

Załącznik 2

Autoreferat

przedstawiający życiorys naukowy
wnioskodawcy

oraz osiągnięcie naukowe zgłaszane
jako przedmiot postępowania habilitacyjnego
oraz

pozostałe osiągnięcia naukowe
(załącznik 2 w języku polskim)

dr Adam Waśko

Katedra Biotechnologii Żywności Człowieka i

Towaroznawstwa Żywności

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

e-mail: awasko1@tlen.pl

Tel. 81 462 33 55, fax 81 462 34 00

AUTOREFERAT

1. Imię i Nazwisko

Adam Waśko

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Tytuł magistra – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, kierunek biologia, specjalność biologia środowiskowa, 1996

Tytuł pracy: „Ekologia zachowań samic błotniaka stawowego w okresie rozrodu na torfowisku węglanowym pod Chełmem”

Stopień doktora – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, dziedzina: nauki biologiczne, dyscyplina: biologia, 2004

Tytuł rozprawy: „*Lactococcus lactis* IBB 500 – nowe źródło amylaz i pullulanazy”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Akademia Rolnicza w Lublinie, (w 2008 roku przekształcona na Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie) Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie,

- 10.1996 – 09.1997 asystent-stażysta w Katedrze Zoologii
- 10.1997 – 09.2004 asystent w Katedrze Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa (w 2006 roku przekształcona na Katedrę Biotechnologii Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności)
10. 2004 – obecnie adiunkt w Katedrze Biotechnologii Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności
- 02.2014 – obecnie adiunkt (½ etatu) w Zakładzie Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego Instytutu Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN w Lublinie

a) Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Studia biologiczne rozpocząłem w 1991 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, zakończyłem je w 1996 roku uzyskaniem tytułu magistra biologii broniąc pracę magisterską pod tytułem: „Ekologia zachowań samic błotniaka stawowego w okresie rozrodu na torfowisku węglanowym pod Chełmem”. Pracę zawodową rozpocząłem w Katedrze Zoologii AR w Lublinie na stanowisku asystenta-stażysty (1.10.1996 r.), a następnie od 1.10.1997r. na stanowisku asystenta w Katedrze Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa. Moje pierwsze prace badawcze, a także pracę doktorską wykonywałem pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Zdzisława Targońskiego dotyczyły one wykorzystania amylolytycznych bakterii kwasu mlekowego (ang. ALAB) w konwersji surowców skrobiowych. Wraz z podjęciem nowej tematyki badawczej doskonaliłem swój warsztat naukowy oraz zdobywałem doświadczenie odbywając szereg szkoleń i staży naukowych w renomowanych uczelniach kraju: Gdańsk, Poznań. Wiosną 1998 roku odbyłem 2-miesięczny staż naukowy w Zakładzie Immunologii i

Mikrobiologii PAN w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Lucjana Jędrychowskiego. W latach 1998-2000 byłem jednym z głównych wykonawców projektu badawczego pt. „Wytwarzanie i charakterystyka amylaz oraz klonowanie genu amylolytycznego szczepu *Lactococcus lactis*”. Projekt dotyczył identyfikacji genu, poznania jego sekwencji oraz możliwości jego klonowania. Badania w ramach wspomnianego projektu prowadzone były we współpracy z Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, dzięki temu mogłem pracować w Zakładzie Biochemii Drobnoustrojów pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Bardowskiego. W latach 2001-2004 uczestniczyłem w kolejnym wspólnym projekcie badawczym z Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN pt: „Identyfikacja i analiza funkcjonalna genów regulujących katabolizm laktozy i skrobi u *Lactococcus lactis*”. Rezultaty w/w badań zostały zastrzeżone w 4 patentach polskich i 2 międzynarodowych:

