowa, zintegrowana platforma produkcji i oczyszczania białek rekombinowanych w oparciu o komórki drożdżowe” o akronimie PLATPROT (PBS1/A9/7/2012), w którym jestem głównym wykonawcą i który realizowany był wspólnie z Katedrą Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej (zakończenie projektu – 28.02.2018 r.). Celem projektu było stworzenie mikrobiologicznej innowacyjnej w skali światowej platformy do produkcji białek głównie adaptowanych do zimna i o dużym potencjale przemysłowym, opartej na psychrotroflowym szczepie drożdży. Efektem badań opisanych w publikacji H-4 było wyselekcjonowanie takiego niepatogennego szczepu drożdży należącego do kolekcji IBT, spełniającego wymogi projektu, do konstrukcji platformy przeznaczonej do produkcji interesujących z biotechnologicznego punktu widzenia biokatalizatorów. Selekcja takiego mikroorganizmu umożliwiła konstrukcję serii dedykowanych mu wektorów ekspresyjnych, umożliwiających optymalizację produkcji i sekrecji heterologicznych białek, w tym termolabilnych. W ramach projektu charakterystyce biochemicznej i fizjologicznej poddawano także szczepy zakupione ze światowych kolekcji komercyjnych, w tym np. z włoskiej kolekcji DBVPG *Industrial Yeasts Collection* (dane nie opublikowane).

Podsumowując uważam, że powiększenie kolekcji drobnoustrojów antarktycznych jest wymiernym i ważnym rezultatem moich badań. Świadczyć o tym może chociażby fakt, iż z zasobów tej kolekcji korzystają oprócz IBT PŁ, także Katedra Biotechnologii



Molekularnej i Mikrobiologii PG oraz inne jednostki krajowe (Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ, Zakład Chemii Bioorganicznej PWr - zespół prof. B. Lejczak) i zagraniczne (Uniwersytet w Pradze, Katedra Mikrobiologii – dr Lipkova, Uniwersytet w Bratysławie – prof. Martinkowa). Należy również zaznaczyć, że ok. 25% wszystkich szczepów kolekcji IBT to niezwykle pożądane dla biokatalizy mikroorganizmy psychrofilne, których optymalne temperatury wzrostu nie przekraczają 20°C.

### **C.1.2 Opracowanie wydajnych metod biosyntezy adaptowanych do zimna enzymów oraz wskazanie efektywnych procedur ich izolacji i oczyszczania**

Dobrze dobrana metoda selekcji mikroorganizmów gwarantuje wytypowanie takiego szczepu, który wykazuje poszukiwaną cechę. W praktyce często do tego celu stosuje się testy funkcjonalne oparte o hodowle drobnoustrojów w podłożach stałych z dodatkiem induktorów biosyntezy enzymów, najczęściej w postaci ich naturalnych substratów, które są stosunkowo tanie i łatwo dostępne, w tym np. odtłuszczone mleko, tributyrinę lub estry wyższych kwasów tłuszczowych, skrobię, chitynę, celulozę, laktozę do poszukiwania, odpowiednio, proteaz, esteraz/lipaz, amylaz, chitynaz, celulaz i  $\beta$ -galaktozydaz. W przypadku selekcji mikroorganizmów zimnolubnych pod kątem poszukiwania adaptowanych do zimna biokatalizatorów warunkiem koniecznym jest prowadzenie takich hodowli w odpowiednio niskich temperaturach, najczęściej w zakresie 0-10°C, w zależności od psychrofilnego lub psychrotolerancyjnego charakteru gospodarza, ponieważ niska temperatura gwarantuje ekspresję docelowego zimnolubnego białka, dla którego w prosty sposób można dokonać detekcji jego aktywności poprzez obserwację zabarwienia biomasy lub stref przejaśnień wokół kolonii. I tak, np. w celu poszukiwania mikrobiologicznych producentów adaptowanych do zimna proteaz, hodowle drobnoustrojów eukariotycznych prowadziłam w temp. 0 i 10°C na podłożach stałych z dodatkiem odpowiednio odtłuszczonego pasteryzowanego mleka. O ostatecznym wyborze źródła enzymu decydował poziom jego aktywności uzyskany po hodowlach wgłębnych szczepów, a także profile temperaturowe docelowych białek katalitycznych wyselekcjonowanych izolatów (dane nie opublikowane, zaprezentowane podczas wykładu pt. „Antarctic microorganisms – the source of enzymes for industrial biotechnology” na IV Kongresie Biotechnologii, Eurobiotech, Kraków 2011). W trakcie tych prac wyselekcjonowałam wydajnego psychrotolerancyjnego producenta drożdżowego, a badania z nim związane opisałam w publikacji “The psychrotrophic yeast *Sporobolomyces roseus* LOCK 1119 as a source of a highly-active aspartic protease for the *in vitro* production of antioxidant peptides” [*Biotechnol Appl Biochem*, (2018); H-6]. Należy podkreślić, iż w przypadku drobnoustrojów zimnolubnych kłopotliwa jest zwykle

niska wydajność syntezy biokatalizatora. W takiej sytuacji najczęściej korzysta się z technik biologii molekularnej, choć ich stosowanie nie zawsze kończy się sukcesem. Dlatego też w przypadku trudności z izolacją z naturalnego gospodarza genu kodującego pożądanego białko i wkłoniowaniem go w znacznie wydajniejszy system ekspresyjny, dobrym rozwiązaniem jest przeprowadzenie optymalizacji procesu, najlepiej metodą matematyczną, z uwzględnieniem nowoczesnych metod statystycznych. Słuszność takiego podejścia udowodniłam w publikacji H-6. Do optymalizacji biosyntezy zewnątrzkomórkowej proteazy aspartylowej produkowanej przez psychrotrofowy szczep drożdży *Sporobolomyces roseus* LOCK 1119 wykorzystano matematyczną metodę Taguchi [8]. Należy ona do planów statycznych zdeterminowanych, selekcyjnych. W tym celu wytypowano istotne dla procesu parametry poddawane optymalizacji, tj. składniki podłoża hodowlanego: glukozę, ekstrakt wołowy, ekstrakt drożdżowy i albuminę surowiczą jako induktor biosyntezy proteaz, określono zakresy ich wartości ustalone na podstawie wstępnych badań oraz zaproponowano ortogonalną macierz  $L_9$  ( $3^4$ ), wskazującą, iż optymalizacji poddano 4 zmienne wejściowe przyjmujące wartości na trzech poziomach. Analizę wyników przeprowadzono za pomocą oprogramowania statystycznego Minitab 18. Takie podejście zaowocowało znacznym zwiększeniem poziomu biosyntezy omawianej proteazy - po 7 dniach hodowli drożdży *S. roseus* prowadzonej w temperaturze 20°C w podłożu, w którym baktopenon zastąpiono ekstraktem wołowym o tym samym stężeniu 20g/L i do którego wprowadzono albuminę surowiczą w stężeniu 5 g/L odnotowano aż 70%-owy wzrost aktywności enzymu (2060 U/L). Pragnę także zaznaczyć, iż uzyskana aktywność właściwa natywnego enzymu (4,4 U/mg) była stosunkowo wysoka, jak na białko pozyskane z cieczy po hodowli psychrotolerancyjnego drożdżowego producenta. Zazwyczaj, aby osiągnąć taki poziom aktywności w przeliczeniu na mg białka, wymagana jest ekspresja docelowego genu w wydajnym systemie produkcji rekombinowanych enzymów. Wysoka aktywność właściwa biokatalizatora ułatwia procesy jego izolacji i oczyszczania, które w racjonalnym cyklu badań białek enzymatycznych są niezmiernie istotne i decydują o czystości uzyskanego preparatu enzymatycznego, a tym samym o jego dalszym zastosowaniu. I tak, np. wysoka czystość białka (99,999%) jest wymagana w przypadku wykorzystania go w przemyśle farmaceutycznym i medycynie. Dobór metod badawczych jest w dużym stopniu determinowany lokalizacją enzymu w komórce. W sytuacji najbardziej pożądanego, produkty są uwalniane przez komórki do medium hodowlanego, co umożliwia ich bezpośrednie odzyskiwanie. W moich badaniach sekrecję białka do podłoża hodowlanego obserwowałam dla proteazy aspartylowej *S. roseus*. W publikacji H-6 wykazałam, iż przyjęta strategia oczyszczania tego enzymu z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej i systemu AKTA Basic pozwoliła uzyskać preparat enzymatyczny o wysokiej czystości. W wyniku oczyszczania, z 750 ml hodowli,

otrzymano 600 µg wysokooczyszczonego preparatu proteazy o aktywności właściwej 100-krotnie wyższej niż w cieczy pohodowlanej. Większość białek nieaktywnych (ponad 96%) została usunięta w pierwszym etapie oczyszczania, w którym stosowano silny kationit (HiTrap SP FF). Ostatnie etapy preparatyki, tj. chromatografia jonowymienna na złożu Mono S i sączenie molekularne na Superose 12 umożliwiły otrzymanie enzymu o bardzo wysokiej aktywności właściwej 670 U/mg. W celu określenia czystości otrzymanego preparatu zastosowano elektroforezę w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Niepokojący wydawał się jednak fakt, iż elektroforegram obrazował zwiększającą się po każdym etapie oczyszczania liczbę prążków o masach z zakresu 10-20 kDa oraz stosunkowo niską wydajność procesu (20%). Dodając pepstatynę A (specyficzny inhibitor proteaz aspartylowych) do preparatu enzymatycznego udowodniono, iż enzym w trakcie oczyszczania i przechowywania ulegał autoproteolizie. Ostatecznie zabieg ten umożliwił pozyskanie homogennego białka, którego masa cząsteczkowa wynosi około 31 kDa. Warto podkreślić, iż jest to cecha obserwowana także u innych proteaz aspartylowych, w tym np. dla proteazy *Centaurea calcitropa*, czy tych pochodzenia roślinnego: kardozyny A i proteazy izolowanej z jęczmienia [9]. Badania nad proteazą aspartyłową są częścią rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Krysiak, której jestem promotorem pomocniczym. Praca zatytułowana „Proteaza aspartyłowa psychrotrofowych drożdży *Sporobolomyces roseus*” jest realizowana pod kierunkiem prof. Marianny Turkiewicz.

Znacznie większe trudności podczas oczyszczania pojawiają się w przypadku enzymów zlokalizowanych w błonach komórkowych lub wewnątrz komórki, opracowana metoda izolacji musi bowiem zapewniać wysoki odzysk enzymu i jego stabilność. W swoich badaniach nad zimnolubnymi enzymami błonowymi lub wewnątrzkomórkowymi sprawdzałam efektywność wielu sposobów wydzielania enzymu, korzystając z metody mechanicznej, mechaniczno-fizycznej dezintegracji biomasy (np. homogenizacja, sonikacja lub wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie biomasy w temp. -80 °C) oraz ekstrakcji zbuforowanymi roztworami detergentów. W pracy pt. „Purification, characterisation and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of LipG7 an enantioselective, cold-adapted lipase from the Antarctic filamentous fungus *Geomyces* sp. P7 with unusual thermostability characteristics” [*Enzyme Microb Technol* 53(1):18-24, (2013); H-3] wykazałam, że wydajną metodą izolacji zimnolubnej lipazy z komórek grzyba strzępkowego *Geomyces* sp. P7 (LipG7N) była mechaniczna dezintegracja biomasy. W celu uzyskania bezkomórkowego preparatu natywnej lipazy grzybnię poddawano homogenizacji w obecności szklanych kulek, a następnie dwukrotnemu procesowi zamrażania i rozmrażania. W tym przypadku, stosując chromatografie jonowymiennie na kolumnie HiTrap G FF, rozdzielone sączeniem molekularnym na HiLoad Superdec 200 pg uzyskano ok. 42-krotnie oczyszczoną lipazę o aktywności 24,0 U/mg. Zaletą opracowanej strategii oczyszczania była stosunkowo wysoka wydajność procesu równa

61%. Jeszcze wyższą wydajność procesu oczyszczania (80%) uzyskano dla rekombinantowej lipazy LipG7R, stosując tylko jeden etap chromatografii metalopowinowactwa na kolumnie HisTrap HP. Było to możliwe dzięki uzyskaniu zmodyfikowanego białka fuzyjnego eksprymowanego w mezofilnym systemie *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465.

Poszukiwanie wydajnych producentów unikatowych enzymów adaptowanych do działania w niskich temperaturach ogranicza fakt, że według obecnych szacunków aż 98-99,8% to mikroorganizmy, które bardzo trudno namnaża się w laboratorium. Trudności te wynikają zazwyczaj z niemożności odtworzenia w warunkach laboratoryjnych specyficznych parametrów, chemicznego składu i skomplikowanych zależności troficznych, jakie charakteryzują naturalne środowiska ich bytowania [10]. Nadzieję na dostęp do tych potencjalnie interesujących dla biotechnologii, ale niezwykle kapryśnych drobnoustrojów, dają jedynie bezpośrednie badania całości materiału genetycznego obecnego w próbce (np. gleba, woda morska, itp.) pochodzącej z siedlisk, w których te drobnoustroje naturalnie bytują, czyli badania metagenomu, albo inaczej środowiskowego DNA (*environmental DNA*, eDNA). Badania z tego zakresu były realizowane w Instytucie Biochemii Technicznej w ramach projektu badawczego pt. „W poszukiwaniu nowych zimnolubnych enzymów lipolitycznych o dużym potencjale biotechnologicznym”, którego byłam głównym wykonawcą, a kierownikiem była prof. Turkiewicz. Jego podstawowym celem było poszukiwanie genów zimnolubnych lipaz w DNA metagenomowym, czyli izolowanym bezpośrednio z próbek gleby antarktycznej, co w założeniu zapewniało dostęp także do materiału genetycznego drobnoustrojów trudno hodowalnych. Moje badania w tym projekcie obejmowały wytypowanie gleb antarktycznych charakteryzujących się wysokimi aktywnościami enzymów lipolitycznych na podstawie przeprowadzonej przeze mnie analizy fizykochemicznej próbek gleby oraz oznaczenia aktywności wybranych enzymów *in situ* z zastosowaniem jako substratów 4-metyloumbeliferylowych, pochodnych kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha z zakresu C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> (badania opublikowane, nie wchodzące w wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (pozycja IIE-2). Właściwe wytypowanie próbek gleby pozwoliło zespołowi z Politechniki Gdańskiej wyselekcjonować lipolityczny klon i zsekwencjonować jego gen. Niestety nie udało nam się uzyskać wydajnej ekspresji genu *lip1* w *E. coli* mimo skonstruowania dwóch systemów jego heterologicznej ekspresji.

Dwa różne opisane powyżej i realizowane przez nasz zespół podejścia do pozyskiwania unikatowych biokatalizatorów, jedno pokazujące drogę od mikrobiologicznego producenta do enzymu, a drugie od genu nieznanego gospodarza do pożądanego białka otwierają duże możliwości dla interdyscyplinarnych badań z zakresu biokatalizy stosowanej.

