

**Molekularna, fizjologiczna i biochemiczna charakterystyka
zimnolubnych grzybów mikroskopowych z kolekcji Instytutu
Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej**

Mgr inż. Katarzyna Małgorzata Wiśniewska

Promotor dr hab. inż. Aneta Białkowska, prof. uczelni

Streszczenie

Przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie były zimnolubne szczepy drożdży i drożdżopodobnych grzybów należące do kolekcji mikroorganizmów Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej. Ich charakterystyka rozpoczęta przez autorkę podczas pracy magisterskiej i kontynuowana w ramach projektu doktorskiego obejmowała analizę cech fizjologicznych, biochemicznych i molekularnych. Uzyskane wyniki zostały zebrane i wykorzystane do opracowania metryczek dla 20 szczepów wyizolowanych z gleby antarktycznej. Metryczka informuje o przynależności taksonomicznej szczepu, jego morfologii, fizjologii i wybranych cechach biochemicznych.

Ponadto, w oparciu o charakterystykę zimnolubnych drożdży i drożdżopodobnych grzybów dokonano wyboru jednego szczepu, *Aureobasidium bupleuri* G3 IBMiP, o unikatowych uzdolnieniach enzymatycznych i w ramach dogłębnej charakterystyki biochemicznej tego mikroorganizmu zaprojektowano wydajną drogę pozyskania wysokooczyszczonego preparatu enzymatycznego ze wskazaniem jego potencjału aplikacyjnego.

Po raz pierwszy za pomocą cytometrii przepływowej i elektroforezy pulsacyjnej (PFGE) określono wielkość genomów oraz scharakteryzowano kariotypy psychrofilnych i psychrotrofowych drożdży *Goffeauzyma gilvescens*, *Naganishia globosa*, *Goffeauzyma gastrica* i *Naganishia albida*. Wśród badanych szczepów większość stanowiły haploidy, zidentyfikowano dwa szczepy o diploidalnej liczbie chromosomów (*Babjeviella inositovora* i *Rhodotorula mucilaginosa*) oraz dwa aneuploidy (*Candida sake* i *Naganishia adeliensis*), dla których stosunek zawartości DNA w komórce do sumy długości rozdzielonych przy użyciu PFGE chromosomów wynosił odpowiednio 1,5 i 1,59.

Przeprowadzony skrining 44 zimnolubnych szczepów pod kątem biosyntezy enzymów adaptowanych do niskich temperatur wykazał, że najpopularniejsze wśród badanych mikroorganizmów są uzdolnienia esterolityczne (33 szczepy), amylolityczne (26 szczepów) oraz w kierunku hydrolizy kwasu fitynowego (19 szczepów). Ponadto, 14 spośród badanych szczepów wykazało aktywność proteolityczną i β -galaktozydazy, 6 pektynolityczną i 1 ksylanolityczną. Interesującą z biotechnologicznego punktu widzenia aktywność zimnolubnej lakazy stwierdzono dla 4 szczepów. Hodowla wgłębna wykazała, że jeden z nich, zidentyfikowany jako *A. bupleuri* G3 IBMiP charakteryzuje się szczególnie wysoką aktywnością tego enzymu. Dalsze badania zostały nakierowane na bliższą charakterystykę biochemiczną tego szczepu, ze szczególnym uwzględnieniem jego zdolności w kierunku biosyntezy lakazy.

W ramach badań opracowano optymalne warunki biosyntezy lakaz *A. bupleuri* G3 IBMiP, w tym zidentyfikowano związki zwiększające ich nagromadzenie, tj. jony miedzi, Tween 80 oraz kwas askorbinowy. Aktywność preparatu enzymatycznego lakaz w reakcji z kwasem 2,2' azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowym) (ABTS) w optymalnym pH 3,5 wynosi 215 U/l po 15 dniach hodowli w podłożu z surowcem odpadowym - młótem browarniczym i ok. 130 U/l po 25 dniach w podłożu zdefiniowanym. Optymalna temperatura działania preparatu mieści się w zakresie 30-40 °C, w temperaturze 10 °C zachowuje on ponad 60%

maksymalnej aktywności. Preparat enzymatyczny lakaz charakteryzuje się wysoką termolabilnością – okres półtrwania w 40 °C wynosi zaledwie 60 min.

W celu bliższej charakterystyki biochemicznej szczepu *A. bupleuri* G3 IBMiP zsekwencjonowano jego genom i określono wielkość (ok. 23,4 Mbp). Na podstawie analizy bioinformatycznej zidentyfikowano ponad 10 tysięcy genów kodujących białka. Wśród nich znalazły się cztery geny oksydaz wielomiedziowych posiadające motywy charakterystyczne dla lakaz, z czego jeden odpowiedzialny jest za biosyntezę lakazy KbLcc1.

Poznanie sekwencji genu kodującego lakazę KbLcc1 umożliwiło ekspresję tego białka w heterologicznym mezofilnym gospodarzu *Pichia pastoris*. Największą aktywność rekombinowanego białka (ok. 130 U/l) osiągnięto po 7 dniach hodowli wgłębszej w podłożu ekspresyjnym, suplementowanym 2,0 mM Cu^{2+} . Rekombinowaną lakazę KbLcc1 oczyszczono i szczegółowo scharakteryzowano. I tak enzym o masie cząsteczkowej ok. 69 kDa jest białkiem kinetycznie adaptowanym do niskich temperatur, charakteryzuje się wysoką specyficznością względem syryngaldazyny (K_M 0,021 mM, k_{kat} 37,85 s^{-1}) oraz kwasu synapinowego (K_M 0,014 mM, k_{kat} 1,68 s^{-1}). Enzym jest stabilizowany przez jony niklu, wapnia i magnezu, natomiast silnie inhibowany przez aceton i jony żelaza (Fe^{2+} i Fe^{3+}).

Obecność heksanu (40%, v/v) powoduje prawie 60% wzrost aktywności.

W ramach badania potencjału aplikacyjnego lakaz z *A. bupleuri* wykazano, że zarówno natywny preparat, jak i enzym rekombinowany są przydatne w dekoloryzacji barwników syntetycznych z grupy trifenylometanowych (fuksyna zasadowa, fiolet krystaliczny i błękit brylantowy Coomasie R-250) oraz barwników triazynowych (błękit metylenowy).

Największy stopień dekoloryzacji osiągnięto dla fioletu krystalicznego (ponad 40%). Dodatkowo, rekombinowana lakaza KbLcc1 wykazuje zdolność przekształcenia kwasu ferulowego do waniliny. Po 5 dniach inkubacji enzymu w obecności ABTS jako mediatora uzyskano ok. 22 mg/l waniliny z wydajnością molową ok. 14%.