- ✓ Sposób jednoczesnego wytwarzania biomasy bakteryjnej i kwasu mlekowego. Bardowski, J., Domań, M., Targoński, Z., **Waśko, A.**, PL 194469 B1.- Zgłosz. nr 346747 z dn. 2001.03.29; Opubl. 2007.06.29
- ✓ Sposób jednoczesnego wytwarzania biomasy bakteryjnej i enzymów amylolytycznych. Bardowski, J., Domań, M., Targoński, Z., **Waśko, A.**, PL 194465 B1.- Zgłosz. nr 346746 z dn. 2001.03.29; Opubl. 2007.06.29
- ✓ Gen plazmidowy, sposób otrzymywania tego genu, kodowany przez ten gen enzym amylolytyczny, oraz jego zastosowanie. Bardowski, J., Domań, M., Targoński, Z., **Waśko, A.**, Renault, P., Mondoloni, J., PL 194475 B1. – Zgłosz. nr 348789 z dn. 2001.07.19; Opubl. 2007.06.29
- ✓ Preparat probiotyczny dla zwierząt roślinożernych Bardowski, J., Domań, M., Targoński, Z., **Waśko, A.**, Renault, P., Mondoloni, J., PL 200549 B1. - Zgłosz. nr 354667 z dn. 2002.06.21; Opubl.2009.01.30
- ✓ A lactococcus gene, the amylolytic enzyme it encodes its application. Bardowski, J., Domań, M., Targoński, Z., **Waśko, A.**, Renault, P., Mondoloni, J., WO 2003/008587 A3. – Zgłosz. nr PCT/PL2002/000041 z dn. 2002.06.26, Opubl. 2003.01.30
- ✓ Plasmid gene, ways of acquiring this gene, the amylolytic enzyme it encodes and its application. Bardowski, J., Domań, M., Targoński, Z., **Waśko, A.**, Renault P., Mondoloni, J., US 7417135 B2. - Zgłosz. nr 10/488,645 z dn. 2002.06.26; Opubl. 2008.08.26

Moja praca doktorska związana była z tematyką badawczą, która bardzo ściśle wiązała się z realizowanymi w owym czasie grantami. Przeprowadzone badania dotyczyły

charakterystyki biochemicznej kompleksu enzymatycznego rozkładającego skrobię i wytwarzanego przez wyizolowany ze środowiska szczep *Lactococcus lactis* IBB 500 oraz jego transformanty genetyczne *Lactococcus lactis* IBB 502 i IBB 514. Opisany kompleks składał się z dwóch enzymów: α -amylazy hydrolizującej wiązania α -1,4- glikozydowe oraz pullulanazy hydrolizującej wiązania α -1,6-glikozydowe w skrobi. Poza charakterystyką tych enzymów celem mojej pracy doktorskiej było również biotechnologiczne wykorzystanie badanych szczepów do jednoczesnego wytwarzania kwasu L(+) mlekowego, enzymów amylolitycznych oraz biomasy bakteryjnej na różnych surowcach skrobiowych. W pierwszym etapie badań zoptymalizowano warunki hodowli szczepu natywnego oraz jego transformantów w celu wydajnej biosyntezy kompleksu enzymatycznego hydrolizującego skrobię, doświadczenia te zakończono hodowlami bakterii w warunkach kontrolowanych używając do tego celu bioreaktorów. Wykazano że utrzymanie pH na stałym poziomie równym 6,0 oraz mieszanie środowiska z szybkością 150 obr/min pozwalała na uzyskanie najwyższych aktywności kompleksu enzymatycznego po 12 godzinach hodowli fermentorowej i były to wartości wyższe w przedziale 23-54% (w zależności od szczepu) w porównaniu do hodowli w warunkach nieregulowanego odczynu środowiska. Na tym etapie badań stwierdzono, że transformanty genetyczne szczepu natywnego były znacznie bardziej wrażliwe na warunki hodowli i nawet ich niewielkie zmiany powodowały zahamowanie wytwarzania enzymów.

Kolejne badania zmierzały do rozdzielenia obu enzymów wchodzących w skład kompleksu oraz ich charakterystyki (zbadanie wpływu pH, temperatury oraz jonów metali na ich aktywność i stabilność oraz określenie specyficzności substratowej α -amylazy i pullulanazy). Do oczyszczenia badanych enzymów wykorzystano techniki chromatografii jonowymiennej, sączenia molekularnego oraz chromatooogniskowania. W wyniku rozdziałów chromatograficznych z powodzeniem rozdzielono oba enzymy i otrzymano je w formie wysokooczyszczonych preparatów, które scharakteryzowano od strony fizykochemicznej poprzez wyznaczenie ich masy cząsteczkowej, punktów izoelektrycznych, zawartości węglowodanów w cząsteczce, stałych kinetycznych oraz aktywności przy różnych wartościach pH i temperatury. Uzyskane preparaty enzymów *Lactococcus lactis* IBB 500 oraz jego transformantów genetycznych IBB 502 i IBB 514 wykorzystano do hydrolizy enzymatycznej skrobi przebiegającej w ustalonych wcześniej warunkach optymalnych. Stopień scukrzenia skrobi w przypadku zastosowanych kompleksów α -amylaz i pullulanaz mieścił się w przedziale 63,5- 69,2%. Analiza produktów końcowych hydrolizy skrobi