### **C.1.3 Charakterystyka kinetyczna zimnolubnych biokatalizatorów oraz określenie ich potencjalnych możliwości aplikacyjnych ze wskazaniem zalet tych enzymów jako doskonałej alternatywy dla mezofilnych homologów**

Technologiczna przydatność enzymów wykorzystywanych w przemyśle, w tym także w przetwórstwie i modyfikacji żywności, wynika z ich właściwości kinetycznych, zdeterminowanych molekularną strukturą białka enzymatycznego. I tak, w procesach korzystnie przebiegających w wysokiej temperaturze powinno się stosować enzymy o wysokiej optymalnej temperaturze działania i jednocześnie termostabilne. Takie enzymy najczęściej pochodzą z drobnoustrojów termo-, a nawet hipertermofilnych i ze względu na dużą sztywność cząsteczek są mało podatne na termiczną denaturację [11]. Dla biokatalizy niskotemperaturowej z kolei, szczególnie przydatne powinny być enzymy adaptowane do zimna, produkowane przede wszystkim przez mikroorganizmy bytujące w permanentnie zimnych biotopach, np. polarnych. Cząsteczki tych białek są z natury bardziej giętkie i luźniej upakowane niż homologicznych enzymów drobnoustrojów mezofilnych, głównie dotąd wykorzystywanych w przemyśle [12]. Dotychczasowe badania tych białek wykazały, że mają one zdolność znacznie większego obniżania energetycznej bariery reakcji (energii aktywacji), niż ich mezofilne odpowiedniki, jednakże nie wiąże się to ze zmianą molekularnego mechanizmu katalizy przebiegającej z ich udziałem.

W ramach wcześniej realizowanego projektu badawczego pt. „ $\beta$ -galaktozydazy ekstremofili i ich wykorzystanie w modyfikacji żywności” (PBZ/KBN/021/P06/99/24), w którym byłam głównym wykonawcą, wyselekcjonowałam i scharakteryzowałam zimnolubną  $\beta$ -galaktozydazę pochodzącą z morskich bakterii *Pseudoalteromonas* sp. 22b, które zostały wyizolowane z wnętrza antarktycznego skorupiaka *Thysanoessa macrura*, bytującego w wodach szelfowych Zatoki Admiralicji na Wyspie Króla Jerzego (Szetlandy Płd). Porównując właściwości tego enzymu z właściwościami jego mezofilnego homologa z *E. coli* dowiodłam, iż antarktyczny enzym jest psychrofilnym enzymem kinetycznie zaadaptowanym do niskiej temperatury, charakterystycznej dla antarktycznego morskiego środowiska (badania opublikowane, nie wchodzące w wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (pozycja IIA-1)). Do tych adaptacji należy zaliczyć:

- optymalną temperaturę działania niższą o 15°C od  $T_{opt}$  mezofilnego odpowiednika z *E. coli*,
- stosunkowo wysoką aktywność w zakresie 0-20°C (11-35% aktywności maksymalnej, tj. 21-67 U/mg białka), w którym enzym mezofilny nie wykazuje (0°C) lub przejawia bardzo niską aktywność (w 20°C - 8% aktywności

maksymalnej),

- termostabilność znacznie niższą od termostabilności mezofilnego odpowiednika,
- zależność pH-stabilności od temperatury (w niższych temperaturach zakres pH-stabilności jest szerszy, w 40°C wyraźnie się zawęża),
- powinowactwo do laktozy w temp. 15°C 5-krotnie wyższe niż enzymu z *E. coli* ( $K_m$ ; odpowiednio, 3,7 i 18,7 mM) i 3-krotnie wyższą liczbę obrotów antarktycznej  $\beta$ -galaktozydazy w hydrolizie tego substratu w 15°C, mierzoną wartością stałej katalitycznej  $k_{kat}$  (58 i 17 s<sup>-1</sup>), a także 1,6-krotnie wyższą efektywność katalityczną ( $k_{kat}/K_m$ ) enzymu antarktycznego w rozkładzie ONPG w 15°C, mimo że nie jest to preferowany substrat tej  $\beta$ -galaktozydazy, przeciwnie niż dla enzymu z *E. coli*.

Interesujące z technologicznego punktu widzenia właściwości psychrofilnej  $\beta$ -galaktozydazy sprawiły, iż rozpoczęłam dalsze badania w kierunku możliwości aplikacji tego białka. Najbardziej obiecujące było jego zastosowanie w przetwórstwie żywności, a dokładnie w technologii produktów mleczarskich, tj. do niskotemperaturowej hydrolizy laktozy w mleku. Obecnie stosowane  $\beta$ -galaktozydazy pochodzą z mikroorganizmów mezofilnych, głównie drożdży, przede wszystkim z rodzaju *Kluyveromyces*, mających status GRAS, bądź z grzybów strzępkowych, np. z *Aspergillus niger* i są w omawianych przedziałach temperatur mało aktywne, a prowadzenie procesu hydrolizy w wyższej temperaturze wiąże się z ryzykiem zakażeń surowca mikroflorą mezofilną oraz utratą właściwości odżywczych i pogorszeniem cech organoleptycznych mleka podczas inkubacji w podwyższonej temperaturze [13]. Dużą niedogodnością psychrofilnej  $\beta$ -galaktozydazy była stosunkowo niska wydajność biosyntezy enzymu przez macierzysty szczep bakterii. Jednak dzięki współpracy z Katedrą Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii PG udało się uzyskać ekspresję antarktycznej  $\beta$ -galaktozydazy w mezofilnym gospodarzu, co zwiększyło ok. 10-krotnie wydajność biosyntezy enzymu i pozwoliło uzyskać z 1 litra hodowli szczepu *E. coli* ER2566 stransformowanego plazmidem pETbeta22b z genem tego białka ok. 3 mg homogennej  $\beta$ -galaktozydazy (badania opublikowane, nie wchodzące w wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (pozycja IIA-2)).

W publikacji „Immobilized preparation of cold-adapted and halotolerant Antarctic  $\beta$ -galactosidase as a highly stable catalyst in lactose hydrolysis,” [*FEMS Microbiol Ecol* 59:535-542, (2007); H-1] udowodniłam przydatność psychrofilnej  $\beta$ -galaktozydazy 22b do hydrolizy laktozy w mleku i w słodkiej serwatce, zwłaszcza poniżej 20°C. Wynika ona nie tylko z jej preferencji temperaturowych, ale także z niewrażliwości na jony wapnia i wysokie stężenia NaCl. Wykazano ponadto, że w przeciwieństwie np. do  $\beta$ -galaktozidaz pochodzących z *Kluyveromyces*, enzym 22b nie jest inhibowany przez galaktozę. Pewnym utrudnieniem wydawała się częściowa inhibicja enzymu przez glukozę (w ok. 40%-ach w temp. 4°C w ciągu 24 godzin przy stężeniach tego cukru powyżej 80 mM),

która okazała się niekompetycyjnym inhibitorem enzymu. Jednakże, jak się okazało, efekt ten całkowicie znosi immobilizacja  $\beta$ -galaktozydazy 22b na stałych nośnikach. W związku z tą obserwacją, a także biorąc pod uwagę ekonomikę procesu (możliwość wielokrotnego użycia tej samej porcji enzymu w reakcji hydrolizy) opracowana została stosunkowo wydajna procedura immobilizacji rekombinowanego białka w chitozanie - nośniku charakteryzującym się niską ceną i dostępnością. Z uaktywnioną matrycą wiązało się średnio 9 mg białka/g mokrego nośnika i około 70% aktywności obecnej w wyjściowym ekstrakcie, a mierzona w hydrolizie ONPG aktywność właściwa unieruchomionej  $\beta$ -galaktozydazy wynosiła średnio ok. 12 U/g chitozanu. Chociaż powinowactwo immobilizowanego enzymu do substratu istotnie zmalało (stałe  $K_m$  unieruchomionego i natywnego enzymu względem ONPG wynoszą w 30°C, odpowiednio, 1,12 i 7,14 mM), immobilizacja nie spowodowała żadnych zmian względnej aktywności  $\beta$ -galaktozydazy w niskich zakresach temperatury, wzrosła natomiast o 10°C (do 50°C) temperatura optymalna w porównaniu z enzymem natywnym, a także nieco zwiększyła się jego termostabilność. W niewielkim stopniu rozszerzył się zakres optymalnego pH immobilizowanej  $\beta$ -galaktozydazy (pierwotnie pH 6-8, po immobilizacji pH 6-9), nie zmienił się natomiast zakres pH-stabilności. Związanie  $\beta$ -galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp.22b z chitozaniem spowodowało wyraźny wzrost stabilności białka w środowiskach o wysokiej sile jonowej. Po 24-godzinnej inkubacji w 6M NaCl immobilizowany enzym zachował 68% aktywności początkowej, podczas gdy wolny tracił w tych warunkach 53% aktywności.

Wykazano, że immobilizowane w chitozanie preparaty  $\beta$ -galaktozydazy 22b cechuje wysoka stabilność operacyjna i stabilność w przechowywaniu. Enzym zachowuje pełną aktywność w ciągu co najmniej 40-dniowego eksperymentu ciągłej hydrolizy laktozy w 15°C z jego udziałem i w ciągu co najmniej 12 miesięcy przechowywania w 4°C. W skonstruowanym przez nas systemie z reaktorem i z ciągłym przepływem substratu (4,8% roztwór laktozy), unieruchomiony enzym hydrolizował laktozę w jednakowym ustalonym tempie w ciągu 40 dni trwania eksperymentu. Ponadto wykazano, że stosując do hydrolizy laktozy w mleku immobilizowaną  $\beta$ -galaktozydazę *Pseudoalteromonas* sp.22b, w ilości ok. 30 U unieruchomionego enzymu na 1 gram cukru, można uzyskać wysoki, 93%-owy stopień rozkładu tego disacharydu w przedziale temperatur 4 – 30°C w ciągu 8-24 godzin.

**Bez wątpienia, co wykazano w publikacji H-1, immobilizowana na chitozanie  $\beta$ -galaktozydaza *Pseudoalteromonas* 22b jest atrakcyjną formą adaptowanego do niskich temperatur biokatalizatora, przydatną do otrzymywania mleka bezlaktozowego, jak również do usuwania laktozy ze słodkiej serwatki.** Dalsze badania nad tym enzymem pokazały, że można go także wykorzystać w reakcjach syntezy alkilowych pochodnych galaktopiranozy. Związki te mogą być z powodzeniem

wykorzystywane jako biosurfaktanty w przemyśle kosmetycznym i w chemikaliach dla gospodarstw domowych (dodatki do środków piorących), w przemyśle farmaceutycznym jako bloki budulcowe, a także w biologii molekularnej. Są to związki niejonowe wykazujące właściwości bakteriobójcze, łatwo biodegradowalne i bardziej stabilne w środowiskach o wysokim pH niż estry sacharydów z wyższymi kwasami tłuszczowymi [14; 15].

Znane są metody chemicznej syntezy anomerycznie czystych związków tego typu na drodze reakcji Koenigsa-Knorra. Obejmują one jednak szereg reakcji protekcji i deprotekcji, przez co ich synteza jest bardzo pracochłonna i wymaga dość drastycznych warunków reakcji [16]. Za użyciem  $\beta$ -galaktozydaz w tego rodzaju syntezach przemawia ich niska cena i ogólny dostęp do substratu - laktozy, która jest odpadem przemysłu mleczarskiego. Wadą laktozy jest jej niska rozpuszczalność w wodzie w niskich temperaturach, dlatego uzasadnione wydaje się użycie  $\beta$ -galaktozydaz termofilnych, które z powodzeniem mogą syntetyzować wiązanie glikozydowe w wysokich temperaturach. Wadą enzymów termofilnych jest jednak duża sztywność ich cząsteczek, co ogranicza gamę produktów możliwych do otrzymania z ich udziałem w porównaniu z odpowiednikami mezo- i psychrofilnymi, których cząsteczki są dużo bardziej elastyczne.

**W publikacji „Antarctic, cold-adapted  $\beta$ -galactosidase of *Pseudoalteromonas* sp. 22b as an effective tool for alkyl galactopyranosides synthesis” [Enzyme Microb Technol 44:59-64, (2009); H-2] wykazałam, że antarktyczna  $\beta$ -galaktozydaza *Pseudoalteromonas* sp. 22b jest efektywnym narzędziem do syntezy alkilowych pochodnych galaktopiranozy, zwłaszcza dla alkoholi o długości łańcucha C3-C6. Udowodniono także, że dla syntez z udziałem większości testowanych alkoholi, tj: 2-propanolu, 1-butanolu, 1-pentanolu, 2-pentanolu, 1-heksanolu, cykloheksanolu i 1-oktanolu, najwyższą i prawie identyczną wydajność uzyskuje się przy stosunkowo szerokim zakresie stężenia wody w środowisku reakcji, wynoszącym 10 - 30%. W reakcjach z t-butanolem, 2-metoksyetanołem i fenolem nie stwierdzono powstawania produktów w żadnym z wariantów reakcji, a dla 2-etylo-1-heksanolu, nonanolu i alkoholu benzylowego wydajności reakcji były bardzo niskie. Optymalizując warunki procesu pokazano, iż istotny wpływ na wydajność syntezy glikozydowych pochodnych alkoholi ma stosunek stężeń substratów (stosunek stężeń molowych alkohol : laktoza). Wysokie stężenie laktozy przesuwają równowagę reakcji w stronę syntezy, ponadto w przypadku syntez prowadzonych w środowiskach zawierających rozpuszczalniki organiczne laktoza działa osłonowo na enzym. Co więcej, cukier ten ma większe powinowactwo do centrum aktywnego niż glikozydowe pochodne i jego obecność w środowisku zapobiega hydrolizie produktu reakcji transglikozylacji. Opierając się na wynikach poprzedniego eksperymentu przeprowadzono reakcję w układzie zawierającym stałą ilość (30%, v/v) fazy wodnej (ekstrakt enzymatyczny i bufor) i**



obydwa substraty (heksanol i laktozę) w zmiennych proporcjach molowych (10:1, 5:1, 2:1, 1:1 oraz 1:2). Synteza galaktopiranozydu heksylu najwydajniej przebiegała przy 5-krotnym nadmiarze molowym alkoholu względem laktozy i w przedziale pH 6-9, czyli w zakresie odpowiadającym optymalnemu pH reakcji hydrolizy katalizowanej przez ten enzym. Stwierdzono w czasie trwającego 80 godzin eksperymentu, że maksymalne nagromadzenie produktów syntezy następuje pomiędzy 40 a 50 godziną inkubacji mieszaniny reakcyjnej. Po tym czasie obserwuje się spadek ich stężenia, niewielki - 8 i 4% - w przypadku, odpowiednio, pochodnych 2-propanolu i 1-butanolu w 80 h reakcji, a nieco większy, odpowiednio 18 i 14%, dla pochodnych 1-pentanolu i 1-heksanolu, co jest wynikiem ich hydrolizy przez enzym. Wykazano, że w przypadku antarktycznego enzymu *Pseudoalteromonas* sp.22b nie stwierdzono tak dużego, jak dla większości do tej pory opisanych biokatalizatorów, wpływu długości łańcucha w zakresie C3-C6 na wydajność syntezy glikozydowych pochodnych.

