

Ida Szmigiel

Streszczenie rozprawy doktorskiej „Biotransformacja śruty rzepakowej z wykorzystaniem *Bacillus subtilis*”

Działalność rolnicza i rolno-przemysłowa generuje duże ilości produktów ubocznych lignocelulozowych takich jak m.in. wyłoczyny, słoma, łodygi, kolby, łuski i skórki owoców. Główne formy odpadów organicznych to odpady żywnościowe z gospodarstw domowych, odpady rolnicze, odpady przemysłowe oraz odpady zwierzęce.

Jedną z możliwości recyklingu odpadów i ich ponownego wykorzystania jest biotransformacja przy użyciu mikroorganizmów. Fermentacja podłoży stałych - SSF (*ang. solid-state fermentation*) polega na hodowaniu mikroorganizmów na stałym, nierozpuszczalnym substracie z niewielkim udziałem wody. Ten typ hodowli niesie za sobą wiele korzyści, w tym ekonomiczne, energetyczne jak i ekologiczne. Procesy SSF są wykorzystywane do otrzymywania szerokiej gamy produktów pochodzenia biologicznego, takich jak wszelkiego rodzaju enzymy, biosurfaktanty, biopaliwa i wielu innych. Ponadto, z wykorzystaniem SSF otrzymuje się fermentowane pasze bądź dodatki do pasz dla zwierząt. W ten sposób znacznie polepsza się ich właściwości odżywcze, wzbogacając je o mikroorganizmy z korzystnymi właściwościami, jednocześnie pozbywając się ewentualnych związków antyżywniowych ograniczających użycie tych substratów w surowym stanie.

Wśród dostępnych w dużych ilościach substratów jest śruta rzepakowa mająca ogromny potencjał do wykorzystania w formie paszy dla zwierząt. Powstaje po ekstrakcji oleju z nasion rzepaku. Jest bogatym źródłem białka, z bardzo dobrze zbilansowanym składem aminokwasowym, jednakże zawiera również sporą ilość włókna, którego zwierzęta monogastryczne nie są w stanie trawić. W celu poprawy strawności śruty rzepakowej, można przeprowadzić fermentację stałą wybranymi mikroorganizmami, hydrolizując włókno do cukrów lepiej przyswajalnych przez zwierzęta oraz niwelując substancje antyżywniowe ograniczające zastosowanie/ilość śruty w mieszankach paszowych. Śruta rzepakowa jest również bardzo dobrym podłożem do produkcji wysokowartościowych produktów pochodzenia mikrobiologicznego, takich jak enzymów paszowych czy biosurfaktantów. Nieustannie poszukuje się stosunkowo tanich surowców i odpowiednich mikroorganizmów produkujących wartościowe substancje w celu ich opłacalnej produkcji.

Stąd, celem niniejszej pracy była biotransformacja śruty rzepakowej z wykorzystaniem szczepu *Bacillus subtilis* 87Y. Opisane badania w pracy rozpoczęto od przebadania zdolności metabolicznych szczepu 87Y pod kątem aktywności enzymatycznej jak i produkcji lipopeptydowego biosurfaktantu surfaktyny. Szczep *B. subtilis* 87Y pochodzący z kolekcji Zakładu Biotransformacji, został wcześniej wyizolowany z dżdżownicy kalifornijskiej.

W pierwszej kolejności określono aktywność enzymatyczną: ksylanolityczną oraz celulolityczną podczas hodowli szczepu *B. subtilis* 87Y na śrucie rzepakowej. Następnie dobrane warunki hodowli sprawdzono pod kątem produkcji surfaktyny przez szczep 87Y, dla których kontrolą była hodowla płynna we wcześniej opracowanym w Zakładzie Biotransformacji bogatym płynnym podłożu suplementowanym waliną oraz leucyną, specjalnie dedykowanym do produkcji surfaktyny. Metodą hodowli stałej na śrucie rzepakowej otrzymano niemal ten sam uzysk biosurfaktantu co w hodowli na płynnym, suplementowanym aminokwasami i drogim podłożu.