potwierdziła synergistyczne działanie obu enzymów, a obecność maltotriozy, maltotetraozy i glukozy była najprawdopodobniej przyczyną represji katabolicznej mającej wpływ na biosyntezę obu enzymów w hodowli bakterii. Końcowym etapem badań było praktyczne wykorzystanie natywnego szczepu *Lactococcus lactis* IBB 500 do syntezy kwasu mlekowego z surowców skrobiowych. Zaletą amylolytycznych bakterii mlekowych wykorzystywanych do tego celu jest brak konieczności stosowania dodatku preparatów enzymatycznych. Spośród różnych surowców skrobiowych zastosowanych w tym celu najlepsze wyniki uzyskano stosując mąkę żytnią w hodowlach okresowych ze stałą regulacją pH na poziomie 6,0. Wydajność fermentacji w takich warunkach wynosiła 82%, przy czym zdecydowana większość uzyskanego kwasu mlekowego była to fizjologiczna forma L(+).

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej były tematem 2 artykułów opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz 7 doniesień konferencyjnych:

- ✓ **Waśko, A.**, Polak-Berecka, M., Targoński, Z., 2010: A new protein of α -amylase activity from *Lactococcus lactis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(9), 1307-1313.
- ✓ **Waśko, A.**, Polak-Berecka, M., Targoński, Z., 2011: Purification and characterization of pullulanase from *Lactococcus lactis*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 41, 252-261.

Obrona dysertacji doktorskiej pt. „*Lactococcus lactis* IBB 500 – nowe źródło amylaz i pullulanazy” na podstawie której uzyskałem stopień naukowy doktora nauk biologicznych odbyła się na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w czerwcu 2004 roku. Rozprawa doktorska została wyróżniona nagrodą indywidualną II^o Rektora AR w Lublinie.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl siedmiu publikacji pod wspólnym tytułem:

Charakterystyka wybranych białek egzoproteomu oraz czynników wzrostu szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego to 7 oryginalnych prac eksperymentalnych:

1. **Waśko, A.**, Polak-Berecka, M., Kuzdraliński, A., Skrzypek, T., 2014: Variability of S-layer proteins in *Lactobacillus helveticus* strains. *Anaerobe*. 25, 53-60.
2. **Waśko, A.**, Szwajgier, D., Polak-Berecka, M., 2014: The role of ferulic acid esterase in the growth of *Lactobacillus helveticus* in the presence of phenolic acids and their derivatives. *European Food Research and Technology*. 238(2), 299-306.
3. **Waśko A.**, Polak-Berecka, M., Paduch, R., Józwiak, K., 2014: The effect of moonlighting protein on the adhesion and aggregation ability of *Lactobacillus helveticus*. *Anaerobe*. 30, 161-168.
4. **Waśko, A.**, Polak-Berecka, M., Gustaw, W., 2013: Increase viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* after osmotic stress. *Acta Alimentaria*. 42, 520-528.
5. **Waśko, A.**, Kieliszek, M., Targoński Z., 2012: Purification and characterization of a proteinase from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* OXY. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 42, 476-488.
6. **Waśko, A.**, Kordowska-Wiater, M., Podleśny, M., Polak-Berecka, M., Targoński, Z., Kubik-Komar, A., 2010: The Plackett-Burman design in optimization of media

components for biomass production of *Lactobacillus rhamnosus* OXY. *Acta Biologica Hungarica*. 61(3), 344-355.

7. **Waśko, A.**, Polak-Berecka, M., Kalita, M., 2012: Protein profiles from intact cells as a tool in *Bifidobacterium* characteristics. *Polish Journal of Microbiology*. 61(4), 305-310.

Łączny *impact factor* publikacji wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego zgodnie z rokiem opublikowania: **8,509**

Suma punktów za publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego zgodnie z wykazem MNiSW: **145 pkt**

b) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

WPROWADZENIE

Proteom to pełny zestaw białek ulegających w komórce ekspresji, a tym samym to wszystkie produkty translacji występujące w komórce. Analiza proteomu czy też jego części ma wyraźną przewagę nad profilowaniem transkrypcji ponieważ większość funkcji genów jest realizowana przez białka. W komórkach nie istnieje idealna korelacja pomiędzy mRNA a białkami. Dlatego też badania proteomiczne umożliwiają bezpośrednie zrozumienie ich funkcji komórkowych. Problematyka badawcza związana z kompleksową analizą białek komórkowych bakterii w badaniach naukowych obecna jest już od lat 90-tych XX wieku. Rozwój metod wysokowydajnego sekwencjonowania białek w oparciu o spektrometrię mas przyczynił się do opracowania kryteriów podziału proteomu bakterii. Wśród kilku różnych subproteomów wyróżniono również egzoproteom¹. Aktualne badania definiują egzoproteom jako białkowe produkty genów chromosomalnych transportowane przez błony cytoplazmatyczne komórki i zlokalizowane całkowicie lub częściowo na ich powierzchni, bądź wydzielane do środowiska, w którym są aktywne biologicznie.