Uważa się, że reakcje enzymatyczne, zwłaszcza z udziałem substratów słabo mieszających się z wodą, powinny przebiegać wydajniej w środowiskach zawierających dodatek rozpuszczalnika organicznego, jednakże istotnym problemem może być inaktywacja enzymu w takim środowisku. W przypadku antarktycznej  $\beta$ -galaktozydazy, w obecności większości testowanych rozpuszczalników, z wyjątkiem dioksanu, nie stwierdzono drastycznych zmian aktywności po 24 godzinach inkubacji, jeśli stężenie rozpuszczalnika w mieszaninie reakcyjnej nie przekraczało 20% (v/v), natomiast w układzie z 50% dodatkiem rozpuszczalnika, białko wykazywało aktywność i to dość znaczną (ok. 60% aktywności maksymalnej), tylko w środowisku zawierającym t-butanol. Wpływ rozpuszczalników organicznych w stężeniu 10 i 20% na wydajność transglikozylacji z udziałem badanej  $\beta$ -galaktozydazy, zbadano na przykładzie syntezy galaktopiranozydu heksylu i okazał się on zróżnicowany, tj. w obecności 20% octanu etylu i t-butanolu wydajność syntezy wzrosła 1,5-krotnie w stosunku do próby odniesienia, a w obecności 10% acetonu nawet ponad dwukrotnie. Oznacza to, że pomimo niższej aktywności w środowisku rozpuszczalników enzym katalizuje syntezę galaktopiranozydu heksylu w ich obecności dużo wydajniej i jest to prawdopodobnie związane z obecnością w środowisku reakcji laktozy, która może chronić białko katalityczne przed denaturacją i jednocześnie pełnić funkcję stabilizującą.

Mając na uwadze fakt, iż niektóre  $\beta$ -galaktozydazy drobnoustrojów mezofilnych katalizują nie tylko syntezę glikozylowanych alkoholi, ale mogą także wykorzystywać w charakterze akceptorów reszty galaktopiranozy inne związki zawierające w cząsteczce grupę hydroksylową, jak np. aminokwas oraz antybiotyki, wykonano takie reakcje dla antarktycznego enzymu. Acetal glicerynowy cykloheksanonu, BocNH-etanolamina i ZNH-etanolamina wchodziły, co prawda, w reakcję (analiza TLC wykazała obecność produktów), jednak wydajności transglikozylacji były na tyle niewielkie, że nie udało się

otrzymać produktów w ilościach wystarczających do analizy NMR, potwierdzono jedynie ich obecność za pomocą LC-MS. Badania dotyczące zdolności wytwarzania alkilowych pochodnych galaktopiranozy przez antarktyczną  $\beta$ -galaktozydazę zostały opatentowane (patent nr P379317, patent nie wchodzi w skład osiągnięcia naukowego). Jestem jednym ze współautorów tego patentu.

Innym enzymem, interesującym także pod kątem przetwórstwa żywności, jest termolabilna eukariotyczna proteaza aspartylowa oznaczona numerem G8 i wyizolowana z psychrotrofowych drożdży *Sporobolomyces roseus* LOCK 1119. Szczep ten został wyselekcjonowany w ramach badań prowadzonych w zakresie projektu PLATPROT (PBS1/A9/7/2012). W tym miejscu chciałabym podkreślić, że większość tego rodzaju proteaz pochodzenia mikrobiologicznego opisanych dotychczas w literaturze to białka produkowane głównie przez grzyby strzępkowe, zdecydowanie mniej informacji mamy na temat tego rodzaju białek pochodzenia drożdżowego. Jak dotąd, opisano zaledwie dwa drożdżowe enzymy proteolityczne zaadaptowane do działania w niskich temperaturach, tj. proteazę serynową produkowaną przez antarktyczne drożdże *Leucosporidium antarcticum* (obecnie *Glaciozyma martini*) [17] oraz proteazę aspartylową *Candida humicola* [18]. Dlatego też uznałam, że badania te poszerzą wiedzę o proteazach drożdżowych adaptowanych do zimna. Dokładniejsza charakterystyka kinetyczna proteazy aspartylowej *S. roseus* przedstawiona w publikacji H-6 pokazała, iż:

- najwyższą aktywność enzym wykazuje w temperaturze 50°C, zachowując ok. 10-30% maksymalnej aktywności w zakresie temperatur 0-25°C,
- białko katalityczne jest termolabilne, co oznacza, że zachowuje pełną stabilność do 20°C w czasie 60 minut. Podwyższenie temperatury do 50°C całkowicie inaktywuje enzym;
- optymalne pH działania tego enzymu w hydrolizie hemoglobiny zdenaturowanej mocznikiem wynosi 4,0, a jego pH-stabilność 2,0-6,5 (24 godz.; 4°C);
- spośród substratów naturalnych największą aktywność proteaza ta wykazuje względem zdenaturowanej mocznikiem oraz natywnej hemoglobiny, natomiast w przypadku substratów syntetycznych wobec N-bursztyno-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroaniliny i N-bursztyno- Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroaniliny;
- aktywność enzymatyczna pozostaje bez większych zmian w obecności jonów Na<sup>+</sup> i Mg<sup>2+</sup>;
- proteaza G8 ulega częściowej denaturacji w obecności czynników redukujących, tj. 2-merkaptoetanolu i ditiotretolu;
- białko ulega całkowitej inaktywacji w obecności detergentu jonowego SDS, natomiast niejonowy detergent Triton X-100 nie wpływa na poziom

aktywności.

Jak wykazaliśmy, optymalna temperatura działania proteazy aspartylowej *S. roseus* LOCK 1119 jest stosunkowo wysoka, jak na enzym produkowany przez zimnolubne drożdże. Dane literaturowe podają jednak przykłady proteaz pochodzących z organizmów psychrofilnych i psychrotrofowych, które wykazują maksymalne aktywności w podobnym zakresie temperatur, tj. 45-50°C. Przykładem mogą być tu metaloproteazy produkowane przez szczepy bakterii *Pseudomonas fluorescens* [19] oraz *Xanthomonas maltophilia* [20], a także proteaza serynowa produkowana przez psychrofilny szczep morskich bakterii PA-43 [21]. Istotną cechą wskazującą na zimnolubny charakter badanego enzymu jest natomiast jego bardzo wysoka termolabilność. Ta cecha może okazać się niezwykle pożądana, zwłaszcza dla szybkiej, taniej i mało skomplikowanej inaktywacji białka po procesie.

Dokładna charakterystyka kinetyczna proteazy G8, a zwłaszcza jej specyficzność substratowa względem aminokwasów aromatycznych i hydrofobowych, nakierowała mnie w stronę wykorzystania tego enzymu w pozyskiwaniu bioaktywnych peptydów. Związki te po uwolnieniu z białek wykazują właściwości przeciwutleniające a ich obecność w żywności wpływa na jakość surowców i produktów spożywczych, mechanizmy ich wchłaniania oraz profilaktykę chorób dietozależnych. Coraz większe znaczenie bioaktywnych peptydów nie tylko w medycynie, ale również w innych gałęziach przemysłu, najszerzej stosowane metody ich pozyskiwania oraz pojawiające się nowe alternatywy dla tego trendu opisałam w pracy przeglądowej „Extremophilic proteases as novel and efficient tools in short peptide synthesis” [*J Ind Microbiol Biotechnol* 44(9):1325-1342, (2017); H-5].

**Wyniki prac prowadzonych pod tym kątem z użyciem proteazy aspartylowej *S. roseus* (publikacja H-6) wskazują, że enzym ten stanowi narzędzie przydatne w otrzymywaniu bioaktywnych peptydów.** Do tej pory przetestowano zdolności katalityczne tego enzymu w rozkładzie kilku substratów białkowych, tj. suszonego rozpyłowo jaja kurzego oraz białka jaja kurzego, owoalbuminy i kazeiny, a także dobrano warunki ich hydrolizy. Zaobserwowaliśmy, iż dla wydajnego prowadzenia procesu hydrolizy najkorzystniejsza jest temp. 30°C przy stosunku substratu do enzymu 10:1 w/w dla suszu jajecznego i białka jaja w proszku oraz 5:1 w/w dla owoalbuminy oraz kazeiny. Potwierdziliśmy, stosując techniki spektrofotometryczne, że wszystkie uzyskane hydrolizaty wykazywały zdolność do zmiatania rodników DPPH. Najwyższy stopień hydrolizy wynoszący około 53% osiągnięto stosując jako substrat 1% roztwór kazeiny pochodzącej z mleka bydlęcego, także w przypadku tego surowca uzyskano peptydy charakteryzujące się najwyższym poziomem zdolności zmiatania rodników DPPH wynoszącym blisko 65%. Pozostałe uzyskane w ramach prowadzonych badań hydrolizaty suszu jajecznego, białka jaja w proszku oraz owoalbuminy wykazywały

zbliżony poziom aktywności do zmiatania rodników DPPH wynoszący od 31 do 34%. Wstępne dane są na tyle optymistyczne, że badania te są intensywnie kontynuowane w moim zespole a uzyskane wyniki stanowią punkt wyjścia do określenia struktury molekularnej peptydów a następnie dążenia do zrozumienia zależności między ich budową i funkcją biologiczną.

Oprócz wykorzystywania zimnolubnych enzymów w przetwórstwie żywności coraz częściej próbuje się je stosować w syntezie chiralnych bloków budulcowych, przydatnych zwłaszcza w chemii medycznej i farmaceutycznej. Zwykle takie syntezy prowadzi się w środowisku rozpuszczalników organicznych, powodującym znaczne usztywnienie struktury białka i najczęściej też spadek jego aktywności, choć równocześnie środowisko organiczne może zwiększać w pewnym stopniu enancjoselektywność reakcji. Zastosowanie bardziej giętkich z natury białek psychrofilnych umożliwia też prowadzenie syntezy w bardziej hydrofobowych rozpuszczalnikach niż ma to miejsce w przypadku katalizy z udziałem enzymów mezofilnych. Szczególnie istotna dla procesu kinetycznego rozdziału racematów jest też możliwość takiego obniżenia temperatury, która wyklucza reakcję z jednym z enancjomerów. Powyższe argumenty spowodowały, że zaczęłam poszukiwać takich enzymów, głównie z grupy lipaz. Enzymem lipolitycznym interesującym pod kątem stereoselektywnego katalizowania reakcji okazała się eukariotyczna lipaza wytwarzana przez antarktyczne grzyby strzępkowe *Geomyces* sp. P7, charakteryzująca się wysoką enancjoselektywnością w transestryfikacji modelowego alkoholu 1-fenylotanolu z octanem winylu. Badania nad właściwościami tego białka były możliwe dzięki uzyskaniu w 2011 r. finansowania projektu własnego (NCN) pt. „Lipaza *Geomyces* sp. P7 jako nowe, unikatowe narzędzie w technologii chemicznej”, którego byłam kierownikiem. Niektóre z tych właściwości, w tym np. wpływ soli i detergentów na aktywność enzymu, optimum pH były zbliżone do właściwości większości znanych lipaz, natomiast unikatowy okazał się wpływ temperatury na aktywność i stabilność enzymu. O ile profil aktywności w przedziale temperatury 0-55°C jest uzasadniony adaptacją białka pochodzącego z psychrofilnej pleśni do niskich temperatur (15% maksymalnej aktywności w 0°C, optimum w 35 °C i brak aktywności w 55 °C), to zaskakująca okazała się jego wysoka termostabilność. Badanie stabilności termicznej przeprowadzono inkubując preparat enzymatyczny przez godzinę w temperaturach 20-100°C, a następnie po powolnym schłodzeniu próby do temperatury 35°C oznaczano pozostałą część aktywności. Co najbardziej zaskakujące, obserwowano niemal całkowity odzysk aktywności. Nie znaleziono jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy wysoka termostabilność lipazy *Geomyces* sp. P7 wynika z samej budowy białka, czy też jest na przykład rezultatem metodyki doświadczenia, to jest oznaczania aktywności w teście z hydrofobowymi substratami (pochodne pNP rozpuszczone w acetonitrylu lub TAG w postaci emulsji w PVA), wprowadzanymi do roztworu lipazy, ale dopiero po etapie

termicznej inaktywacji. Jedną z naszych hipotez zakłada, iż wysoka termostabilność lipazy polega na łatwej, samoistnej renaturacji zinaktywowanego termicznie białka i jest prawdopodobnie wynikiem unikatowej sekwencji aminokwasowej. Do tych różnic należy specyficzne usytuowanie mostka disiarczkowego w jednej z pętli, którego odtwarzanie może mieć kluczowe znaczenie dla prawidłowego fałdowania się enzymu, czyli także jego renaturacji.

Aby ocenić przydatność lipazy *Geomyces* sp. P7 i porównać jej właściwości z innymi opisanymi w literaturze enzymami homologicznymi wyznaczono stałe kinetyczne charakteryzujące jej działanie w hydrolizie octanu-*p*-nitrofenolu. I tak odwrotność stałej  $K_m$  opisująca powinowactwo enzymu do substratu wynosi  $8,5 \times 10^{-3}$  M i mieści się w granicach  $10^{-1}$ –  $10^{-5}$  M, wyznaczonych dla większości przemysłowo stosowanych lipaz [22]. Wartość  $k_{kat}$  dla antarktycznego enzymu oszacowano na  $118 \text{ s}^{-1}$ , a jej efektywność katalityczną na  $1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Są to wartości wskazujące, iż lipaza G7 wykazuje potencjał podobny do innych tego rodzaju zimnolubnych białek, w tym np. do adaptowanej do działania w niskich temperaturach lipazy *Sorangium cellulosum* [23]. Nadal jednak jej zdolności katalityczne są mniejsze niż wykorzystywanych często w biotransformacjach lipaz pochodzących z drożdży *Yarrowia lipolytica* czy *Pseudozyma antarctica* [24; 25].

Zidentyfikowane przez nas właściwości lipazy *Geomyces* sp. P7 czynią ją użytecznym narzędziem w syntezie chemicznej, jednak produkcja tego białka przez szczep rodzicielski byłaby nieopłacalna ze względu na konieczność hodowli pleśni w niskiej temperaturze i bardzo wolny wzrost szczepu (trzy tygodnie w  $15^\circ\text{C}$  dla maksymalnej biosyntezy lipazy, co nie oznacza, że proces jest wydajny). Z tego powodu podjęto próbę heterologicznej ekspresji genu lipazy w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Te doświadczenia wykonaliśmy we współpracy z zespołem Pani Lesley Iwanejko z Uniwersytetu w Liverpool. Dzięki innowacyjnemu podejściu, polegającemu na przygotowaniu biblioteki cDNA, która posłużyła do przygotowania pirosekwencjonowania udało się znaleźć sekwencję genu docelowej lipazy *Geomyces* sp. P7. Ekspresja tego genu w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* BJ5465 zaowocowała uzyskaniem rekombinowanej lipazy, której właściwości były takie same jak białka natywnego. Wykazano także, że oba enzymy katalizują enancjoselektywnie reakcję transestryfikacji (R,S)-1-(fenylo)-etanolu z octanem winylu przy stopniu konwersji 45-49 % i nadmiarze enancjomerycznym (e.e.) – 85-99% formy R estru.

