

Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Biotransformacji
na Wydziale Biotechnologii
Uniwersytetu Wrocławskiego
pod kierunkiem
dr hab. inż. Marcina Łukaszewicza

STRESZCZENIE

Produkowane obecnie na szeroką skalę surfaktanty otrzymywane są na drodze syntez chemicznych. Związki te są często toksyczne i niebiodegradowalne, dlatego mogą być niebezpieczne dla środowiska. Szybki rozwój biotechnologii, inżynierii genetycznej oraz wzrost świadomości ludzkiej, co do potrzeby i konieczności ochrony środowiska naturalnego, przyczyniają się do większego zainteresowania naturalnymi surfaktantami.

Biosurfaktanty są powierzchniowo aktywnymi związkami o zróżnicowanej budowie strukturalnej wytwarzanymi przez bakterie i drożdże. Dzięki szczególnym właściwościom, mogą mieć szerokie zastosowanie w przemyśle wydobywczym ropy naftowej, bioremediacji gleb, produkcji smarów, farb i lakierów, w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, papierniczym i tekstylnym.

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie, czy mikroorganizmy arktyczne są zdolne do syntezy biosurfaktantów oraz w jaki sposób warunki prowadzenia hodowli wpływają na produkcję tych związków. Kolejnym celem było oczyszczenie biosurfaktantów, oznaczenie struktury chemicznej i zbadanie właściwości wyizolowanych związków. W badaniach użyto trzy szczepy bakterii arktycznych: *Pseudomonas fluorescens* BD5, *Pseudomonas putida* BD2 oraz *Rhodococcus fascians* BD8. Wykazano, że badane szczepy arktyczne charakteryzują się zróżnicowanymi zdolnościami do biosyntezy związków powierzchniowo czynnych w zależności od warunków hodowli. Wydajność syntezy

biosurfaktantów przez bakterie arktyczne zależała od źródła węgla w pożywce, temperatury prowadzenia hodowli oraz stopnia napowietrzenia pożywki.

Oznaczenie chemicznej struktury związków powierzchniowo czynnych syntetyzowanych przez bakterie *P. fluorescens* BD5, *P. putida* BD2 oraz *R. fascians* BD8 rozpoczęto od oczyszczenia biosurfaktantów za pomocą preparatywnych technik chromatograficznych RP-HPLC oraz PLC. Za pomocą technik spektroskopowych MALDI-TOF/MS, GC-MS, ESI-MS oraz NMR oznaczono strukturę chemiczną analizowanych biosurfaktantów.

Stwierdzono, że biosurfaktanty produkowane przez szczep *P. fluorescens* BD5 to dwa nowe cykliczne lipopeptydy, które nazwano pseudofaktyna I i II. Biosurfaktanty produkowane przez *P. putida* BD2 to diramnolipid oraz fosfatydyloetanolaminy, podczas gdy biosurfaktant syntetyzowany przez szczep *R. fascians* BD8 to trehalozolipid.

Różna budowa chemiczna biosurfaktantów decydowała o ich różnej aktywności powierzchniowej. W prowadzonych badaniach największą redukcję wartości napięcia powierzchniowego z 71 mN/m (woda) do 31 mN/m otrzymano dla ramnolipidu Rha₂-C₁₀-C₁₀. Lipopeptyd (pseudofaktyna II) i trehalozolipid obniżały napięcie powierzchniowe odpowiednio do 31.5 mN/m oraz 34 mN/m.

Ważnym czynnikiem wpływającym na aktywność powierzchniową biosurfaktantów jest zdolność do dyspergowania związków hydrofobowych oraz stabilność powstałych emulsji. Stwierdzono, że zdolność do dyspergowania substancji hydrofobowych oraz stabilność powstałych emulsji zależy od rodzaju użytego związku hydrofobowego. W przypadku niepolarnych związków aromatycznych i alifatycznych, zdolność roztworów biosurfaktantów do ich dyspergowania oraz stabilności powstałych emulsji były lepsze od syntetycznych surfaktantów Tweenu 80 i Tritonu-X100.

Do korzystnych właściwości biosurfaktantów syntetyzowanych przez *P. fluorescens* BD5, *P. putida* BD2 oraz *R. fascians* BD8 zaliczyć należy ich zdolność do hamowania adhezji (pierwszego etapu tworzenia biofilmu) testowych mikroorganizmów, np. *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis* oraz *Candida albicans* do polistyrenowej powierzchni. Wpływ biosurfaktantów nie był związany z zabijaniem patogennych drobnoustrojów, co stwierdzono w doświadczeniu badającym wpływ biosurfaktantów na ich przeżywalność. Dzięki obserwacji w mikroskopie konfokalnym wykazano, że zarówno pseudofaktyna II jak i trehalozolipid hamowały tworzenie biofilmów bakteryjnych i drożdżowych na powierzchni polistyrenu, szkła i silikonu.

Badania *in vitro* wykazały wrażliwość komórek nowotworowych czerniaka A375 na cytotoksyczne działanie pseudofaktyny II i trehalozolipidu. W przeciwieństwie do komórek nowotworowych, testowane komórki prawidłowe ludzkich fibroblastów (NHDF) wykazywały niższą wrażliwość na atypowe proliferacyjne działanie testowanych związków. Indukcję apoptozy powodowaną przez biosurfaktanty w komórkach A375 badano poprzez międzynukleosomalną fragmentację DNA oraz zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej (translokacja fosfatydylseryny do zewnętrznej warstwy błony).

Zmiany morfologiczne obserwowane po stymulacji komórek rosnącymi stężeniami pseudofaktyny II i trehalozolipidu dotyczyły zmiany kształtu komórek, jąder komórkowych oraz fragmentacji jądra. Inną znaną cechą charakterystyczną apoptozy jest utrata asymetrii błony komórkowej w wyniku przemieszczenia się fosfatydylseryny z warstwy wewnętrznej na powierzchnię błony plazmatycznej. Otrzymane wyniki, uzyskane metodą barwienia komórek przy pomocy aneksyny V związanej chemicznie z tioizocyjanianem fluoresceiny (FITC) świadczą, że w komórkach czerniaka A375 na które działano pseudofaktyną II i trehalozolipidem dochodzi do utraty asymetrii błony komórkowej.

Badania immunocytochemiczne, przeprowadzone z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych wykazały ekspresję kaspazy-3, zaangażowanej w mitochondrialną drogę śmierci komórki podczas apoptozy komórek czerniaka A375 indukowanej pseudofaktyną II i trehalozolipidem. Zdolność do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych przez pseudofaktynę II i trehalozolipid pozwala uznać je za potencjalne i obiecujące związki o właściwościach przeciwnowotworowych.

Otrzymane wyniki wskazują, że biosurfaktanty syntetyzowane przez bakterie arktyczne wykazują właściwości powierzchniowo czynne typowych surfaktantów chemicznych, prezentując przy tym różnorodność form strukturalnych. Z racji wykazywanych właściwości powierzchniowych oraz aktywności biologicznej mogą być wykorzystane w różnych gałęziach przemysłu i medycynie.