¹ Greenbaum, D.; Luscombe, N.M.; Jansen, R.; Qian, J.; Gerstein, M. Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: 'oming in on function. *Genome Res*. **2001**, 11, 1463–1468.

W badaniach nad mikrobiomem różnych nisz ekologicznych człowieka (ang. Human Microbiome Project) mikrobiocenoza przewodu pokarmowego zawiera największą ilość całkowicie poznanych genomów bakterii (717 z 2674). Fakt ten wymownie świadczy o istotnej roli autochtonicznych bakterii dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Wśród tej grupy mikroorganizmów największe zainteresowanie naukowców od lat budzą bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Według standardów przyjętych przez WHO (Światową Organizację Zdrowia) około 15% znanych gatunków z rodzaju *Lactobacillus* i 30% gatunków z rodzaju *Bifidobacterium* zostało uznanych za bakterie probiotyczne, których spożywanie wywiera korzystny wpływ na organizm gospodarza. Z tego powodu niezwykle istotnym zagadnieniem jest poznanie mechanizmów aktywności fizjologicznej bakterii kwasu mlekowego, w tym szczepów probiotycznych. Podstawą tej aktywności jest poznanie funkcji biologicznej poszczególnych składników komórkowych bakterii, które wpływają na tak ważne procesy jak chociażby auto, koagregacja czy też adhezja do komórek nabłonka jelita. Aktualne wyniki badań publikowane w renomowanych czasopismach naukowych zwracają szczególną uwagę na właściwości powierzchni komórek bakterii mlekowych takie jak hydrofobowość, obecność kwasów tłuszczowych oraz białek. Szczegółowa analiza powierzchni komórki umożliwiła scharakteryzowanie struktur powierzchniowych oraz przypisanie im odpowiednich funkcji biologicznych. Jednym z elementów tych badań jest analiza egzoproteomu komórek bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Egzoproteom bakterii jelitowych został podzielony na dwie grupy białek: wydzielane na zewnątrz komórki oraz związane z ich powierzchnią. W pierwszej grupie białek można wyróżnić bakteriocyny oraz inne białka działające bójczo na pokrewne mikroorganizmy, enzymy oraz ich inhibitory, a także homologii białek powierzchniowych. Druga grupa białek jest zróżnicowana ze względu na sposób wiązania się z komórką, dlatego też cecha ta stała się podstawą podziału ich na oddzielne kategorie. Na powierzchni ściany komórkowej bakterii jelitowych zidentyfikowano szereg białek (I) zakotwiczonych w błonie cytoplazmatycznej za pośrednictwem N- lub C-końcowej domeny o właściwościach hydrofobowych. Białka tej kategorii są wydzielane na zewnątrz komórki przez system translokacji Sec, najczęściej posiadają peptyd sygnałowy, który może być odcinany w zależności od miejsca lokalizacji (C-koniec, Typ I, II), bądź też może pozostawać w strukturze białka (N-koniec) zakotwiczony w błonie cytoplazmatycznej. Dotychczas poznana rola tych białek to transport, metabolizm związany z powierzchnią komórki, przenoszenie sygnałów oraz modyfikacje białek. Lipoproteiny (II) to duża grupa białek zakotwiczonych w błonie komórkowej bakterii jelitowych i wchodzących w skład egzoproteomu. Białka te