Reasumując - wyselekcjonowana lipaza *Geomyces* sp. P7 jest unikatowym enzymem. Pomimo podobieństwa do takich białek, jak lipazy *Pseudozyma antarctica* A i B, esteraza *A. niger*, czy też lipaza *A. fumigatus*, wyróżnia się przede wszystkim wysoką termostabilnością (zdolnością do renaturacji) przy jednoczesnym zaadaptowaniu do niskich temperatur, co jest niespotykane w enzymach nie poddawanych modyfikacjom

chemicznym bądź ukierunkowanej ewolucji. **A zatem, co pokazano w publikacji H-3, enzym z antarktycznej pleśni *Geomyces* sp. P7 jest doskonałym katalizatorem kinetycznego rozdziału drugorzędowych alkoholi, a w połączeniu z unikatowymi właściwościami czyni go atrakcyjnym narzędziem w syntezie chemicznej.**

## LITERATURA

1. Javed A, Qazi JI. (2016) Psychrophilic microbial enzymes implications in coming biotechnological processes. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences* (ASRJETS), 23:103-120
2. Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, Omar SM, Siddiqui KS, Williams TJ. (2011) Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial Biotechnology* 4(4): 449-460
3. Szczęsna-Antczak M, Kamińska J, Florczak T, Turkiewicz M. (2014) Cold-active yeast lipases: Recent issues and future prospects. Book: *Cold-adapted yeasts biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance*. Editor: T. Satyanarayana. Springer ISBN: 978-1-4020-8291-7
4. Tan S, Apenten RKO, Knapp J. (1996) Low temperature organic phase biocatalysis using cold-adapted lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* P38. *Food Chemistry* 57: 415-418
5. Dornez E, Verjans P, Arnaut F, Delcour JA, Courtin CM. (2011) Use of psychrophilic xylanases provides insight into the xylanase functionality in bread making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (17): 9553-9562. doi: 10.1021/jf201752g. Epub 2011 Aug 12
6. Cieśliński H, Wanarska M, Pawlak-Szukalska A, Krajewska E, Wicka M, Kur J. (2016) Cold-active  $\beta$ -galactosidases: sources, biochemical properties and their biotechnological potential. Book: *Biotechnology of extremophiles: Advances and Challenges*. Editor: P H. Rampelotto. Springer ISSN 2367-1017
7. Pulicheria KK, Ghosh M, Kumar PS, Rao KRSS. (2011) Psychrozymes-the next generation industrial enzymes. *Journal of Marine Science Research & Development*. 1:1
8. Rao RS, Kumar CG, Prakasham RS, Hobbs PJ. (2008) The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: A critical appraisal. *Biotechnology Journal* 3: 510-523. doi: 10.1002/biot.200700201.
9. Ramalho-Santos M, Verissimo P, Cortes L, Samyn B, Van Beeumen J, Pires E, Faro C. (1998) Identification and proteolytic processing of procardosin A. *European Journal of Biochemistry* 255: 133-138
10. Coughlan LM, Cotter PD, Hill C, Alvarez-Ordóñez A. (2015) Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology* 6: 672. doi: 10.3389/fmicb.2015.00672
11. Sarmiento F, Peralta R, Blamey JM. (2015) Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3:148. doi: 10.3389/fbioe.2015.00148
12. Struvay C, Feller G. (2012) Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 13:11643-11665. doi:10.3390/ijms130911643

13. Nath A, Mondal S, Chakraborty S, Bhattacharjee C, Chowdhury R. (2014) Production, purification, characterization, immobilization, and application of  $\beta$ -galactosidase: a review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 9:330-348. doi: 10.1002/apj.1801
14. Woudenberg-van-Oosterom M, van Belle HJA, van Rantwijk F, Sheldon RA. (1998) Immobilised  $\beta$ -galactosidases and their use in galactoside synthesis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 134:267-274
15. Hansson T, Adlercreutz P. (2002) Enzymatic synthesis of hexyl glycosides from lactose at low water activity and high temperature using hyperthermostable  $\beta$ -glycosidases. *Biocatalysis and Biotransformation* 20(3):167-178. doi: 10.1080/10242420290020697
16. van Rantwijk F, Woudenberg-van Oosterom M, Sheldon RA. (1999) Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6:511-532
17. Turkiewicz M, Pazgier M, Kalinowska H, Bielecki S. (2003) A cold-adapted extracellular serine protease of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. *Extremophiles* 7: 435-442. doi: 10.1007/s00792-003-0340-9
18. Ray MK, Devi KU, Kumar GS, Shivaji S. (1992) Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. *Appl. Environ. Microbiol* 58: 1918-1923
19. Hamamoto T, Kaneda M, Horikoshi K, Kudo T. (1994) Characterization of a protease from a psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3878-3880
20. Margesin R, Schinner F. (1991) Characterization of a metalloprotease from psychrophilic *Xanthomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters* 79: 257-261
21. Irwin JA, Alfredsson GA, Lanzetti AJ, Gudmundsson HM, Engel PC. (2001) Purification and characterization of a serine protease from the marine psychrophile strain PA-43. *FEMS Microbiology Letters* 201: 285-290
22. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UCh. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19:627-662
23. Cheng YY, Qian YK, Li ZF, Wu ZH, Liu H, Li YZ. (2011) A novel cold-adapted lipase from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2: gene cloning, expression and enzymatic characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 12:6765-6780. doi: 10.3390/ijms12106765. Epub 2011 Oct 13
24. Yadav KN, Adsul MG, Bastawde KB, Jadhav DD, Thulasiram HV, Gokhale DV. (2011) Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresource Technology* 102:10663-10670. doi: 10.1016/j.biortech.2011.09.013. Epub 2011 Sep 10
25. Zhang N, Suen WC, Windsor W, Xiao L, Madison V, Zaks A. (2003) Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Engineering* 16:599-605

## **C.2. MIKROORGANIZMY ALKALOFILNE JAKO WYDAJNE ŹRÓDŁO 2,3-BUTANODIOLU (2,3-BD) – ZWIĄZKU O WYSOKIEJ WARTOŚCI DODANEJ**

Kolekcja mikroorganizmów Instytutu Biochemii Technicznej, w tym także kolekcja drobnoustrojów ekstremofilnych, otwiera nowe możliwości poszukiwań interesujących z technologicznego punktu widzenia metabolitów, innych niż katalizatory biologiczne. Jest to szczególnie ważne w kontekście związków otrzymywanych niemal wyłącznie na drodze syntezy chemicznej, opartej o ulegające stopniowemu wyczerpaniu surowce kopalne. Pozyskanie analogicznych metabolitów z żywych mikroorganizmów daje możliwość rozwoju nowych, przyjaznych dla środowiska biotechnologii. Co więcej, wykorzystywanie w tym celu surowców odnawialnych, w tym surowców traktowanych wcześniej jako odpady, pozwala myśleć o konkurencyjności danego procesu względem tradycyjnych technologii także pod względem ekonomicznym. Przykładem związku, dla którego obecnie poszukuje się technologii opartych o wydajnych mikrobiologicznych producentów, jest 2,3-butanodiol (2,3-BD). Alkohol ten ma szeroki wachlarz zastosowań, jest bowiem wykorzystywany do produkcji syntetycznej gumy, jako plastyfikator, środek nawilżający, zmiękczący, odmrażający oraz jako dodatek do paliw. Ponadto, z 2,3-BD otrzymuje się keton etylowo-metylowy (MEK), wykorzystywany w przemyśle jako rozpuszczalnik i dodatek do paliw, acetoinę używaną jako substancja zapachowa, diacetyl o właściwościach bakteriostatycznych, który jest stosowany jako dodatek do produktów spożywczych, nadający żywności maślany smak oraz diester stosowany w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym [1].

Moje zainteresowanie tym związkiem wynikało zatem z dużych możliwości jego aplikacji. Za podjęciem badań mających na celu opracowanie wydajnej technologii mikrobiologicznej produkcji 2,3-BD przemawiała bogata kolekcja mikroorganizmów o potencjalnych uzdolnieniach w tym kierunku oraz dane literaturowe potwierdzające coroczny wzrost produkcji tego alkoholu na drodze chemicznej na poziomie 4-7% [2]. Dodatkowym argumentem była propozycja współpracy naukowej ze strony naukowców z Johann Heinrich von Thunen-Institute, Institute of Agricultural Technology and Biosystems Engineering (vTIBS, Braunschweig, Niemcy), którzy tworzyli konsorcjum składające się z partnerów naukowych i przemysłowych, pochodzących z różnych krajów Europy (w tym z Polski, Hiszpanii, Belgii, Niemiec i Francji) zainteresowanych opracowaniem wydajnej metody produkcji 2,3-butanodiolu z biomasy. Konsorcjum koordynowane przez Ulfa Pruesse z vTIBS złożyło projekt badawczy w ramach konkursu ERA-IB, który został pozytywnie oceniony przez recenzentów. Dzięki temu w 2009 r. uzyskaliśmy zgodę NCBiR na finansowanie badań w ramach projektu pt. „Produkcja i



wykorzystanie 2,3-butanodiolu z biomasy” o akronimie PUBB (nr ERA-NET-IB/02/2009). Chciałabym podkreślić w tym miejscu swój duży wkład w przygotowanie wniosku grantowego, zarówno w wersji angielskiej (dla ERA-IB), jak i polskiej (NCBiR). Kierownikiem projektu ze strony Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej została prof. Marianna Turkiewicz, ale na Jej prośbę przejęłam część obowiązków kierownika projektu i byłam jednocześnie jego głównym wykonawcą. Do moich obowiązków oprócz realizacji zadań badawczych należały: nadzór merytoryczny nad prowadzonymi badaniami, wyjazdy naukowe na spotkania Konsorcjum w celu ciągłego śledzenia postępów badawczych oraz przygotowywanie raportów rocznych i raportu końcowego z realizacji projektu badawczego.

Celem projektu polskiego było poszukiwanie wydajnych niepatogennych producentów 2,3-butanodiolu w hodowlach na podłożach zawierających jako źródło węgla produkty odpadowe przemysłu rolno-spożywczego, udoskonalenie procesu bakteryjnej fermentacji poprzez manipulacje genetyczne oraz opracowanie optymalnych warunków jego biosyntezy w skali wielkolaboratoryjnej, z jednoczesnym naciskiem na ekonomikę procesu. Wyniki badań otrzymane w ramach projektu zostały opublikowane w trzech artykułach oryginalnych pt. „Application of enzymatic apple pomace hydrolysate to production of 2,3-butanediol by alkaliphilic *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059” [*J Ind Microbiol Biotechnol* 42(12):1609-21, (2015); H-7]; „Effects of genetic modifications and fermentation conditions on 2,3-butanediol production by alkaliphilic *Bacillus subtilis*” [*Appl Microbiol Biotechnol* 100(6):2663-76, (2016); H-8] i „Application of byproducts from food processing for production of 2,3-butanediol using *Bacillus amyloliquefaciens* TUL 308” [*Prep Biochem and Biotechnol* 46(6):610-9, (2016); H-9] oraz jednym patencie pt. „Sposób wytwarzania 2,3-butanodiolu” (Patent PL 227253 B1). Warto podkreślić, że w dwóch pierwszych cytowanych artykułach i patencie jestem pierwszym autorem. W 2016 r. otrzymałam zaproszenie od prof. Ian’a Maddox (Review-commissioning Editor, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*) do napisania artykułu przeglądowego z tej tematyki. Uznałam, że zdobyta w trakcie wykonywania grantu wiedza oraz doświadczenie badawcze pomogą mi sprostać tej prośbie, zdecydowałam się zatem napisać artykuł przeglądowy o mikrobiologicznej produkcji 2,3-butanodiolu pt. „Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field” [*World J Microbiol Biotechnol* 32:200, (2016); H-10], którego jestem jedynym autorem. Wykazałam w nim, że zrozumienie procesów metabolicznych, prowadzących do biosyntezy 2,3-BD, możliwość konstrukcji ulepszonych producentów tego alkoholu wytwarzających ten związek z wyższą wydajnością niż jego naturalni producenci oraz rosnąca wiedza na temat optymalizacji procesów biosyntezy i oczyszczania związków sprawiają, że opłacalna, przemysłowa produkcja 2,3-butanodiolu na drodze fermentacji może wkrótce zastąpić w znaczącym stopniu produkcję opartą o technologię chemiczną. Dużo uwagi

poświęciłam genetycznemu udoskonalaniu producentów 2,3-BD w oparciu o technologię rekombinacji DNA, która zmierza głównie w kierunku uzyskania nadekspresji genu/genów zaangażowanych w biosyntezę 2,3-BD w komórkach wybranego gospodarza i/lub wyciszenia genów szlaków konkurencyjnych, po to, żeby zahamować biosyntezę niepożądanych produktów fermentacji, tj. etanolu, acetoiny, kwasu mlekowego, czy octanu. Opisałam również mniej popularny sposób udoskonalania biosyntezy 2,3-BD, który opiera się na wklonowaniu do komórek gospodarza genu *vgb*, kodującego bakteryjną hemoglobinę (VHb) *Vitreoscilla stercoraria*.

Podkreśliłam, iż obecnie do najbardziej wydajnych producentów 2,3-BD należą szczepy *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* i *Serratia marcescens* [1]. Pierwszy z nich wykorzystując glukozę w hodowli *fed-batch* syntetyzuje ok. 150 g/l 2,3-BD. Pozostałe dwa, po udoskonaleniach genetycznych, akumulują podobne ilości tego związku, tj. 142.5 g/l i 152 g/l, wykorzystując jako źródło węgla w hodowlach *fed-batch*, odpowiednio glukozę i melasę [3; 4]. Ponadto szczepy te wyróżniają się prostotą hodowli oraz stosunkowo szybkim wzrostem w ubogim podłożu. Pomimo tych zalet szczepy *Klebsiella* nie mogą być stosowane w skali przemysłowej ze względu na ich patogenny charakter. Atrakcyjną alternatywą dla szczepów z rodzaju *Klebsiella* są bakterie z rodzaju *Bacillus*. Spośród bakterii tego rodzaju najbardziej obiecującym producentem 2,3-BD jest *Bacillus licheniformis* DSM 8785, który podczas hodowli *fed-batch* na podłożu z glukozą wyprodukował ok. 145 g/L alkoholu [5]. Podobne poziomy produkcji, tj. 133 g/l zostały uzyskane dla mutantu *Bacillus amyloliquefaciens* B10-127 [6].

W publikacji H-10 skupiłam się także na tym, że ze względów ekonomicznych i ekologicznych przemysłowa produkcja 2,3-butanodiolu powinna być oparta o łatwo dostępne i stosunkowo tanie surowce odnawialne (np. niecelulozowe lub lignocelulozowe), najlepiej będące produktami ubocznymi po produkcji żywności lub biopaliw. Na wydajność biosyntezy 2,3-BD, oprócz źródła węgla, które stanowi znaczną część kosztów całego procesu, istotny wpływ mają także inne parametry, takie jak: natlenienie, pH, temperatura, ilość zastosowanego inokulum, aktywność wody. Bardzo istotnym czynnikiem jest też rodzaj hodowli (okresowa, okresowa z zasilaniem, ciągła) oraz konfiguracja stosowanego w tym celu bioreaktora [1]. Najczęściej jednak aby zwiększyć wydajność biosyntezy 2,3-BD z surowców odnawialnych, prowadzi się hodowlę okresową z zasilaniem, polegającą na dodawaniu do podłoża dodatkowej porcji substratu węglowego w momencie, kiedy jego niedobór zaczyna limitować wzrost komórek.

