

STRESZCZENIE

Polimery syntetyczne są jednym z najważniejszych wynalazków człowieka, mających zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu i w życiu codziennym. Są podstawowym materiałem do otrzymywania tworzyw sztucznych i innych produktów chemicznych. Jednak poprzez swoją wszechobecność stanowią coraz większe zagrożenie dla środowiska naturalnego, stąd konieczne staje się znalezienie dla polimerów syntetycznych bezpiecznych, naturalnych alternatyw. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie polimerów pochodzenia naturalnego, tzw. biopolimerów, które są syntetyzowane przez wszystkie organizmy żywe. Zalicza się do nich białka, kwasy nukleinowe i polisacharydy. Źródłem biopolimerów o coraz większym znaczeniu są mikroorganizmy. Aby zapewnić maksymalne bezpieczeństwo stosowania biopolimerów pochodzenia mikrobiologicznego, najlepszym rozwiązaniem jest zastosowanie do ich produkcji organizmów nieszkodliwych dla człowieka oraz środowiska naturalnego.

Bacillus subtilis jest bakterią znaną z produkcji różnorodnych metabolitów, takich jak witaminy, biosurfaktanty, enzymy czy biopolimery. Co najważniejsze, jest bakterią posiadającą status GRAS, czyli uznaną za bezpieczną dla ludzi i zwierząt. Jednym z interesujących metabolitów *B. subtilis* jest lewan, biopolimer składający się z jednostek D – fruktofuranozy, połączonych wiązaniami β -(2,6) – glikozydowymi w łańcuchach głównych oraz β -(2,1) – glikozydowymi w rozgałęzieniach. Właściwości biologiczne lewanu zależą od jego masy cząsteczkowej i stopnia rozgałęzienia. Obecnie komercyjnie nie ma dostępnych standardów lewanu o określonej budowie cząsteczki oraz masie, a jedyny dostępny standard mikrobiologiczny pochodzi z *Erwinia herbicola*. Lewan syntetyzowany przez *B. subtilis* powstaje w postaci bimodalnego rozkładu masy cząsteczkowej. Zróżnicowana struktura oraz właściwości lewanu są interesujące z perspektywy badań naukowych i późniejszych zastosowań w różnych interdyscyplinarnych obszarach.

Celem rozprawy doktorskiej było otrzymanie lewanu z wykorzystaniem probiotycznych, bezpiecznych bakterii *B. subtilis*, zbadanie jego właściwości fizykochemicznych i biologicznych oraz określenie jego możliwości aplikacyjnych.

Szczepy wykorzystane w pracy poddano selekcji, która obejmowała metodę kolonijnego PCR, umożliwiającą identyfikację obecności genu lewanosacharazy, selekcję na płytkach z podłożem stałym z glukozą i sacharozą jako źródłami węgla oraz eksperymentalne

potwierdzenie obecności poszukiwanego polimeru. Scharakteryzowano właściwości fizykochemiczne otrzymanego biopolimeru, wykorzystując metody spektroskopowe NMR i IR, termograwimetrię, chromatografię żelową wykluczania oraz skaningową mikroskopię elektronową. Następnie zbadano właściwości biologiczne lewanu określając parametry takie jak *Water Holding Capacity* (WHC), *Water Solubility Index* (WSI), właściwości przeciwutleniające oraz oceniono jego bezpieczeństwo względem wybranych linii komórkowych przy zastosowaniu metody MTT. Otrzymano i przebadano właściwości fizykochemiczne nanocząsteczek lewanu wykorzystując metody optyczne oraz mikroskopowe. Zbadano przenikanie przez skórę nanocząsteczek w komorze dyfuzyjnej Franza oraz zobrazowano ich umiejscowienie w skórze metodami mikroskopowymi. Poferment z *B. subtilis* natto KB1 z lewanem poddano badaniom mikrobiologicznym, oceniając jego wpływ na mikroorganizmy patogenne oraz zbadano konduktometrycznie interakcję pofermentu z anionowym surfaktantem. Przebadano nośniki tworzone przez lewan oraz właściwości aplikacyjne otrzymanego pofermentu oraz nanocząsteczek lewanu.