transportowane są na zewnątrz komórki za pośrednictwem szlaku transportu białek Sec ich cechą wspólną jest obecność peptydu sygnałowego zawierającego charakterystyczne domeny typu N, H i C. Bardzo charakterystycznym motywem wchodzącym w skład domeny C jest motyw nazywany „lipobox” [L-(A/S)-(A/G)-C], który bierze bezpośredni udział w transporcie tej grupy białek. Stwierdzono, że lipoproteiny wiążą się z powierzchnią komórki dzięki wiązaniom kowalencyjnym, w których uczestniczą reszty cysteiny budujące „lipobox”. Lipoproteiny odpowiedzialne są za adhezję komórek, oporność na antybiotyki komórek, a także transport i fałdowanie białek oraz biorą udział w transporcie substratów za pośrednictwem ABC transporterów komórkowych. Jedną z najlepiej poznanych kategorii białek powierzchniowych bakterii jelitowych są białka swoiście rozpoznawane przez sortazę (III). Na swoim C-końcu zawierają one motyw LPXTG, ma on charakter wysoce konserwatywny w różnych białkach co pozwala na rozpoznawanie go i cięcie enzymatyczne przez zwykle jeden rodzaj sortaz (StrA) specyficznych gatunkowo. Mechanizm ten umożliwia rozcinanie wiązania peptydowego między resztami treoniny i glicyny w motywie LPXTG, a następnie białko przyłączane jest w sposób kowalencyjny do grup aminowych peptydoglikanu w ścianie komórkowej. Większość białek należąca do tej kategorii odpowiedzialna jest za procesy wiązania do kolagenu, aglutyniny i nabłonka jelita choć są wśród nich również enzymy. Ostatnią zdefiniowaną kategorią białek wchodzącą w skład egzoproteomu bakterii jelitowych są białka niekonwalencyjnie związane ze ścianą komórki i posiadające w swojej strukturze charakterystyczne domeny (IV). Domeny te zostały rozpoznane i zdeponowane w publicznej bazie danych Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) najważniejsze z nich to: LysM (Pfam PF01476), domena wiążąca cholinę (Pfam PF01473), domena wiążąca peptydoglikany (Pfam PF01471), SHL (Pfam PF00395). Białka tej grupy to głównie enzymy związane z powierzchnią komórki, ale także białka odpowiedzialne za interakcje komórki ze środowiskiem oraz innymi organizmami. Na szczególną uwagę w tej grupie zasługują białka powierzchniowe S (S-layer) stanowiącą najbardziej zewnętrzną warstwę komórek wielu gatunków z rodzaju *Lactobacillus*. Białka te to glikoproteiny o masach w przedziale 25-71 kDa, o wysokim punkcie izoelektrycznym 9-10,3 nadającym im charakter zasadowy z charakterystyczną krystaliczną strukturą. Ze względu na swoje właściwości są one przedmiotem wielu badań aplikacyjnych w takich dziedzinach jak nanobiotechnologia czy biofarmacja.

Poza opisanymi powyżej białkami stanowiącymi egzoproteom bakterii jelitowych ostatnie lata przyniosły informacje na temat białek „moonlighting”², które zidentyfikowano na powierzchni komórek bakterii jelitowych. Białka te pełnią więcej niż jedną funkcję komórkową i związane są z takimi procesami komórkowymi jak glikoliza, biosynteza białek oraz udział w ich fałdowaniu czy stabilizacją struktury DNA, natomiast na powierzchni komórki pełnią funkcję adhezyn. Najbardziej znane z nich to dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), enolza, fosfofruktokinaza, GroEL, DnaK i wiele innych. Cechą łączącą wszystkie poznane dotychczas białka wielofunkcyjne „moonlighting” jest brak w swojej strukturze domen odpowiedzialnych za transport na zewnątrz komórki i kotwiczenie białka na jej powierzchni. Jak do tej pory wyjaśnienie tego mechanizmu jest nie znane, wydaje się że najbardziej prawdopodobną hipotezą jest uwalnianie białek „moonlighting” z komórek uszkodzonych i ich wtórne wiązanie na powierzchni komórek żywych. Należy zwrócić uwagę że bez rozwoju technik badawczych gel-based (2DE) i gel-free opartych o spektrometrię mas możliwości badania egzoproteomu były by ograniczone albo wręcz niemożliwe.

CEL BADAŃ

Celem badań była analiza biochemiczna i strukturalna białek wchodzących w skład egzoproteomu wybranych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w powiązaniu z ich funkcją biologiczną. Ponadto, w ramach przeprowadzonego cyklu doświadczeń podjęto próbę wykorzystania białek egzoproteomu do celów biotechnologicznych.

OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

Ze wszystkich białek tworzących egzoproteom bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w największej ilości występują w komórkach białka powierzchniowe S, ich ilość może stanowić

² Kainulainen, V.; Korhonen T.,K. Dancing to Another Tune—Adhesive Moonlighting Proteins in Bacteria. *Biology*. **2014**, 3, 178-204.