### **C.2.1 Przetwarzanie i charakterystyka odpadowych surowców roślinnych pod kątem ich przydatności do produkcji 2,3-BD**

Jako substraty dla mikrobiologicznej produkcji diolu stosowano w ramach

projektu dostępne i tanie surowce odpadowe, takie jak: wysłodki buraczane (świeże, mrożone i wysuszone), krajanekę buraka cukrowego, wycierkę ziemniaczaną, suszone wytloki jabłkowe oraz wytloki aronii, rzepaku, sojowe, słonecznika i wiesiołka. Materiały te zostały scharakteryzowane pod kątem zawartości suchej masy, cukrów prostych i złożonych oraz innych związków rozpuszczalnych w wodzie, co zamieściłam w publikacjach H-7, H-8 i H-9. Przed enzymatyczną hydrolizą surowce poddawano obróbce wstępnej - rehydratacji (20 h, 20°C) i obróbce termicznej w autoklawie (20 min, 121°C). Do ich hydrolizy wykorzystano 10 preparatów enzymatycznych: wieloenzymowy preparat z *A. niger* IBT-90, Filtrase Premium (DSM) oraz preparaty produkcji Novozymes (OptimashTMVR, OptimashTMBG, Cellustar XL, Cellulosoft®CR, CellulosoftTML, CellulosoftTMAPL, Cell Conc L i Denimax 991). Wszystkie zawierały celulazy i ksylanazy oraz enzymy pektynolityczne i amylolityczne. W publikacjach H-7, H-8 i H-9 udowodniłam, iż najefektywniej degradował badane surowce wieloenzymowy preparat wytworzony przy użyciu szczepu *Aspergillus niger* IBT-90 w oparciu o technologię opracowaną w Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej i w zakładzie Pektowin w Jaśle. Preparat ten zawierał enzymy rozkładające celulozę (36,2 U/ml), ksylan (73,2 U/ml), pektynę (123,2 U/ml), skrobię (642,4 U/ml) i sacharozę (74,5 U/ml) (aktywność oznaczana w pH 5,0 i w 50°C, tj. w warunkach optymalnych). Hydrolizaty poddawano następnie liofilizacji, co ułatwiało przygotowanie odpowiedniej ilości jednolitego materiału do optymalizacji warunków biosyntezy 2,3-butanodiolu. Najlepsze do produkcji tego alkoholu przez wyselekcjonowane mikroorganizmy okazały się hydrolizaty suszonych wytlóków jabłkowych oraz wysłodków buraka cukrowego. Wyniki dotyczące biokonwersji surowców roślinnych i charakterystyki ich hydrolizatów zostały zamieszczone w publikacjach H-7, H-8 i H-9.

Znaleziono też potencjalną metodę utylizacji nierozpuszczalnej pozostałości po enzymatycznej hydrolizie suszonych wysłodków buraczanych i wytlóków jabłkowych, którą można wykorzystać, podobnie jak same wysłodki i wytloki, jako składnik do hodowli niektórych grzybów, np. *Phanerochaete chrysosporium*, w celu biosyntezy mieszaniny enzymów celulolitycznych, amylolitycznych oraz ksylanaz i pektynaz (dane nieopublikowane).

### **C.2.2 Selekcja mikroorganizmów produkujących 2,3-butanodiol**

W celu poszukiwania wydajnych producentów 2,3-BD zastosowałam testy płytkowe Voges-Proskauera i O'Meary, które pozwoliły wskazać producentów acetoiny – bezpośredniego prekursora 2,3-butanodiolu. Badania te prowadziłam z udziałem bakterii ekstremofilnych, głównie zimnolubnych i alkalofilnych (te ostatnie przede wszystkim z rodzaju *Bacillus*), należących do kolekcji mikroorganizmów Instytutu Biochemii

Technicznej oraz kolekcji komercyjnych, np. *The National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria* (Wielka Brytania). Testom tym poddałam także bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Bifidobacterium* pochodzące z Kolekcji Czystych Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych ŁOCK. Aby potwierdzić ich przydatność w produkcji 2,3-butanodiolu szczepy te hodowano w podłożach zawierających roztwory czystych cukrów, np. glukozę, fruktozę, sacharozę lub produkty odpadowe przemysłu rolno-spożywczego w postaci pierwotnej (np. melasa) oraz zhydrolizowanej (np. hydrolizat suszonych wyśłodków buraka cukrowego, hydrolizat wyłoków jabłkowych). Do wstępnego oszacowania poziomu biosyntezy docelowego alkoholu wykorzystałam metodę chromatografii cienkowarstwowej, dla której dobrałam optymalne warunki prowadzenia rozdziału. Ostatecznie jako układ rozwijający wytypowałam mieszaninę zawierającą n-heptan : octan etylu : metanol w stosunku objętościowym 1:5:1, a wywoływanie chromatogramu prowadziłam z użyciem roztworu Seebacha (dane nieopublikowane). Warto podkreślić, iż opracowana zasada rozdziału substancji w chromatografii cienkowarstwowej pozwoliła na łatwą i szybką detekcję diolu w próbie i dlatego była wykorzystywana przez innych partnerów PUBB do jakościowego, wstępnego oszacowania poziomu produkcji 2,3-BD. Do określenia dokładnych poziomów tego alkoholu w cieczach pochodzących wykonawcy projektu, w tym i mój zespół stosowali techniki HPLC.

Najbardziej wydajnymi producentami 2,3-BD okazały się ekstremofilne szczepy wykazujące wzrost w wysokim pH (8-9), czyli alkalofile, należące głównie do rodzaju *Bacillus*, tj. *Bacillus subtilis* ŁOCK 1086 oraz *Bacillus amyloliquefaciens* TUL 308, należące do własnej kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej PŁ oraz *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059, zakupiony z *The National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria* (Wielka Brytania). Wykazałam, że spośród badanych bakterii, najlepszym producentem 2,3-BD z hydrolizatów biomasy roślinnej, a konkretnie z hydrolizatu wyłoków jabłkowych okazał się ten ostatni szczep. Wyniki dla tego szczepu związane z opracowaniem strategii wydajnej produkcji 2,3-BD opisałam w publikacji H-7. Wykazałam w niej, że znacznie większe stężenia tego alkoholu uzyskuje się w hodowli bakterii z opcją dokarmiania niż w hodowli okresowej. Udowodniłam także, że zbyt proste podłoże hodowlane zawierające czyste roztwory cukrów, np. glukozę lub fruktozę nie sprzyja biosyntezie tego metabolitu. Wyraźny wzrost zaobserwowano bowiem kiedy w podłożu jako źródło węgla zastosowano hydrolizat wyłoków jabłkowych, który oprócz substratów cukrowych, tj. glukozy, fruktozy, kwasu galakturonowego, ksylozy, arabinozy, galaktozy, mannozy i ramnozy zawierał również mikroelementy, np. Na, Mg, K, Ca, Fe, Mn i Zn. Różnice w ilości docelowego alkoholu obserwowałam także w zależności od stężenia hydrolizatu, które było wyznaczane w przeliczeniu na stężenie zawartej w nim glukozy. I tak maksymalną produkcję 2,3-BD odnotowałam w 36h hodowli bakterii

*Bacillus licheniformis* NCIMB 8059, kiedy w podłożu znajdowało się 43 g/L produktu odpadowego i wynosiło ono 23,76 g/l, wydajność procesu równa była wówczas 0,36 g/g<sub>c.red</sub>, a produktywność 0,66 g/l x h. Zwiększenie skali procesu i prowadzenie hodowli w 0,75-litrowych fermentorach Sixfors (INFORS, Szwajcaria) w niewielkim stopniu doprowadziło do zwiększenia stężenia alkoholu (27,55 g/l). Istotne natomiast było zwiększenie o ok. 30% produktywności bioprocessu ze względu na bardziej sprzyjające warunki wzrostu bakterii w fermentorze.

### C.2.3 Strategie udoskonalania mikrobiologicznej produkcji 2,3-butanodiolu

Kamieniem milowym w opracowaniu wydajnej technologii produkcji 2,3-BD przez *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 było zastosowanie hodowli okresowej z dokarmianiem, której zaletą jest zapobieganie zbyt dużemu stężeniu źródła węgla w podłożu, a tym samym utrzymanie poziomu glukozy na poziomie najbardziej optymalnym dla biosyntezy docelowego alkoholu. Wykazałam także, że bardziej korzystne ze względu na wyeliminowanie nagromadzenia się inhibitorów fermentacji jest dokarmianie hodowli bakterii czystą glukozą. W badaniach zastosowałam dwa warianty pożywki. Pierwsza wersja charakteryzowała się obecnością hydrolizatu suszonych wyłoków jabłkowych w ilości odpowiadającej 43 g/l glukozy, natomiast druga wykorzystaniem mieszaniny hydrolizatu suszonych wyłoków jabłkowych w ilości odpowiadającej 23 g/l glukozy oraz czystej glukozy w stężeniu 20 g/l. Dla pierwszego wariantu podłoża stosowałam 2 schematy zasileń hodowli glukozą: 3-krotny i 4-krotny, każdorazowo dostarczając taką ilość cukru, aby odpowiadała ona 50 g na litr medium hodowlanego. Zastosowanie strategii 3-krotnego zasilania hodowli przyczyniło się do ponad 4-krotnego wzrostu stężenia tworzonego 2,3-BD (do około 103 g/l) w stosunku do hodowli okresowej, jednocześnie prowadząc do wydłużenia czasu fermentacji do 138 h. Przy 4-krotnym zasileniu pożywki glukozą, bakterie były w stanie wytworzyć ok. 112 g/l alkoholu w 162 h procesu. W przypadku hodowli w podłożu z mieszaniną hydrolizatu i czystej glukozy także zastosowano schemat 3- i 4- krotnego zasilania czystą glukozą, tak, aby ilość dodanego cukru odpowiadała stężeniu 50 g/l pożywki. Wykazałam jednak, iż w tak skomponowanej pożywce szczep *B. licheniformis* NCIMB 8059 wytwarzał mniej docelowego alkoholu niż w podłożu zawierającym sam hydrolizat, pomimo porównywalnej początkowej ilości glukozy. Trzykrotne zasilenie hodowli glukozą skutkowało nagromadzeniem 88 g/l alkoholu w 84 h hodowli, natomiast zwiększenie liczby dokarmień do czterech zwiększyło poziom docelowego metabolitu do 97 g/l w 94 h procesu. W porównaniu z hodowlą okresową, w której poziom produkcji 2,3-BD utrzymywał się na poziomie ok. 27 g/l, zastosowanie hodowli zasilanych pozwoliło na ponad 3-krotny wzrost ilości nagromadzonego alkoholu.

Dodatkowo, ze względu na fakt, że biosynteza docelowego alkoholu preferowana jest w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, zaproponowałam, aby proces mikrobiologicznej produkcji alkoholu w hodowlach *fed-batch* był prowadzony z zastosowaniem strategii zmiennego napowietrzania hodowli. Miała ona na celu w początkowej fazie procesu zapewnić optymalne warunki natlenienia niezbędne do wzrostu szczepu *B. licheniformis* a następnie nakierować jego metabolizm na intensyfikację przemian zachodzących w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, w tym głównie biosyntezę 2,3-butanodiolu. I tak w trakcie fazy intensywnego wzrostu mikroorganizmu szybkość mieszania pożywki wynosiła 130 rpm, natomiast podczas fazy biosyntezy diolu zastosowano warunki ograniczonego dostępu tlenu, poprzez prowadzenie hodowli w sposób stacjonarny lub obniżając szybkość mieszania do 60 rpm. W obu przypadkach proces zasilenia podłoża zawierającego hydrolizat wyłoków jabłkowych prowadzony był w pierwszej fazie procesu. Polegało ono na 3-krotnym dokarmieniu hodowli taką ilością glukozy, aby odpowiadała stężeniu 50 g dostarczonego cukru na litr medium hodowlanego. W hodowlach prowadzonych od 72 h w warunkach mikroareacji mikroorganizmy wyprodukowały ok. 106 g/l 2,3-BD, w 162 h procesu. W przypadku zastosowania w drugim etapie hodowli stacjonarnej udało się osiągnąć jeszcze wyższy poziom produkcji alkoholu - 113 g/l, w 163 h procesu. Również w przypadku podłoża z mieszaniną hydrolizatu i cukru prostego przeprowadzono dwuetapowy proces biosyntezy. W trakcie pierwszych 72 h hodowla prowadzona była przy 130 rpm i została 4-krotnie zasilona glukozą. Drugi etap prowadzony był w temperaturze 37°C w warunkach stacjonarnych. Maksymalne stężenie 2,3-butanodiolu, jakie uzyskałam wykorzystując ten rodzaj hodowli, wyniosło 110 g/l i osiągnęłam je w 166 h procesu. Otrzymane wyniki potwierdzają, iż zastosowana strategia zmiennych warunków natlenienia podłoża hodowlanego sprzyja biosyntezie 2,3-butanodiolu, ale niestety wydłuża czas osiągnięcia jego maksymalnego poziomu, co obniża produktywność procesu.

Interesujące i rokujące, na tle danych literaturowych, wyniki otrzymane z hodowli z dokarmianiem pozwoliły mi rozważyć możliwość zwiększenia skali procesu. W tym celu przeprowadziłam wybrane warianty hodowli *fed-batch* w fermentorze Sixfors o poj. 0.75 L i fermentorze Techfors o poj. 30 L. Jako źródło węgla w pożywce wykorzystałam hydrolizat suszonych wyłoków jabłkowych w ilości odpowiadającej 43 g/l glukozy lub jego mieszaninę z czystą glukozą w ilości odpowiadającej 23 g/l i 20 g/l. W trakcie trwania hodowli 4-krotnie, tj. w 16, 24, 40 i 48 h procesu do medium hodowlanego dodawałam glukozę, każdorazowo w dawce zapewniającej stężenie 50 g cukru na litr podłoża. W hodowlach w fermentorze o poj. 0.75 L nastąpił prawie 3-krotny wzrost ilości wyprodukowanego 2,3-BD w obu wariantach pożywek w stosunku do odpowiedniej hodowli okresowej prowadzonej w tej skali. Natomiast porównując poziom produkcji

alkoholu w hodowlach *fed-batch* zauważyłam, iż ilość otrzymanego docelowego produktu w fermentorach obniżyła się dla pożywki zawierającej sam hydrolizat o 30%, a dla pożywki zawierającej mieszaninę hydrolizatu i czystej glukozy – o 10% (0.75 L fermentor) i o 25% dla fermentora 30 L, choć na tym etapie wzrosła produktywność procesu do 0.78 g/l × h w stosunku do fermentora o mniejszej objętości.