W pierwszym etapie badań poszukiwano szczepów zdolnych do syntezy lewanu oraz wytypowano najefektywniejszy szczep *B. subtilis* natto KB1. Otrzymany biopolimer syntetyzowany jest z bimodalnym rozkładem masy cząsteczkowej. Wydłużenie czasu hodowli oraz stopniowe wytrącanie lewanu z pofermentu wzrastającym stężeniem etanolu umożliwiło otrzymanie frakcji biopolimeru wysokiej czystości (99,69%) o mniejszej masy cząsteczkowej 37,62 kDa (LMW). Jego struktura została potwierdzona przy zastosowaniu metod spektroskopowych, a dodatkowo zastosowana termograwimetria ujawniła obecność niewielkiej ilości rozgałęzień w cząsteczkach.

Analiza za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego pokazała, że agregaty lewanu mają rozwiniętą powierzchnię właściwą, w związku z tym może on absorbować jony i cząsteczki. Wykazano różnice pomiędzy zdolnością do zatrzymywania wody pomiędzy lewanem LMW z *B. subtilis* natto KB1 ($99,34 \pm 0,37\%$) a lewanem z *E. herbicola* ($1498,30 \pm 38,90\%$). Różnica ta prawdopodobnie wynika ze stopnia rozgałęzienia polimeru. W przypadku WSI, większy stopień rozpuszczalności charakteryzuje próbkę zawierającą LMW polimer ($99,30 \pm 4,30\%$).

W dalszym toku badań oceniono bezpieczeństwo lewanu w hodowlach *in vitro* ludzkich fibroblastów oraz keratynocytów. Następnie badania zostały uzupełnione o własności antyrodnikowe i antyutleniające lewanu. Nie wykazano toksycznego działania lewanu wobec badanych linii komórkowych w zakresie stężeń 0,98 – 1000 µg/ml. Zaobserwowano różnice

w hamowaniu utleniania w emulsji pomiędzy lewanem LMW z *B. subtilis* natto KB1 a lewanem HMW z *E. herbicola*. Polimer LMW zmiotł ponad 42% rodnika, podczas gdy lewan z *E. herbicola* nie wykazał mierzalnej aktywności. Nie wykazano toksycznego działania badanych lewanów względem dwóch linii nowotworowych Hs 294t i A375 w zakresie 0,98 – 1000 µg/ml.

Otrzymano nanocząsteczki lewanu z wykorzystaniem dwóch metod, które poddano ocenie pod kątem ich wpływu na środowisko. W tym celu niezbędne było powiększenie skali produkcji do bioreaktora o pojemności całkowitej 500 L. Oba warianty nanocząsteczek charakteryzowały się zbliżonymi parametrami fizycznymi z wielkością około 220 nm. Analiza za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego pokazała różnice w ich powierzchni, które mogą wynikać ze sposobu otrzymywania nanostruktur tworzących lewan. Wykazano, że oba warianty nanocząsteczek umożliwiają enkapsulację związków hydrofobowych oraz są zdolne do przenikania przez warstwę rogową naskórka i wpływają pozytywnie na nawilżenie skóry. Poferment z *B. subtilis* natto KB1 z nanocząsteczkami lewanu poddano badaniom pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej i wykazano pozytywne działanie bójcze względem bakterii i grzybów oraz działanie przeciwadhezyjne i redukujące biofilm. Zbadano także interakcje pomiędzy anionowym środkiem powierzchniowo czynnym a lewanem w pofermencie.

Poferment z lewanem z *B. subtilis* natto KB1 wykorzystano do przygotowania prototypowych żeli pod prysznic, a jego dodatek spowodował znaczne zmniejszenie negatywnego wpływu gotowego produktu na skórę. Zaobserwowano spadek liczby zeinowej, która jest wskaźnikiem drażniącego potencjału oraz zmniejszenie zdolności emulgujących substancji hydrofobowych o 40%. Nanocząsteczki otrzymane z wytrąconego polimeru wprowadzono w matrycę kremu, którego działanie zbadano w warunkach *in vivo*. Po 28 dniach stosowania, przebarwienia na skórze zostały zredukowane o 4,83%, zmarszczki o 5,07% oraz zwiększyło się nawilżenie skóry w strefie T i U o odpowiednio o 9,77% i 10,78%.

Otrzymane wyniki wskazują na duże możliwości aplikacyjne zarówno biopolimeru z *B. subtilis* natto KB1, jak i samego pofermentu. Upowszechnienie komercjalizacji lewanu umożliwi opracowanie wydajnej wielkoskalowej produkcji z obniżeniem kosztów produktu końcowego.