nawet do 20% wszystkich białek komórkowych. Tak wydajna synteza tej frakcji białek komórkowych możliwa jest dzięki połączeniu bardzo silnego promotora genów kodujących te białka z wysoce stabilnym mRNA. Badania morfogenezy warstwy S *in vivo* wykazały, że białka są syntezowane z wysoką szybkością rzędu 500 jednostek na sekundę, następnie transportowane na powierzchnię komórki i wbudowywane do istniejącej wcześniej sieci. Badania regulacji genetycznej biosyntezy białek powierzchniowych S u różnych gatunków bakterii wykazały, że ten sam gatunek może wytwarzać różne białka powierzchniowe. Różnicowanie białek powierzchniowych może być ważną strategią ewolucyjną bakterii w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Zmienność ewolucyjna doprowadziła do powstania nowych typów białek powierzchniowych – poprzez ekspresję różnych genów lub przez rekombinację fragmentu sekwencji kodującej białka S. Powyższe aspekty badań oraz możliwość wykorzystania ich w biotechnologii, skłoniły mnie do badań nad białkami powierzchniowymi S bakterii *Lactobacillus helveticus* pochodzących z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów z siedzibą we Wrocławiu i wyizolowanych z tej samej niszy ekologicznej.

Pierwszy etap badań dotyczył identyfikacji białek powierzchniowych u 11 szczepów bakterii *Lactobacillus helveticus* zarówno na poziomie fenotypowym jak i identyfikacji genów kodujących powyższe białka. Identyfikację białek powierzchniowych S przeprowadzono metodami elektroforetycznymi, zarówno w przypadku całych komórek bakterii, jak i po ich izolacji przy pomocy chlorku litu jako czynnika chaotropowego, który poprzez rozerwanie wiązań wodorowych i reakcje podstawiania kationów Li⁺ wydziela białka z powierzchni komórek [*Anaerobe*, 2014]. Dodatkowo wykonano zdjęcia komórek *L. helveticus* przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego, które bardzo wyraźnie wykazały obecność trójwarstwowej struktury ściany komórkowej wraz z warstwą białek S. Równolegle wykonano analizy obecności genów kodujących białka powierzchniowe S w badanych szczepach wraz z ich sekwencjonowaniem. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że pięć szczepów, spośród wszystkich przebadanych i wyizolowanych z produktów mlecznych, nie wytwarzało białek powierzchniowych S. Informacja ta jest niezwykle wartościowa z uwagi na fakt, że wielu autorów używało genów kodujących białka powierzchniowe S jako markerów genetycznych charakterystycznych dla gatunku *Lactobacillus helveticus* oraz zaliczało je do genów podstawowego metabolizmu. Z drugiej strony uzyskane wyniki sugerują, że warstwa S nie jest niezbędna do przeżycia komórek bakterii w środowisku o relatywnie niskim pH i raczej stanowi cechę adaptacyjną pozwalającą na bytowanie w określonej mikroniszy ekologicznej. W kolejnym etapie badań wyizolowane i rozdzielone na żelu białka poddano sekwencjonowaniu metodą LC-MS/MS, a

także przeprowadzono western-blotting wraz z degradacją Edmana. W jej wyniku stwierdzono, że białka powierzchniowe S wyizolowane z polskich szczepów *L. helveticus* miały masy cząsteczkowe w przedziale 42-43,8 kDa oraz wysokie wartości pI 9,1-9,3. Jednocześnie przeprowadzono analizę modyfikacji potranslacyjnych wyizolowanych białek powierzchniowych, która wykazała że są one glikoproteinami. Analiza porównawcza sekwencji wszystkich wyizolowanych białek powierzchniowych S wykazała podobieństwo na poziomie 95-97%. Pomimo tego analiza bioinformatyczna badanych sekwencji białek zgrupowała je w dwie odrębne gałęzie filogenetyczne. Pierwszą tworzą białka wytwarzane przez szczepy *L. helveticus* 80, 141, B734, i T159 drugą natomiast białka szczepów T104 i T105. U wszystkich badanych szczepów stwierdzono obecność peptydu sygnałowego, aczkolwiek w białkach izolowanych ze szczepów 80, 141, B734 składał się on z 18 aminokwasów, a w białkach pochodzących ze szczepów T104, T105 i B734 z 30 aminokwasów. Na podstawie sekwencji białek powierzchniowych S wyizolowanych z sześciu analizowanych szczepów *L. helveticus* przewidziano obecność następujących struktur II rzędowych: α -helisy 12,8-25,05%, β -kartki 25,2-30,4%, losowych zwojów 46,9-68%. Szczegółowa analiza lokalizacji powyższych struktur II rzędowych wykazała wysokie podobieństwo szczepów T104, T105 i T159. Posiadły one 3 wyraźne regiony strukturalne α -helisy z czego pierwszy obejmował 16 aminokwasowy fragment peptydu sygnałowego, pozostałe dwa znajdowały się w centralnej części białek oraz jedną strukturę wydłużonych nici (ang. extended strand) związanych z C-końcem białka. W przypadku szczepów 80, 141 i B734 wykazano brak struktury α -helisy w peptydzie sygnałowym przy jednoczesnej zwiększonej ilości występowania tych struktur w łańcuchach analizowanych białek powierzchniowych S. Jednocześnie stwierdzono zwiększony udział procentowy losowych zwojów w strukturze II-rzędowej białek pochodzących z powyższych szczepów. Wykonano również analizę filogenetyczną w oparciu o sekwencje wyizolowanych białek powierzchniowych S w obrębie rodzaju *Lactobacillus*. Uzyskane wyniki potwierdziły rezultaty poprzednich eksperymentów mówiące o tym, że analizowane białka powierzchniowe S należą do dwóch grup sekwencji i zajmują inne miejsce na drzewie filogenetycznym. Pierwsza z nich (białka szczepów 80, 141, B734 i T159) wykazywała wysoki stopień podobieństwa (83-86%) do białka powierzchniowego kolekcyjnego szczepu *L. helveticus* R0052, natomiast druga grupa (białka szczepów T104 i T105) była filogenetycznie bliska (w 63%) białku powierzchniowemu S, izolowanemu ze szczepu *L. helveticus* DSM 20075. Należy zwrócić uwagę, że pomimo wysokiego poziomu homologii (85%) genów *slpH* kodujących analizowane białka S w polskich szczepach *L. helveticus*