Dodatkowym osiągnięciem w opracowaniu wydajnej strategii biosyntezy 2,3-butanodiolu było wykorzystanie do tego celu unieruchomionych komórek bakterii *B. licheniformis* NCIMB 8059. Co istotne, wyniki tych prac zostały objęte patentem H-11 i obecnie przygotowana jest publikacja dotycząca zastosowania takiego podejścia w badaniach. Preparaty immobilizowanych komórek stanowiły materiał szczepienny, który był przenoszony z jednego podłoża produkcyjnego do kolejnego, co skutkowało znacznym skróceniem czasu produkcji 2,3-butanodiolu dzięki wyeliminowaniu powtarzającego się w kolejnych fermentacjach etapu przygotowania inokulum, a więc uaktywnienia szczepu na podłożu agarowym i prowadzenia prehodowli przed właściwą hodowlą produkcyjną. Immobilizację komórek bakterii prowadzono z wykorzystaniem 2 procedur. Pierwsza obejmowała przygotowanie zawiesiny komórek w roztworze alkoholu poliwinylowego i alginianu sodu i wkroplenie tak przygotowanej mieszaniny do roztworu wodnego  $\text{CaCl}_2$ . Powstały żel wprowadzano następnie do roztworu aldehydu glutarowego, po czym przenoszono go do roztworu glicyny i inkubowano przez 24 godziny. Tak przygotowany preparat unieruchomionych bakterii zawieszano w soli fizjologicznej z dodatkiem  $\text{CaCl}_2$  i przechowywano w tej postaci aż do jego wykorzystania. Drugi sposób obejmował wkroplenie mieszaniny komórek z roztworem PVA i alginianem sodu do oleju roślinnego schłodzonego do temperatury 0°C a następnie kilkukrotne (3-5-krotne) zamrożenie i rozmrożenie całości roztworu. Oddzielenie unieruchomionych komórek bakterii od oleju odbywało się poprzez przemycie ich roztworem detergentu i solą fizjologiczną z dodatkiem  $\text{CaCl}_2$ . Tak przygotowany preparat unieruchomionych bakterii zawieszano w soli fizjologicznej z dodatkiem  $\text{CaCl}_2$  i w takiej postaci przechowywano aż do wykorzystania. W celu oceny stabilności immobilizowanych komórek *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059 oba preparaty wykorzystywano równolegle w siedmiu kolejnych hodowlach okresowych prowadzonych w podłożach zawierających jako źródło węgla hydrolizat wytlóków jabłkowych. Po rozpoczęciu fermentacji z użyciem nośników z pułapkowanymi komórkami bakterii następowało namnażanie ich w nośniku, a następnie częściowe uwalnianie komórek i namnażanie w pożywce. **Co istotne, uzyskane wyniki omówione w patencie H-11, jednoznacznie wskazują, że preparaty pozostają stabilne i mogą z powodzeniem zostać wykorzystane w kolejnych fermentacjach jako inokulum, bez strat uzdolnień szczepu do produkcji 2,3-BD a poziomy produkcji alkoholu osiągane zarówno w hodowlach okresowych, jak i dokarmianych są zbliżone, bez względu na rodzaj zastosowanych komórek, tj.**

**wolnych czy unieruchomionych.**

Obiecujące wyniki otrzymałam także dla szczepu ekstremofilnego z grupy alkalofili pochodzącego z własnej kolekcji, tj. *Bacillus subtilis* LOCK1086 i zamieściłam je w publikacji H-8. W tym przypadku, w celu zwiększenia biosyntezy 2,3-butanodiolu, oprócz hodowli z dokarmianiem, wykorzystałam różne strategie udoskonalania dzięki bakterii metodami inżynierii genetycznej. Pierwsza z nich polegała na heterologicznej ekspresji genu bakteryjnej hemoglobiny (*vhb*) w komórkach *Bacillus subtilis*. Pozytywny efekt działania tego białka w zmianach metabolizmu został już dobrze udokumentowany, jego obecność nie tylko poprawia żywotność mikroorganizmów, ale również wspomaga biosyntezę rekombinowanych białek oraz metabolitów pierwszo- i drugorzędowych [7; 8]. Jego ekspresja w komórkach *E. aerogenes* i *S. marcescens* wpłynęła pozytywnie na produkcję 2,3-BD [9; 10], choć dokładny mechanizm wciąż pozostaje nieznan. Istnieją jedynie hipotezy dotyczące tego zjawiska. Po pierwsze sugeruje się, że obecność VHb może indukować zmiany w stosunku kofaktorów NADH/NAD<sup>+</sup> oraz ATP/ADP *in vivo*, co prowadzi do lepszego natlenienia w komórce, a tym samym do przekierowania strumienia węgla z centralnych szlaków metabolicznych na poboczne, w tym np. na szlak butanodiolowy. Inni uważają, że obecność tego białka sprawia, że komórki pozostają dłużej aktywne metabolicznie i bardziej wydajne [1].

Ekspresję hemoglobiny z *V. stercoraria* LMG 7756 w szczepie *B. subtilis* potwierdziłam poprzez elektroforezę SDS-PAGE. W obrazie elektroforetycznym białek z ekstraktu bezkomórkowego rekombinantów obserwowałam obecność dodatkowego pasma białkowego o masie 16 kDa, którego nie było w próbach kontrolnych (ekstrakty z biomasy szczepów dzikich), choć należy zaznaczyć, że wraz z wydłużeniem czasu hodowli (powyżej 24h) ilość tego makropeptydu malała aż do jego całkowitego zniknięcia. W celu identyfikacji ekspresowanego białka, próżki o masie 16 kDa poddano analizie metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF (IBB PAN Warszawa). Na podstawie otrzymanych map peptydowych identyfikowanego białka dopasowałam je z największym prawdopodobieństwem, tj. ok 70% do sekwencji hemoglobin pochodzących z bakterii rodzaju *Vitreoscilla*, zdeponowanych w bazach danych. Niestety na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że ekspresja bakteryjnej hemoglobiny z *V. stercoraria* w komórkach *B. subtilis* TUL 322 bez względu na rodzaj źródła węgla i intensywność wstrząsania podłoża w kolbach nie wpłynęła na wzrost poziomu produkcji 2,3-butanodiolu. Preferowanymi substratami do produkcji tego alkoholu przez szczep rekombinanta okazały się glukoza i hydrolizat wytlóków jabłkowych, dla których uzyskałam stężenie diolu, odpowiednio, ok. 12 i 11 g/l i były to wartości zbliżone do ilości metabolitu wyprodukowanego przez szczep macierzysty. Brak poprawy wydajności procesu biosyntezy 2,3 butanodiolu dla szczepu rekombinanta można tłumaczyć faktem, że wzrost stężenia alkoholu w podłożu obserwowałam dopiero po 24 h hodowli, a więc



już pod nieobecność hemoglobiny w komórce. Jej brak w komórkach rekombinanta powyżej 32h hodowli jest prawdopodobnie wynikiem działania *in vivo* wysoce aktywnych enzymów proteolitycznych macierzystego gospodarza.

Inną zaproponowaną przeze mnie strategią zwiększenia biosyntezy 2,3-butanodiolu przez *B. subtilis* było uzyskanie nadekspresji genu kodującego dehydrogenazę 2,3-butanodiolową (*bdhA*). Enzym ten odgrywa kluczową rolę w ostatnim etapie szlaku butanodiolowego i jest odpowiedzialny za przekształcenie acetoiny w 2,3-butanodiol. Sekwencja genu *bdhA* została zdeponowana w bazie *GenBank* pod numerem JN387994, a wyniki analizy porównawczej uwzględniające tylko sekwencje całych genów potwierdziły, że był to gen kodujący docelowe białko, wykazujący od 99 do 98% homologii z genami *bdhA* z *B. subtilis*, 94% z *B. subtilis subsp. spizizenii*, 81% z *B. atrophaeus* i 80% z *B. amyloliquefaciens*. Samą ekspresję w komórkach gospodarza potwierdziłam za pomocą techniki Western Blotting, dzięki temu, że na etapie reakcji PCR zaplanowałam wydłużenie sekwencji rekombinowanego białka o domenę oligohistydynową (His<sub>6</sub>). Niestety, podobnie jak w poprzednich badaniach nie odnotowałam, aby rekombinowany szczep charakteryzował się większą zdolnością do produkcji 2,3-BD bez względu na zastosowany w podłożu substrat węglowy (czyste cukry bądź produkty odpadowe).

Przedstawione badania prowadzą do wniosku, że inżynierowanie szczepu *B. subtilis* zgodnie z przyjętą procedurą nie pozwala na uzyskanie mutantów o oczekiwanych założeniach fenotypowych. W publikacji H-8 podkreśliłam, iż prawdopodobnie dla osiągnięcia powyższego celu konieczne będzie zastosowanie w przyszłości technik inżynierii metabolicznej, która przy jednoczesnej ekspresji docelowego genu umożliwi inaktywację genu (-ów) szlaku konkurencyjnego.

Zwiększenie ilości nagromadzonego w podłożu alkoholu osiągnęłam natomiast poprzez zastosowanie hodowli typu *fed-batch*, w której przy wyjściowym źródle węgla – melasie (68,3 g/l w przeliczeniu na sacharozę) i 4-krotnym dokarmieniu hodowli glukozą (każdorazowo po 50 g/l) bakterie wyprodukowały w 114 h około 76g/l docelowego produktu. Produktywność procesu wynosiła wówczas 0,66 g/l x h.

Zastosowanie hodowli z dokarmianiem sprawdziło się także w przypadku szczepu *Bacillus amyloliquefaciens* TUL 308, co zostało opisane w publikacji H-9. W hodowlach okresowych uzyskiwano zaledwie 16,53 g/l 2,3-BD w podłożu z hydrolizatem wycieków jabłkowych, dodanym w ilości zapewniającej 45 g/l glukozy, 10,72 g/l – w podłożu z hydrolizatem suszonych wysłodków buraczanych (20 g/l glukozy) oraz 5 g/l – w podłożu z hydrolizatem wycierki ziemniaczanej (30 g/l glukozy). Najwięcej diolu (25,3 g/l) szczep wytwarzał w podłożu z melasą jako źródłem węgla (60 g/l sacharozy). Dopiero zastosowanie strategii hodowli *fed-batch* pozwoliło zwiększyć ilość wytwarzanego 2,3-BD. I tak, w podłożu z melasą w ilości odpowiadającej 60 g sacharozy, po 4-krotnym

zasileniu pożywki sacharozą lub glukozą, każdorazowo w dawce po 25 g/l, uzyskano odpowiednio 60 i 50 g/l diolu w 138 h hodowli.

**Podsumowując badania dotyczące mikrobiologicznej produkcji 2,3-butanodiolu przez alkalofilne szczepy z rodzaju *Bacillus* mogą stwierdzić, iż udało się opracować strategię wydajnej produkcji tego alkoholu.** Tak wysokie poziomy produkcji, jak opisane w naszych badaniach, udało się uzyskać w hodowlach *fed-batch* głównie dla szczepów rekombinowanych należących do rodzaju *Klebsiella* [11] i *Enterobacter* [12] oraz *Bacillus amyloliquefaciens* [6]. Zaletą aplikacyjności przemysłowej mutantów dwóch pierwszych szczepów uzyskanych na drodze insercji lub delecji wybranych genów w genomie gospodarza jest ich stabilność genetyczna, wadą niewątpliwie ich patogenny charakter. W przypadku cytowanej bakterii *Bacillus amyloliquefaciens* jej zaletą jest niepatogenność, wadą stosowanie antybiotyków do hodowli rekombinanta, w celu ograniczenia możliwości utraty plazmidu niosącego geny, ważne dla przyrostu 2,3-BD. Takie podejście nie tylko zwiększa całkowite koszty procesu, ale także wpływa negatywnie na środowisko naturalne. **W tym kontekście znaczenie naszych badań jest duże, potwierdzają to także dane zamieszczone w tabeli 2. Po pierwsze badane szczepy są niepatogenne i posiadają status GRAS (*generally regarded as safe*), a więc z technologicznego punktu widzenia są szczególnie interesujące, po drugie w formie niezmienionej genetycznie potrafią syntetyzować od 60 do 113 g/l 2,3-BD, w zależności od gatunku i po trzecie potrafią do tego wykorzystywać odpady przemysłu spożywczego. Wpływa to niewątpliwie na ekonomikę procesu, ale pokazuje także racjonalne podejście w zagospodarowywaniu produktów odpadowych.**

Tabela 2. Produkcja 2,3-butanodiolu z wykorzystaniem substratów naturalnych w hodowlach okresowych z dokarmianiem

Mikroorganizm	Źródło węgla	Rodzaj fermentacji	Stężenie 2,3-BD (g/l)	Czas fermentacji (h)	Literatura
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CICC10011	Zliofilizowane bulwy karczocha	Hodowla dokarmiana SSF*	84.00	40	[13]
<i>K. pneumoniae</i> CICC10011	Hydrolizat z łodyg i bulw karczocha	Hodowla dokarmiana SSF*	67.40	68	[14]
<i>K. pneumoniae</i> G31	Glicerol	Hodowla dokarmiana	70.00	150	[15]
<i>K. pneumoniae</i> SDM <sup>1</sup>	Hydrolizat z kukurydzy	Hodowla dokarmiana	150.00		[16]
<i>K. pneumoniae</i> SDM <sup>1</sup>	Melasa kukurydziana	Hodowla dokarmiana	78.90	61	[17]
<i>Klebsiella oxytoca</i> ACCC 10370	Kwaśny hydrolizat kukurydziany	Hodowla dokarmiana	35.70	60	[18]

<i>K. oxytoca</i> M3 <sup>2</sup>	Glicerol techniczny	Hodowla dokarmiana	131.50	100	[19]
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> SDM	Zliofilizowany maniok	Hodowla dokarmiana SSF*	93.90	47	[20]
<i>E. cloacae</i> CGMCC 605 <sup>1</sup>	Melasa z trzciny cukrowej	Hodowla dokarmiana	99.50	60	[21]
<i>E. cloacae</i> SDM <sup>2</sup>	Kukurydza zbożowa	Hodowla dokarmiana	119.4	51	[22]
<i>E. aerogenes</i> <sup>2</sup>	Melasa z trzciny cukrowej	Hodowla dokarmiana	98.69	36	[23]
<i>B. licheniformis</i> X-10	Hydrolizat kukurydzy	Hodowla dokarmiana	74.00	36	[24]
<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	Hydrolizat inuliny	Hodowla dokarmiana SSF*	103.00	30	[25]
<i>B. amyloliquefaciens</i> B10-127 <sup>2</sup>	Glicerol techniczny	Hodowla dokarmiana	102.30	88	[26]
<b><i>Bacillus licheniformis</i> NCIMB 8059</b>	<b>Hydrolizat z wytloków jabłkowych</b>	<b>Hodowla dokarmiana</b>	<b>113.00</b>	<b>163</b>	<b>[H-7]</b>
<b><i>Bacillus subtilis</i> ŁOCK 1086</b>	<b>Melasa buraczana</b>	<b>Hodowla dokarmiana</b>	<b>75.00</b>	<b>114</b>	<b>[H-8]</b>
<b><i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TUL 308</b>	<b>Melasa buraczana</b>	<b>Hodowla dokarmiana</b>	<b>60.00</b>	<b>138</b>	<b>[H-9]</b>

<sup>1</sup>Szczep inżynierowany na drodze ukierunkowanej ewolucji

<sup>2</sup>Szczep inżynierowany na drodze racjonalnej mutagenезy

\*SHF – rozdzielona hydroliza i fermentacja; SSF- jednoczesne scukrzanie i fermentacja

## LITERATURA

1. Ji XJ, Huang H, Ouyang PK. (2011) Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances* 29:351-364. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.007
2. Shrivastav A, Lee J, Kim HY, Kim YR. (2013) Recent insights in the removal of *Klebsiella* pathogenicity factors for the industrial production of 2,3-butanediol. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:885–896
3. Ji XJ, Huang H, Zhu JG, Ren LJ, Nie ZK, DuJ, Li S. (2010) Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1751-1758. doi:10.1007/s00253-009-2222-2
4. Zhang L, Sun J, Hao Y, Zhu J, Chu J, Wei D, Shen Y. (2010) Microbial production of 2,3-butanediol by a surfactant (serrawettin)-deficient mutant of *Serratia marcescens* H30. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37: 857-862. doi: 10.1007/s10295-010-0733-6. Epub 2010 May 14
5. Jurchescu IM, Hamann J, Zhou X, Ortmann T, Kuenz A, Prübe U, Lang S. (2013) Enhanced 2,3-butanediol production in fed-batch cultures of free and immobilized *Bacillus licheniformis* DSM 8785. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:6715-6723. doi:10.1007/s00253-013-4981-z