Kolejnym etapem pracy było określenie ulepszenia wartości odżywczej śruty rzepakowej. Analiza składu chemicznego wykazała ubytek włókna surowego, w wyniku fermentacji.

Ważnym aspektem fermentacji śruty rzepakowej było również określenie zdolności szczepu 87Y do redukcji mykotoksyn z potencjalnego materiału paszowego. Zakażenia mykotoksynami to powszechny problem, który się pojawia już podczas uprawy zbóż, bądź podczas ich przechowywania. Spożycie przez zwierzęta paszy nadkażonej pleśniami produkującymi mykotoksyny, ma ogromnie negatywne skutki zdrowotne. Stąd tak ważnym elementem jest możliwość niwelowania tych toksycznych związków poprzez fermentację mikroorganizmami. Badając nadkażoną śrutę deoksyniwalenolem, zearalenonem oraz aflatoksynami B1 jak i B2 wykazano znaczną redukcję tych mykotoksyn poprzez fermentację *B. subtilis* 87Y.

Kolejnym etapem pracy były badania potencjalnych właściwości probiotycznych szczepu *B. subtilis* 87Y metodami *in vitro*. Stwierdzono przeżywalność szczepu 87Y w kwaśnym środowisku oraz solach żółciowych. Ponadto, wykorzystując i modyfikując metodę z zastosowaniem insertów do hodowli komórek ssaczych, przeprowadzono kohodowle *B. subtilis* 87Y ze szczepami *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* i *S. typhimurium*. Wykazano, iż szczep 87Y ma zdolność promowania wzrostu probiotycznych bakterii *L. lactis*, jak i jednoczesnego hamowania patogenów takich jak *S. aureus* oraz *Salmonella* spp.

Następnie postanowiono powiększyć skalę badań i przeprowadzić eksperyment żywienia kurcząt typu brojler dodatkiem 3% niefermentowanej oraz fermentowanej szczepem *B. subtilis* 87Y śruty rzepakowej i analizy mikrobiomu jelita ślepego. Analiza treści jelita ślepego metodą płytkową z użyciem podłoży chromogennych wykazała korzystny wpływ zarówno dodatku niefermentowanej jak i fermentowanej śruty rzepakowej w paszy kurcząt. Wykazano hamowanie rozwoju patogennych szczepów *Klebsiella pneumoniae* czy *Enterobacter cloacae* oraz wzrost ilości probiotyków z rodzaju *Lactobacillus*. Dalsza analiza metagenomu z treści jelita ślepego wykazała rozwój eukariotycznego pasożyta *Blastocystis hominis* u kurcząt karminowych samą paszą bez dodatków. Wykonano także analizę histologiczną nabłonka jelita ślepego, w której wykazano znacznie lepszy obraz morfologiczny u kurcząt karmionych dodatkiem śruty fermentowanej *B. subtilis* 87Y.

W ramach niniejszej pracy zdecydowano się również przebadac składniki ściany komórkowej owsa, na którym spośród szeregu różnych zbóż, *B. subtilis* 87Y produkował najwięcej surfaktyny. Badanie aktywności enzymatycznej, ekspresji genów kodujących specyficzne enzymy rozkładające elementy ściany komórkowej i analiza mikroskopowa ścian komórkowych owsa wykazała, iż ksylan, bądź jego pochodne są prawdopodobnie związkami bezpośrednio zwiększającymi produkcję biosurfaktantu.

Wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej określiły szczep *B. subtilis* 87Y jako posiadający duże uzdolnienia metaboliczne pod kątem produkcji enzymów oraz surfaktyny, jak i redukcji mykotoksyn. Ponadto, szczep 87Y wykazywał zarówno *in vitro* jak i *in vivo* właściwości probiotyczne. Potwierdzono również, iż śruta rzepakowa ma duży potencjał jako łatwo dostępne i tanie podłoże do wytwarzania wysokowartościowych produktów pochodzenia biologicznego.