charakteryzowały się one heterogenicznością sekwencji nukleotydowych. Badania te potwierdzają, że pomimo tego, iż badane szczepy wyizolowane zostały z tej samej niszy ekologicznej, to presja selekcyjna środowiska spowodowała zmienność w genach kodujących białka powierzchniowe S, co jest również widoczne w sekwencji I i II rzędowej białek.

We wstępnych doświadczeniach dotyczących zmienności w budowie białek powierzchniowych S u bakterii *L. helveticus* wykazano, że nie wszystkie szczepy wytwarzają powyższe struktury. Wiedza ta skłoniła nas do kontynuowania badań dotyczących roli fizjologicznej warstwy S u bakterii mlekowych. Warto zwrócić uwagę, że dotychczas w literaturze światowej nie opisano stabilnych mutantów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pozbawionych białek powierzchniowych S. Dlatego też możliwość wykonania badań na natywnych szczepach wytwarzających i pozbawionych tej struktury była szczególnie interesująca zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych. Z uwagi na duży udział w diecie człowieka składników zawierających kwasy fenolowe i ich pochodne, celem było zbadanie wpływu tych związków na wzrost wybranych szczepów bakterie *L. helveticus* [*European Food Research and Technology, 2013*]. W tym celu 38 strukturalnie różnych pochodnych kwasu benzoowego i cynamonowego użyto jako czynnika hamującego wzrost szczepów T159 (wytwarzających warstwę S) i T103 (pozbawionych białek S). W przyjętym modelu badawczym założono, zgodnie z danymi literaturowymi, ochronne działanie białek S przed negatywnym działaniem czynników środowiskowych takich jak m.in. wysokie stężenia kwasów fenolowych i ich pochodnych. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych na tym etapie pokazały, że zarówno wartości MIC jak i MBC w przypadku szczepu T103 były znacznie wyższe, co wskazuje na to, iż brak białek powierzchniowych S nie wpływa na obniżenie wrażliwości komórek na obecność w środowisku kwasów fenolowych i ich prostych pochodnych. W obu badanych szczepach wykazano prawidłowość związaną z tym, że kwas cynamonowy i jego pochodne silniej hamowały wzrost obu badanych szczepów niż pochodne kwasu benzoowego. Można to wytłumaczyć obecnością w ich strukturze bocznych łańcuchów propionowych nadających lipofilowy charakter tym związkom, tym samym ułatwiając ich wnikanie do komórki. Wykazano również bezpośredni związek pomiędzy obecnością grup funkcyjnych i ich rozmieszczeniem w strukturze pochodnych kwasów fenolowych, a ich aktywnością antymikrobiologiczną. Szczególnie istotna jest obecność grup OH i OCH₃ w pozycji *orto* jako podstawników w kwasach fenolowych. Opisane wyniki okazały się zaskakujące w stosunku do pierwotnych oczekiwań, dlatego też w kolejnych eksperymentach podjęto próbę wyjaśnienia zjawiska zwiększonej wrażliwości bakterii wytwarzających białka powierzchniowe S na pochodne kwasów fenolowych. Z uwagi

