

Katarzyna Ewa Kosiorowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności,  
Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław

Dyscyplina: Nauki biologiczne

Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Streszczenie sporządzone: 24.08.2022

Zanieczyszczenie planety odpadami z tworzyw sztucznych jest w ostatnich latach coraz bardziej dostrzegalne. Zwiększona produkcja i wykorzystanie tych materiałów w wielu dziedzinach przemysłu, połączone z niedopracowanym systemem zarządzania odpadami sprawiły, że coraz więcej ekosystemów odczuwa bolesne skutki akumulacji tychże śmieci. Jednym z najbardziej powszechnych tworzyw sztucznych na świecie jest poli(tereftalan etylenu) (PET), polimer o bardzo dobrych właściwościach fizyko-chemicznych, który jest uważany za niebiodegradowalny. Obecnie, naukowcy prowadzą wzmożone badania mające na celu rozwiązać ten realny i narastający problem a dotychczasowym rezultatem było określenie enzymów z klasy hydrolaz, takich jak kutynazy, lipazy i PETaza, jako zdolnych do hydrolizy wiązań estrowych obecnych w poliestrach (P1). Niniejsza praca skupia się na badaniu zdolności zmodyfikowanych drożdży *Yarrowia lipolytica* do rozkładu tworzyw sztucznych i ma na celu wprowadzenie nowatorskiej metody degradacji poliestrów bezpośrednio w hodowli mikroorganizmów.

W pierwszej fazie badań koncentrowano się na degradacji poliestrów alifatycznych, w której wykorzystano szczep drożdży *Y. lipolytica* produkujący pozakomórkowo kutynazy z *F. solani* i *T. reesei* z koekspresją natywnej lipazy (P2). Badania w tym zakresie dotyczyły aktywności enzymatycznej enzymów obecnych w supernatancie pochodzącym z hodowli, ich zdolności do tworzenia stref przejaśnień na emulgowanym podłożu poliestrowym (poli  $\epsilon$ -kapolaktonu; PCL), ilościowego oznaczania ilości uwalnianego  $\epsilon$ -kapolaktonu w procesie rozkładu oraz ubytku masy biodegradowalnych folii z tworzywa sztucznego po hodowli ze zmodyfikowanymi szczepami. W niniejszych badaniach ustalono, że szczepem wyróżniającym się wysokim poziomem biodegradacji poliestrów jest szczep *Y. lipolytica* z nadekspresją kutynazy z *F. solani* (AJD2 pAD CUT\_FS), wykorzystany również do biodegradacji PET (P3). Ponieważ PETaza z *Ideonella sakaiensis* nie wykazuje zdolności do hydrolizy wiązań estrowych obecnych w poliestrach alifatycznych (takich jak PCL), szczep

produkujący ten enzym, wraz ze szczepem wybranym w pierwszym etapie badań, został wykorzystany do oceny zdolności degradacyjnych tworzywa PET (P4).

Proces rozkładu PET został przeprowadzono bezpośrednio w hodowli zmodyfikowanych szczepów *Y. lipolytica*. Dodatkowo zbadano wpływ suplementacji na wydajność degradacji, stosując różne stężenia soli oraz oliwy z oliwek. Efektywność degradacji tworzyw sztucznych określono na podstawie ilości uwolnionych produktów hydrolizy PET, takich jak kwas tereftalowy (TPA) oraz kwas mono-(2-hydroksyetylowy)tereftalowy (MHET) przy użyciu ultrasprawnej chromatografii cieczowej (UPLC). Dodatkowo zbadano również zdolność do asymilacji końcowych produktów degradacji PET (takich jak TPA, EG) przez *Y. lipolytica* i porównano zdolność do hydrolizy MHET przez zmodyfikowane szczepy kutynazę z *F. solani* i PETazę z *I. sakaiensis*. Ponadto przeprowadzono hodowlę drożdży z folią PET, a strukturę jej powierzchni na folii sprawdzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Badania przeprowadzone w ramach tej pracy wskazują, że *Y. lipolytica* jest odpowiednim kandydatem, który może być wykorzystany jako organizm gospodarza do pozakomórkowej produkcji enzymów hydrolizujących poliestry. Ze względu na stabilizację pH podłoża hodowlanego po 72 h hodowli w zakresie optymalnych warunków środowiskowych dla obu stosowanych enzymów (pH 8,0-8,5) wykazano, że proces degradacji tworzyw sztucznych może być wydajnie przeprowadzony bezpośrednio w hodowli mikroorganizmów. Dodatkowo w naszych badaniach wykazaliśmy, że *Y. lipolytica* jest zdolna do asymilacji glikolu etylenowego (EG), który wraz z TPA jest końcowym produktem hydrolizy tego polimeru.

Słowa kluczowe: PETaza; kutynaza; lipaza; poli-ε-kaprolakton; PCL; *Yarrowia lipolytica*; poli(tereftalan etylenu); degradacja PET; odpady plastikowe; inżynieria genetyczna