6. Yang T, Rao Z, Zhang X, Xu M, Xu Z, Yang ST. (2013) Improved production of 2,3-butanediol in *Bacillus amyloliquefaciens* by over-expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 2,3-butanediol dehydrogenase. *PLoS ONE* 8:e76149. doi:10.1371/journal.pone.0076149
7. Ruohonen L, Aristidou A, Frey AD, Penttilä M, Kallio PT. (2006) Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the metabolism of xylose in recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* under low oxygen conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 39:6-14. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.06.024
8. Zhang L, Li Y, Wang Z, Xia Y, Chen W, Tang K. (2007) Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla* hemoglobin application in metabolic engineering. *Biotechnology Advances* 25:123-136. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.001
9. Geckil H, Barak Z, Chipman DH, Erenler SO, Webster DA, Stark BC. (2004) Enhanced production of acetoin and butanediol in recombinant *Enterobacter aerogenes* carrying *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26:325-330. doi:10.1007/s00449-004-0373-1
10. Wei ML, Webster DA, Stark BC. (1998) Metabolic engineering of *Serratia marcescens* with the bacterial hemoglobin gene: alterations in fermentation pathways. *Biotechnology and Bioengineering* 59:640-646
11. Jantama K, Polyiam P, Khunnonkwao P, Chan S, Sangproo M, Khor K, Jantama SS, Kanchanatawee S. (2015) Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. *Metabolic Engineering* 30:16–26. doi: 10.1016/j.ymben.2015.04.004. Epub 2015 Apr 17
12. Jung MY, Ng CY, Song H, Lee J, Oh MK. (2012) Deletion of lactate dehydrogenase in *Enterobacter aerogenes* to enhance 2,3-butanediol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95:461-469. doi:10.1007/s00253-012-3883-9
13. Sun LH, Wang XD, Dai JY, Xiu ZL. (2009) Microbial production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:847-852. doi: 10.1007/s00253-008-1823-5. Epub 2009 Jan 3
14. Li D, Dai JY, Xiu ZL. (2010) A novel strategy for integrated utilization of Jerusalem artichoke stalk and tuber for production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioresource Technology* 101: 8342-8347. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.041. Epub 2010 Jun 29
15. Petrov K, Petrova P. (2009) High production of 2, 3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84:659–665. doi: 10.1007/s00253-009-2004-x. Epub 2009 Apr 25
16. Ma C, Wang AL, Qin J, Li L, Ai X, Jiang T, Tang H, Xu P. (2009) Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:49-57. doi: 10.1007/s00253-008-1732-7. Epub 2008 Oct 24
17. Wang A, Wang Y, Jiang T, Li L, Ma C, Xu P. (2010) Production of 2,3-butanediol from corn cob molasses a waste by-product in xylitol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:965-970. doi:10.1007/s00253-010-2557-8
18. Cheng KK, Qing L, Zhang JA, Li JP, Xu JM, Wang GH. (2010) Improved 2,3-butanediol production from corn cob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochemistry* 45, 613-616

19. Cho S, Kim T, Woo HM, Kim Y, Lee J, Um Y. (2015) High production of 2,3-butanediol from biodiesel – derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnology for Biofuels* 8:146. doi 10.1186/s13068-015-0336-6
20. Wang A, Xu Y, Ma C, Gao C, Li L, Wang Y, Tao F, Xu P. (2012) Efficient 2,3-butanediol production from cassava powder by a crop-biomass-utilizer, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* SDM. *PLoS ONE* 7:e40442. doi:10.1371/journal.pone.0040442
21. Dai JY, Zhao P, Cheng XL, Xiu ZL. (2015) Enhanced production of 2,3-butanediol from sugarcane molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175:3014-3024. doi: 10.1007/s12010-015-1481-x
22. Li L, Li K, Wang Y, Chen C, Xu Y, Zhang L, Han B, Gao C, Tao F, Ma C, Xu P. (2015) Metabolic engineering of *Enterobacter cloacae* for high-yield production of enantiopure (2R,3R)-2,3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. *Metabolic Engineering* 28:19-27. doi: 10.1016/j.ymben.2014.11.010. Epub 2014 Dec 8
23. Jung MY, Park BS, Lee J, Oh MK. (2013) Engineered *Enterobacter aerogenes* for efficient utilization of sugarcane molasses in 2,3-butanediol production. *Bioresource Technology* 139:21-27. doi: 10.1016/j.biortech.2013.04.003. Epub 2013 Apr 8
24. Li L, Li K, Wang K, Chen C, Gao C, Ma C, Xu P. (2014) Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. *Bioresource Technology* 170:256–261. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.101
25. Li L, Chen Ch, Li K, Wang Y, Gao C, Ma C, Xu P. (2014) Efficient simultaneous saccharification and fermentation of inulin to 2,3-butanediol by thermophilic *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. *Applied and Environmental Microbiology* 80:6458-6464. doi: 10.1128/AEM.01802-14
26. Yang T, Rao Z, Zhang X, Xu M, Xu Z, Yang ST. (2015) Enhanced 2,3-butanediol production from biodiesel-derived glycerol by engineering of cofactor regeneration and manipulating carbon flux in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial Cell Factories* 14:122. doi 10.1186/s12934-015-0317-2

### C.3 Charakterystyka osiągnięcia naukowego - podsumowanie

Obiektem prowadzonych przeze mnie badań były interesujące z technologicznego punktu widzenia biocząsteczki (w tym enzymy) pochodzące z ekstremofilnych mikroorganizmów, które jak wykazałam posiadają unikatowe właściwości biologiczne i stanowią zarazem doskonałe narzędzie badawcze oraz stanowią półprodukty wykorzystywane do otrzymywania związków o dużej wartości dodanej. Liczba tych biomolekuł rośnie z roku na rok, bowiem badania potencjału biotechnologicznego ekstremofili wciąż otwierają nowe możliwości ich wykorzystania. Niewątpliwie najszerzej opisywane są białka katalityczne, stanowiące doskonałe zamienniki enzymów konwencjonalnych, stosowanych obecnie w wielu gałęziach przemysłu. Nie należy jednak zapominać, że potencjał biotechnologiczny ekstremofli nie ogranicza się jedynie do ich enzymów, ale jest znacznie szerszy i związany także z

produkcją innych metabolitów, w tym np. nowych środków terapeutycznych, barwników, egzopolisacharydów, biokompatybilnych solutów, związków powierzchniowo czynnych, czy półproduktów wykorzystywanych do syntezy innych biotechnologicznie cennych związków. Liczba ośrodków zajmujących się ekstremofilami na świecie jest coraz większa, natomiast w Polsce wciąż pozostaje ograniczona. Między innymi dlatego prowadzone przeze mnie badania niosą istotny wkład w rozwój opartej na bioprocessach biotechnologii przemysłowej, czy biogospodarki, które dają istotne korzyści ekologiczne: nie powodują wzrostu efektu cieplarnianego, wykorzystując odnawialne surowce roślinne wspierają sektor rolniczy, wytwarzają produkty biodegradowalne, zmniejszają ilość odpadów chemicznych i zużycie toksycznych chemikaliów. Jednak największą korzyść z biotechnologii przemysłowej odnosi społeczeństwo, otrzymując dobre, czyste i tanie produkty.

Wyniki moich badań mogą być wykorzystane w interdyscyplinarnych zespołach badawczych zajmujących się zagadnieniami biotechnologicznymi, jak i tymi opartymi o syntezę chemiczną. Pokazują one bowiem możliwość rozwoju biokatalizy stosowanej, która prowadzi do rozszerzenia aplikacji bioprocessów w przemysłowej syntezie chemicznej, nawet tej opartej na przetwórstwie ropy i gazu.

#### **W toku realizacji rozprawy habilitacyjnej:**

**1. Wzbogaciłam unikatową w skali kraju kolekcję drobnoustrojów ekstremofilnych** należącą do Instytutu Biochemii Technicznej o nowe, zidentyfikowane taksonomicznie i scharakteryzowane morfologicznie, fizjologicznie i biochemicznie szczepy bakterii, drożdży i grzybów strzępkowych.

**2. Opracowałam metody selekcji wydajnych producentów adaptowanych do działania w niskich temperaturach  $\beta$ -galaktozydaz, lipaz i proteaz** oraz wskazałam efektywne procedury izolacji i oczyszczania tych białek prowadzące do pozyskania homogennych lub wysokooczyszczonych preparatów enzymatycznych

**3. Scharakteryzowałam kinetyczne właściwości białek enzymatycznych** odpowiedzialne za ich możliwości katalityczne w niskim zakresie temperatur, najczęściej 0-20°C

**4. Określiłam możliwości zastosowań wyselekcjonowanych psychrofilnych białek i sprawdziłam ich potencjał w konkretnych bioprocessach,** argumentując ich przewagę nad katalizatorami

konwencjonalnymi, tj. pochodzącymi z mezofilnych organizmów

**5. Opracowałam wydajną mikrobiologiczną produkcję cennego z technologicznego punktu widzenia metabolitu alkalofili – 2,3-butanodiolu,** jako konkurencyjną alternatywę dla tradycyjnej drogi syntezy tego związku ze źródeł ropopochodnych

**6. Zaprojektowałam proces wytwarzania 2,3-butanodiolu w oparciu o racjonalne zagospodarowanie odpadów przemysłu rolno-spożywczego i wykorzystanie surowców odnawialnych, głównie biomasy roślinnej.**

#### **D. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych)**

Pracę naukową rozpoczynałam w zespole prof. Marianny Turkiewicz, która jako jedna z pierwszych w Polsce rozwinęła badania nad ekstremofilami, a głównie nad drobnoustrojami zimnolubnymi pochodzącymi z rejonów polarnych. Istotnym elementem mojej pracy, oprócz poszukiwania cennych biokatalizatorów i metabolitów, było sprawdzenie ich potencjału aplikacyjnego z wykorzystaniem faktu, że te pierwsze wykazują identyczny, jak ich mezofilne homologi, mechanizm działania, różnią się natomiast optymalną temperaturą działania i zwiększoną aktywnością w niskim zakresie temperatur, najczęściej 0-20°C. W tym kontekście interesujące wydało mi się wyjaśnienie na poziomie molekularnym strukturalnych przyczyn ich działania w warunkach, które same w sobie są lub mogą być denaturujące dla innych białek. Idealnym rozwiązaniem mogło tu być zastosowanie rentgenowskiej analizy strukturalnej, tym bardziej, że w Instytucie Biochemii Technicznej pod kierunkiem prof. Grzegorza Bujacza pracuje doskonały zespół zajmujący się tego rodzaju badaniami. Okazało się to jednak w dużym stopniu ograniczone, gdyż do krystalizacji wymagane jest homogenne białko o 100% czystości i w ilości co najmniej sto razy większej niż dla potrzeb badań biochemicznych. Dlatego zastosowałam modelowanie molekularne (z wykorzystaniem programów Swiss-Model i Modeller) badanego enzymu wykorzystując znane struktury  $\beta$ -galaktozydaz, a porównanie z mezofilnym odpowiednikiem pozwoliło w sposób pośredni określić cechy strukturalne białek adaptowanych do niekonwencjonalnych warunków. Realizacja takiego podejścia stała się możliwa dzięki nawiązaniu współpracy z zespołem prof. dr hab. Janusza Bujnickiego, który jest kierownikiem Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białka w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. W trakcie wykonywania pracy doktorskiej, przy wykorzystaniu tej właśnie metody i odpowiednich programów bioinformatycznych stworzyłam teoretyczny model cząsteczki

psychrofilnej  $\beta$ -galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b, zbudowany w oparciu o homologiczny enzym –  $\beta$ -galaktozydazę 1JZ7 z *E. coli* o znanej strukturze przestrzennej, której stopień identyczności z „zimnym” białkiem wynosił 51%. Dzięki temu możliwa była porównawcza analiza trójwymiarowych struktur homologicznych enzymów *Pseudoalteromonas* sp. 22b i *E. coli* potwierdzająca, że chociaż podstawą adaptacji do niskich temperatur jest, podobnie jak u innych psychrofilnych enzymów, wysoka giętkość niektórych elementów cząsteczki, to jednak nie obserwuje się istotnych zmian w jej strukturze II-rzędowej, za to mają miejsce zmiany w pętlach łańcucha polipeptydowego, często dłuższych niż w mezofilnych odpowiednikach. Na podstawie stworzonego *in silico* modelu białka wykazałam, iż w zimnolubnej  $\beta$ -galaktozydazie została zachowana ogólna architektura monomeru, w której można wyróżnić pięć strukturalnych domen, w tym domenę katalityczną o typowej naddrugorzędowej strukturze  $(\alpha/\beta)_8$  beczułki, które są identyczne jak w enzymie mezofilnym z *E. coli*. W obu białkach zauważyłam obecność domeny immunoglobulinowej i potwierdziłam to w analizach immunochemicznych, m.in. w metodzie „kropkowej” na membranach NC i PVDF oraz w immunoblottingu, w których to obserwowałam zdolność antarktycznej  $\beta$ -galaktozydazy 22b do reakcji z przeciwciałami mono- (Gal-13 i Gal-40) i poliklonalnymi, specyficznymi względem  $\beta$ -galaktozydazy *E. coli*. Wyniki tych badań zaprezentowałam w 2005 r. na II Ogólnopolskiej Konferencji BioMillenium w Gdańsku i zajęłam wówczas I miejsce w konkursie o nagrodę im. Wacława Szybalskiego za najlepszą pracę Młodego Biotechnologa.

Podobne podejście zastosowałam dla poznania struktury przestrzennej lipazy Lip1 wyizolowanej z metagenomu gleby antarktycznej w trakcie realizacji projektu badawczego pt. „W poszukiwaniu nowych zimnolubnych enzymów lipolitycznych o dużym potencjale biotechnologicznym”, którego byłam głównym wykonawcą (nr 2 P04B 018 30). Model badanego enzymu został stworzony metodą hybrydową w oparciu o metodologię tzw. Potwora Frankensteinia (*Frankenstein's Monster approach*). Najlepszy szablon wybrany na podstawie wyników analizy zwoju został użyty do budowy serii wstępnych modeli badanego białka. Do modelowania zastosowano dwa powszechnie dostępne programy, tj. Swiss-Model i Modeller. Wykazano, iż struktura przestrzenna zmodelowanej lipazy Lip1 jest podobna do struktur lipaz bakteryjnych izolowanych z bakterii rodzaju *Serratia* i *Pseudomonas*. Główna różnica pomiędzy trzema analizowanymi enzymami polegała na występowaniu w antarktycznym enzymie zdegenerowanych domen typu  $\beta$ -roll w odniesieniu do obu białek szablonych. Potwierdzono natomiast charakterystyczną dla lipaz bakteryjnych, należących do enzymów serynowych, triadę przeniesienia ładunku Ser-His-Asp/Glu - zlokalizowaną w centrum aktywnym enzymu. Porównanie homologicznych enzymów, tj. lipazy Lip1, lipazy z *Serratia marcescens* i lipazy *Pseudomonas* sp. MIS38, nie wykazało istnienia znaczących różnic pomiędzy strukturami wieczek. Niestety analiza struktury antarktycznego enzymu Lip1 w



porównaniu do homologicznych bakteryjnych mezofilnych lipaz, zwłaszcza pod kątem adaptacji do zimna, na tym poziomie okazała się bardzo trudna, ponieważ te białka istotnie różnią się liczbą aminokwasów w cząsteczce, a lipaza pochodząca ze szczepu *Pseudomonas*, do której antarktyczny metagenomowy enzym wykazuje najwyższe podobieństwo na poziomie struktury pierwszorzędowej nie został jak dotąd wykryty i nie został wykryty.

