

Streszczenie pracy doktorskiej

Piotr Biniarz

Optymalizacja produkcji, oczyszczanie i badanie właściwości biosurfaktantów

Związki powierzchniowo czynne (surfaktanty) są powszechnie wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu, np. farmacji, żywieniu czy rolnictwie. Roczne zużycie tych substancji sięga ok. 20 mln ton i generuje rosnące zanieczyszczenie środowiska ze względu na ich stosunkowo niską biodegradowalność. Obecnie używane syntetyczne surfaktanty są produkowane z pochodnych ropy naftowej lub powstają w wyniku skomplikowanej obróbki chemicznej tłuszczów zwierzęcych albo roślinnych. Poszukuje się więc substancji, które mogłyby stać się ekologicznymi zamiennikami syntetycznych detergentów.

Związki powierzchniowo czynne pochodzenia biologicznego, które zbiorczo nazwano biosurfaktantami, stanowią niezwykle ciekawą grupę. Biosurfaktanty są najczęściej metabolitami wtórnymi, wydzielanymi przez różne gatunki mikroorganizmów, np. szczepy z rodzajów *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Candida*. Drobnocząsteczkowe biosurfaktanty najczęściej dzieli się na kilka grup, ze względu na ich budowę chemiczną: lipopeptydy, glikolipidy, fosfolipidy, lipoproteiny i inne. Biosurfaktanty mają często lepsze właściwości powierzchniowe od swoich syntetycznych odpowiedników a jednocześnie wykazują szereg aktywności biologicznych jak działanie antybiotyczne, przeciwgrzybowe czy przeciwnowotworowe. Biosurfaktanty nie znalazły się do tej pory w powszechnym użyciu głównie ze względu na stosunkowo małą skalę i wysokie koszty ich produkcji i oczyszczania.

Nadrzędnym celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej była optymalizacja produkcji i oczyszczania lipopeptydowego biosurfaktantu pseudofaktyny (PF). PF jest wydzielana przez arktyczny szczep *Pseudomonas fluorescens* BD5 i jest wydajnym emulsyfikatorem. Działa również jako środek przeciwdrobnoustrojowy, przeciwadhezyjny, rozpraszający biofilmy i przeciwnowotworowy. Koszty uzyskania PF są obecnie zbyt wysokie, aby możliwe było jej komercyjne zastosowanie.

Opisane w niniejszej pracy badania rozpoczęto od opracowania metod, które umożliwiłyby jakościową i ilościową analizę PF, obecnej w podłożach hodowlanych. Opracowano szybkie i dokładne metody bazujące na chromatografii cieczowej, umożliwiające badanie PF w szerokim zakresie stężeń. Sprzężenie chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas umożliwiło ponadto analizę jakościową i ilościową analogów strukturalnych PF (PF1 – PF4) oraz identyfikację dwóch nowych analogów (PF3 i PF4). Czas

analizy próbki z wykorzystaniem opracowanych metod wynosił 15 min. w przypadku HPLC i zaledwie 4 min. w przypadku UPLC i UPLC-MS. Opracowano też metodę wydajnej ekstrakcji lipopeptydów z podłoża hodowlanego w przypadku kwantyfikacji w trudnych matrycach, która umożliwia przygotowanie do analizy nawet 100 próbek w ciągu 15 min. Dodatkowym atutem opracowywanych metod ilościowych i jakościowych jest prowadzenie pomiarów bezpośrednio w podłożach hodowlanych.

Kolejnym etapem pracy była optymalizacja podłoża i warunków hodowli aby zmaksymalizować ilość otrzywanej PF. Wcześniej stosowane protokoły produkcji PF na podłożu minimalnym i jej oczyszczania z wykorzystaniem ekstrakcji octanem etylu umożliwiały produkcję do 10 mg PF z 1 L hodowli. Optymalizację hodowli prowadzono zarówno w klasycznych kolbach Erlenmeyera, jak i z wykorzystaniem wysokoprzepustowego zestawu do mikrofermentacji Biolector®. Uzyskane wyniki umożliwiły opracowanie optymalnego podłoża hodowlanego, które zawiera wysokie stężenia glicerolu i tryptonu oraz dodatek induktora, którym okazała się być leucyna. Określono także, że wysoki poziom natleniania hodowli jest istotnym parametrem dla syntezy PF. Stężenie PF w zoptymalizowanych hodowlach wyniosło prawie 1200 mg/L, czyli było ok. 120-krotnie wyższe niż w warunkach początkowych.

Ostatnim etapem optymalizacji była próba przeniesienia hodowli do bioreaktora i wraz z opracowaniem metody stałego odprowadzania produktu i jego oczyszczania. Hodowle w bioreaktorach (3- i 42-litrowych) prowadzono w zoptymalizowanych podłożach a PF odbierano z bioreaktora wraz z wypływającą pianą. Opracowane hodowle umożliwiały otrzymanie 250 – 370 mg PF z bioreaktora 3-litrowego oraz 6,3 – 7,6 g PF z bioreaktora 42-litrowego a oczyszczanie PF było możliwe dzięki opracowaniu protokołu wydajnej ekstrakcji z piany. Postępowanie umożliwia odzysk 80 – 90% PF z piany a czystość tak uzyskanej frakcji surowej PF wynosi 60 – 70%. Dodatkowo stworzono metody bazujące na półpreparatywnej chromatografii ciekowej, które umożliwiają uzyskanie PF o wysokiej czystości (>95%).

Opracowanie protokołu selektywnej produkcji i oczyszczania analogów PF umożliwiło rozpoczęcie badań porównawczych PF1 i PF2. Wykazano różnice we właściwościach fizykochemicznych i biologicznych analogów, pomimo ich bardzo podobnej budowy strukturalnej. Zmierzone wartości CMC wynosiły 30 mg/L dla PF1 i 19 mg/L dla PF2. Ponadto PF1 tworzyła micelle o prawie dwukrotnie większej średnicy od PF2. Także indeks emulsyfikacji oraz aktywność przeciwbakteryjna i przeciwadhezyjna były różne dla badanych analogów.

W ramach pracy doktorskiej postanowiono także zidentyfikować szlak biosyntezy PF oraz geny zaangażowane w jej produkcję. W tym celu zsekwencjonowano genom *P. fluorescens* BD5 o długości 6 334 979 pz oraz zidentyfikowano *in silico* operony NRPS i geny potencjalnie zaangażowane w syntezę lipopeptydów. Następnie badano poziom transkrypcji określonych genów podczas produkcji PF, aby zidentyfikować ewentualne korelacje. Potencjalne powiązanie z syntezą PF wykryto dla 18 genów kodujących m.in: elementy *quorum sensing*, czynniki sigma, regulatory asymilacji żelaza, białka szoku cieplnego, operony NRPS i specyficzne pompy ABC.

Otrzymane w ramach pracy doktorskiej wyniki umożliwiły opracowanie i wdrożenie bioprocessu do produkcji i oczyszczania lipopeptydowego biosurfaktantu PF w skali półprzemysłowej. Dodatkowo zsekwencjonowano genom producenta PF, szczepu *P. fluorescens* BD5 i zidentyfikowano geny mogące, bezpośrednio lub pośrednio, brać udział w biosyntezie PF.