

**Białka AFP z psychrofilnych drożdży z rodzaju *Glaciozyma* i ich
potencjał biotechnologiczny**

mgr inż. Edyta Majewska

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

Streszczenie

Przedmiotem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były psychrofilne drożdże z rodzaju *Glaciozyma martinii* 186, stanowiące źródło zewnątrzkomórkowego białka przeciwzamarzaniowego (ang. *antifreeze protein* – AFP). Szczep ten został wyizolowany z wód Zatoki Admiralicji na Wyspie Króla Jerzego w archipelagu Szetlandów Południowych. Należy do kolekcji mikroorganizmów antarktycznych Instytutu Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej Politechniki Łódzkiej.

W ramach badań opracowano warunki biosyntezy natywnego białka GmAFP produkowanego przez szczep *G. martinii*, które następnie oczyszczono za pomocą chromatografii powinowactwa do lodu. Analiza elektroforetyczna potwierdziła obecność docelowego białka o masie cząsteczkowej wynoszącej ~27 kDa, które po barwieniu metodą PAS okazało się być glikoproteiną. Za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej potwierdzono aktywność termicznej histerezy GmAFP. Kolejną, charakterystyczną dla tego typu białek, aktywność inhibicji rekrytalizacji lodu, wykazano za pomocą mikroskopii świetlnej z podstawą chłodzącą. Wstępne badania dotyczące krioprotekcyjnej roli GmAFP w procesie mrożenia marchwi były obiecujące. W obecności białka przeciwzamarzaniowego obserwowano mniejszą destrukcję komórek po rozmrożeniu warzywa oraz redukcję utraty barwników karotenoidowych z komórek. Zaistniały zatem przesłanki do zwiększenia wydajności biosyntezy tego metabolitu. W tym celu podjęto próby izolacji genu kodującego to białko z macierzystego gospodarza. Niestety, zaprojektowanie starterów w oparciu o sekwencję blisko spokrewnionego organizmu *Glaciozyma antarctica*, nie przyczyniło się do amplifikacji i detekcji pożądanego genu *gmAFP*.

W celu lepszego zrozumienia funkcjonalności białek AFP postanowiono prowadzić dalsze badania z udziałem syntetycznego genu *gaAFP* pochodzącego z psychrofilnych drożdży *Glaciozyma antarctica* PI12. *GaAFP* z powodzeniem eksprymowano w metylotroficznych drożdżach *Pichia pastoris* GS115. Największe stężenie białka GaAFP otrzymano po 3-dniowej hodowli wgłębnej, prowadzonej w podłożu ekspresyjnym z indukcją co 12h 1% metanolem, w temperaturze 28°C. Rekombinowane białko o masie cząsteczkowej ~25 kDa oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa do lodu, a następnie potwierdzono jego aktywność inhibicji rekrytalizacji lodu metodą mikroskopową.

W ramach badania potencjału aplikacyjnego GaAFP wykazano, że białko to może być z powodzeniem wykorzystane jako krioprotektant w przemyśle spożywczym. Dodatek tego

biokomponentu do warzyw czy owoców (w tym, np. marchwii, kalarepy oraz borówki amerykańskiej) przed ich mrożeniem, pozytywnie wpływa na strukturę rozmrożonych komórek oraz redukuje utratę wody z ich wnętrza. Efekt jest porównywalny do standardowo używanego krioprotektanta, jakim jest glicerol. Ten ostatni może jednak zmieniać smak żywności i dlatego nie zawsze nadaje się do stosowania w przemyśle spożywczym. Co więcej, obecność białka GaAFP poprawia przeżywalność komórek drożdżowych *Saccharomyces cerevisiae* podczas przechowywania w stanie zamrożonym. Taka strategia pozwala na wydłużenie okresu ich przechowywania, z jednoczesnym zapewnieniem stabilnych zapasów substratu podczas produkcji różnych rodzajów żywności.

W ramach pracy wykonano także badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych symulujących ludzki układ pokarmowy (linia komórkowa Caco-2 oraz HT-29), które ukazują, że białko GaAFP nie jest wobec nich cytotoksyczne w maksymalnym testowanym stężeniu 0,4 mg/ml po 24h inkubacji. Ponadto, stosując mysie makrofagi RAW 264.7 określono wpływ GaAFP na wydzielanie tlenku azotu (NO), który jest jednym z głównych mediatorów przewlekłego procesu zapalnego i ustalono, że nie wpływa ono na wydzielanie tlenku azotu; zarówno w komórkach stymulowanych LPS, jak i tych nie poddanych stymulacji.