Swoje doświadczenie w modelowaniu molekularnym biocząsteczek wykorzystałam także we współpracy z mgr inż. Agnieszką Kaufman – ówczesną doktorantką prof. Turkiewicz. Pani Kaufman zajmowała się identyfikacją i analizą białka CspA (białko szoku zimna, z ang. *cold-shock protein*) pochodzącego z antarktycznej psychrotrofowej bakterii należącej do kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej – *Psychrobacter* sp. B6, szczepu blisko spokrewnionego z gatunkami *Psychrobacter cryohalolentis* i *P. arcticus*. Wysoki stopień homologii oraz znaczna konserwatywność miejsc promotorowych genów białek szoku zimna u różnych gatunków świadczą, że rola Csp jest głównie związana z procesem adaptacji do niskich temperatur (tworzenie tolerancji na temperatury niższe od fizjologicznych), ale także jest prawdopodobnie konieczna do prawidłowego wzrostu i rozwoju komórek w warunkach normalnych, bezstresowych. Modelowanie (z wykorzystaniem programów Swiss-Model i Modeller) struktury białka CspA *Psychrobacter* sp. B6 przy wykorzystaniu struktury homologicznego białka PDB ID: 1MJC z *E. coli* wykazało, że zbudowane jest ono z pięciu antyrównoległych łańcuchów  $\beta$ , uformowanych w dwa arkusze  $\beta$  tworzące strukturę  $\beta$ -beczułki. W cząsteczkach tych małych białek, w tym modelowanego, nie stwierdzono obecności odcinków o strukturze  $\alpha$ -helikalnej. W obrębie jednej ze struktur arkusza  $\beta$ , utworzonego przez trzy łańcuchy  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$ , zlokalizowane są dwa, silnie konserwatywne regiony RNP1 (o sekwencji „KGFGFI” identycznej jak w białkach Csp mikroorganizmów mezofilnych) i RNP2 („VFAHY” – z dwoma zmienionymi aminokwasami w stosunku do większości białek Csp, gdzie m.in. dla CspA *E. coli* fragment ten ma sekwencję „VFVHF”) istotne dla aktywności biologicznej głównych białek szoku zimna - odpowiedzialne za wiązanie jednoniciowych kwasów nukleinowych. Potwierdzono także w modelu białka Csp *Psychrobacter* sp. B6 wyeksponowane na powierzchni, na której znajdują się motywy RNP1 i RNP2, reszty aminokwasów aromatycznych, które dodatkowo stabilizują wiązanie z kwasami nukleinowymi. Jest to szczególnie istotne w kontekście ogólnej funkcji białek szoku zimna, działających jako chaperony ssRNA/DNA, które w warunkach obniżonej temperatury mają tendencję do tworzenia wtórnych struktur drugorzędowych, utrudniających lub wręcz uniemożliwiających, prawidłowy przebieg, krytycznych dla funkcjonowania każdej żywej komórki, procesów transkrypcji i translacji.

#### **Publikacje opublikowane podczas wykonywania pracy doktorskiej:**

1. Turkiewicz M, Kur J, **Białkowska A**, Cieśliński H, Kalinowska H, Bielecki S.

(2003) Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b as a source of cold-adapted  $\beta$ -galactosidase. *Biomol Eng* 20: 317-324

MNiSW – 15\*, IF<sub>2003</sub> = 2.293, Cit – 27

2. Cieśliński H, Kur J, **Białkowska A**, Baran J, Turkiewicz M. (2005) Cloning, expression and purification of a recombinant cold-adapted  $\beta$ -galactosidase from Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b. *Protein Express Purif* 39:27-34

MNiSW – 20\*, IF<sub>2005</sub> = 1.553, Cit – 52

3. Tkaczuk KL, Bujnicki JM, **Białkowska A**, Bielecki S, Turkiewicz M, Cieśliński H, Kur J. (2005) Molecular modeling of a psychrophilic  $\beta$ -galactosidase. *Biocatal Biotransfor* 23: 201-209

MNiSW – 20\*, IF<sub>2005</sub> = 1.516, Cit – 5

#### Publikacje opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:

1. Cieśliński H, **Białkowska A**, Długołęcka A, Daroch M, Tkaczuk K, Kalinowska H, Kur J, Turkiewicz M. (2007) A cold-adapted esterase from psychrophilic *Pseudoalteromonas* sp. strain 643A, *Arch Microbiol* 188: 27-36

MNiSW – 20\*, IF<sub>2007</sub>= 1.838, Cit – 24

2. Długołęcka A, Cieśliński H, Turkiewicz M, **Białkowska A**, Kur J. (2008) Extracellular secretion of *Pseudoalteromonas* sp. cold-adapted esterase in *Escherichia coli* in the presence of *Pseudoalteromonas* sp. components of ABC transport system. *Protein Express Purif* 62:179-184

MNiSW –20\*, IF<sub>2008</sub>= 1.621, Cit –9

3. **Białkowska A**, Cieśliński H, Nowakowska K, Kur J, Turkiewicz M. (2009) A new  $\beta$ -galactosidase with a low temperature optimum isolated from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 20B – gene cloning, purification and characterization. *Arch Microbiol* 191:825-835. doi: 10.1007/s00203-009-0509-4. Epub 2009 Sep 22

MNiSW – 20\*, IF<sub>2009</sub>= 1.927, Cit – 21

4. Kaufman-Szymczyk A, Wojtasik A, Parniewski P, **Białkowska A**, Tkaczuk K, Turkiewicz M. (2009) Identification of the csp gene and molecular modeling of the CspA-like protein from Antarctic soil-dwelling psychrotrophic bacterium *Psychrobacter* sp. B6. *Acta Biochim Polon* 56: 63-69

MNiSW – 20\*, IF<sub>2009</sub> = 1.262, Cit – 3

5. Cieśliński H, **Białkowska A**, Tkaczuk K, Długołęcka A, Kur J, Turkiewicz M. (2009) Identification and molecular modeling of a novel lipase from an Antarctic soil metagenomic library. *Pol J Microbiol* 58:199-204

MNiSW – 15\*, IF<sub>2010</sub> = 0.66, Cit – 19

\*pkt MNiSW – punkty zgodne z wykazem opublikowanym przez MNiSW na rok danej publikacji

Badania nad ekstremofilami są w Instytucie Biochemii Technicznej wciąż intensywnie rozwijane. Obecnie w kierowanym przeze mnie zespole zajmującym się mikroorganizmami pochodzącymi z ekstremalnych środowisk trwają prace nad charakterystyką i aplikacją zimnolubnych enzymów należących głównie do klasy oksydoreduktaz i transferaz, które są bardzo interesującymi biokatalizatorami dla tzw. zielonej chemii i są to:

1. lakaza pochodzącą z drożdżopodobnych grzybów *Kabatiella bupleuri* IBT-G3;
2. aminotransferaza z bakterii *Psychrobacter* sp. B6;
3. oksydaza monoaminowa z grzybów strzępkowych *Geomyces* sp. P3

Pierwszy enzym jest obiektem badań mgr inż. Katarzyny Szulczewskiej w ramach jej rozprawy doktorskiej pt. „Fizjologiczna i molekularna charakterystyka zimnolubnych grzybów mikroskopowych z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej”, której jestem promotorem pomocniczym. Praca wykonywana jest pod kierunkiem prof. Marianny Turkiewicz. Lakaza ze szczepu *Kabatiella bupleuri* IBT-G3 jest unikatowym białkiem, nie tylko wykazuje maksymalną aktywność w temperaturze 30-40°C, ale także zachowuje ponad 65% aktywności podczas reakcji w temp. 10°C. Co więcej, charakteryzuje się bardzo dużą termolabilnością - już 30-minutowa inkubacja w temperaturze 40°C powoduje utratę 35% aktywności. Dzięki współpracy z dr inż.

Katarzyną Kubiak z Laboratorium Biotechnologicznego w Łódzkim Regionalnym Parku Naukowo-Technologicznym udało się nam zsekwencjonować genom badanego szczepu. Warto nadmienić, iż jest to drugi zsekwencjonowany genom antarktycznego mikroorganizmu zimnolubnego z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej. Pierwszym był genom drożdży *Cryptococcus saitoi*, a badania te były prowadzone dzięki pozyskaniu przeze mnie w 2014 r. funduszy na sekwencjonowanie genomu tego drobnoustroju w ramach konkursu „Granty dla naukowców” ogłoszonego przez Centrum Badań DNA (Poznań). Dzięki takiemu podejściu możliwa stała się identyfikacja genu kodującego lakazę i jego ekspresja w systemie eukariotycznym *PichiaPink* (Invitrogen). Rekombinowany enzym zostanie sprawdzony pod kątem zdolności do biosolubilizacji węgla brunatnego w celu otrzymania rozpuszczalnych w wodzie polarnych związków aromatycznych, które mogą być dalej przekształcane w produkty o dużej wartości dodanej dla przemysłu biotechnologicznego, farmaceutycznego i chemicznego.

Dwa kolejne enzymy, tj. aminotransferaza i oksydaza aminowa są szczególnie interesujące ze względu na ich regio- i stereoselektywny charakter działania. Aminotransferaza jest enzymem interesującym nie tylko ze względu na natywne adaptacje do działania w niskich temperaturach, ale również ze względu na wykazywaną specyficzność substratową. Jej preferowanymi substratami są aminokwasy aromatyczne, jednak wykazuje także wysoką aktywność w reakcji transaminacji z udziałem kwasu asparaginowego. Dzięki tej właściwości enzym jest atrakcyjnym materiałem do badań molekularnych podstaw determinujących szeroką specyficzność substratową. Enzym ten można wykorzystać w reakcjach transaminacji do otrzymywania różnorodnych, cennych związków chiralnych (np. nienaturalnych aminokwasów, aminocukrów, amin i hydroksyamin), będących kluczowymi blokami budulcowymi w syntezie m.in. farmaceutyków.

Oksydaza monoaminowa *Geomyces* sp. P3 wykazuje unikatowe właściwości katalityczne względem pochodnych pirolidynowych. Wykorzystywane są one jako bloki budulcowe do syntezy szerokiej grupy leków, w tym inhibitorów proteazy HCV. Proteazy wirusa HCV, a konkretnie białka NS3/4A pochodzące z genotypów 1-6 stały się obiektem badań bioinformatycznych, a wyniki zostały opublikowane w poniższym artykule.

#### **Publikacja opublikowana po uzyskaniu stopnia doktora**

1. Florczak T, Jodłowska IK, Szejda KI, Kaczmarek MB, Białkowska AM. (2016) Differences between hcv ns3/4a protease from genotypes 1-6: substrate specificity, sequential and structural differences of active site structure. Is it possible to design a universal hcv protease inhibitor? *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences and Biotechnology* (AJRPSB) 4:71-87

Obecnie, kierowany przeze mnie zespół, oprócz badań nad unikatowymi enzymami, zajmuje się także poszukiwaniem innych cennych metabolitów produkowanych przez ekstremofilne mikroorganizmy, w tym m.in. białek przeciwlodowych (z ang. *antifreeze protein* – AFP). Cząsteczki te zwiększają termiczną histerezę wody (tj. różnica między temperaturą rozmrażania i zamrażania) oraz hamują rekrytalizację lodu. Dane literaturowe wskazują, iż białka te w niewielkim stężeniu lepiej zatrzymują wzrost kryształów lodu niż konwencjonalne substancje chemiczne, takie jak glikol etylenowy, DMSO czy glicerol. Są zatem szczególnie ważne dla kriobiologii, ponieważ w przeciwieństwie do substancji chemicznych stosowanych w krioprotekcji mają znikomy wpływ na uszkodzenie materiału biologicznego. Największe nadzieje budzi zastosowanie AFP w transplantologii, po to, żeby przedłużyć żywotność komórek, tkankom, narządom, jak również uchronić je przed szkodliwym działaniem niskich temperatur. Tego rodzaju badania nad poszukiwaniem białek przeciwlodowych pod moją opieką naukową wykonuje Pani mgr inż. Edyta Kruś, która w tym roku zamierza otworzyć przewód doktorski. Badania te stały się możliwe dzięki temu, że kolekcja mikroorganizmów Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej obejmuje wiele szczepów pochodzących z obszarów, gdzie temperatura sezonowo bądź stale nie przekracza 5°C. Wśród nich znaleźliśmy wydajnego producenta białek przeciwlodowych i jest to szczep psychrofilnych drożdży z gatunku *Glaciozyma martini*. Potwierdziliśmy już, że drobnoustroje te produkują sekrecyjne, glikozylowane białko o masie ok. 27 kDa i aktywności termicznej histerezy. Obecnie trwają prace nad uzyskaniem wydajnej ekspresji genu kodującego to białko w systemie drożdżowym *Pichia pastoris*. W planach jest również sprawdzenie, jak dodatek AFP *G. martini* do podłoża wykorzystywanego do przechowywania danej linii komórkowej wpłynie na przeżywalność komórek.

Obecnie, kierowany przeze mnie zespół, oprócz badań nad unikatowymi enzymami, zajmuje się także poszukiwaniem innych cennych metabolitów produkowanych przez ekstremofilne mikroorganizmy, w tym m.in. białek przeciwlodowych (z ang. *antifreeze protein* – AFP). Cząsteczki te zwiększają termiczną histerezę wody (tj. różnica między temperaturą rozmrażania i zamrażania) oraz hamują rekrytalizację lodu. Dane literaturowe wskazują, iż białka te w niewielkim stężeniu lepiej zatrzymują wzrost kryształów lodu niż konwencjonalne substancje chemiczne, takie jak glikol etylenowy, DMSO czy glicerol. Są zatem szczególnie ważne dla kriobiologii, ponieważ w przeciwieństwie do substancji chemicznych stosowanych w krioprotekcji mają znikomy wpływ na uszkodzenie materiału biologicznego. Największe nadzieje budzi zastosowanie AFP w transplantologii, po to, żeby przedłużyć żywotność komórek, tkankom, narządom, jak również uchronić je przed szkodliwym działaniem niskich temperatur. Tego rodzaju badania nad poszukiwaniem białek przeciwlodowych pod moją opieką naukową wykonuje Pani mgr inż. Edyta Kruś, która w tym roku zamierza otworzyć przewód doktorski. Badania te stały się możliwe dzięki temu, że kolekcja mikroorganizmów Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej obejmuje wiele szczepów pochodzących z obszarów, gdzie temperatura sezonowo bądź stale nie przekracza 5°C. Wśród nich znaleźliśmy wydajnego producenta białek przeciwlodowych i jest to szczep psychrofilnych drożdży z gatunku *Glaciozyma martini*. Potwierdziliśmy już, że drobnoustroje te produkują sekrecyjne, glikozylowane białko o masie ok. 27 kDa i aktywności termicznej histerezy. Obecnie trwają prace nad uzyskaniem wydajnej ekspresji genu kodującego to białko w systemie drożdżowym *Pichia pastoris*. W planach jest również sprawdzenie, jak dodatek AFP *G. martini* do podłoża wykorzystywanego do przechowywania danej linii komórkowej wpłynie na przeżywalność komórek.

Aneta Białkowska