na fakt, że warstwa S pokrywa bardzo szczelnie całą powierzchnię komórek szczepów bakterii ją wytwarzających, to wpływa ona jednocześnie na właściwości fizykochemiczne całych komórek. Wykazano, że silnie zasadowa natura białek powierzchniowych S wpływa na wysoce hydrofobowe właściwości komórek szczepu T159. Tym samym związki fenolowe efektywniej wnikają w jej warstwę, wiążąc się z komórką i powodują jej uszkodzenie, zaburzając jednocześnie procesy transportu oraz niektóre szlaki komórkowe. Dodatkowo, analiza aktywności enzymatycznych obu badanych szczepów wykazała, że szczep T159 wytwarzał nie tylko białka powierzchniowe S, ale również esterazę kwasów fenolowych (FAE). Aktywność tego enzymu stwierdzono zarówno na poziomie komórkowym jak i w płynach pochodzących niezależnie od wieku hodowli, co sugeruje jego konstytutywny charakter biosyntezy. Związek pomiędzy hamowaniem wzrostu bakterii przez estry kwasów fenolowych, a obecnością esterazy w komórkach bakterii jest bardzo silny i wiąże się z działaniem enzymu, którego produktem są wolne kwasy fenolowe charakteryzujące się znacznie wyższą toksycznością niż ich estry. Obecność enzymu zarówno wewnątrz komórki jak i w jej otoczeniu powoduje synergistyczne działanie wolnych kwasów fenolowych na komórki bakterii. Należy pamiętać, że analizowany model biologiczny jest niezwykle złożony i nie da się w sposób jednoznaczny wykazać zależności pomiędzy metabolizowaniem, wiązaniem oraz transportem kwasów fenolowych przez poszczególne struktury komórkowe. Warto zauważyć, że podjęta próba określenia roli struktur komórkowych wnosi nowe spojrzenie na biologiczną transformację kwasów fenolowych przez bakterie jelitowe.

Kolejny cykl podjętych eksperymentów dotyczył zagadnień związanych z adhezją komórek bakterii gatunku *Lactobacillus helveticus* do nabłonka jelita. Modelem badawczym użytym w tych doświadczeniach były opisane w poprzedniej pracy szczepy wytwarzające warstwę białek S na powierzchni komórki i bakterie pozbawione tej struktury [*Anaerobe*, **30**, **161-168**]. Powodem podjęcia tej tematyki była próba odpowiedzi na pytanie o rolę poszczególnych struktur powierzchniowych w procesie adhezji. Istnieją doniesienia, że jednym z najważniejszych białek adhezyjnych są właśnie białka powierzchniowe S, dlatego też weryfikacja tej hipotezy w odniesieniu do nowo wyizolowanych szczepów jako bakterii o potencjalnie probiotycznym była niezwykle istotna. Mając na uwadze, że w mechanizmie adhezji komórek bakterii do ścian jelita dużą rolę odgrywają również inne białka o charakterze adhezyn, pierwszym krokiem w podjętych badaniach była analiza ekspresji wszystkich białek powierzchniowych w obu badanych szczepach. Do tego celu wykorzystano, po raz pierwszy w tego typu badaniach, metodę label-free opartą na identyfikacji oraz analizie ilościowej białek przy pomocy LC-MS/MS w dwóch

porównywanych próbkach. Dzięki tej metodzie zidentyfikowano 139 białek zlokalizowanych na powierzchni komórek w obu szczepach. Analiza bioinformatyczna tych białek pokazała, że są to białka cytoplazmatyczne, błonowe, związane ze ścianą komórkową oraz zewnątrzkomórkowe. Spośród puli opisanych białek ekspresja 25-ciu z nich była wyższa w szczepie T159 z czego 8 z nich zostało zidentyfikowanych jako białka „moonlighting”. Definicja „moonlighting” ściśle określa jakie cechy powinno posiadać białko zaliczanej do tej grupy. Przede wszystkim musi mieć charakter autonomiczny, gdzie poszczególne domeny nie pełnią oddzielnych funkcji tylko działają jako całość. Ponadto funkcje jakie pełni białko nie mogą wykluczać się nawzajem. W badanym szczepie były to następujące grupy białek: enzymy szlaku glikolitycznego (enolaza, fosfogliceromutaza, kinaza fosfoglicerynianowa), białka związane z procesami transportu i transkrypcji (białko ABC transporterowe wiążące substraty, 30S rybosomalne białko S1, ET-Ts) oraz molekularne cheperony (GroEL i DnaK). Tak więc w przypadku szczepu wytwarzającego warstwę S (T159) stwierdzono również podwyższoną ekspresję białek wielofunkcyjnych, w tym przypadku o dodatkowej funkcji jako czynników adhezyjnych. Należy zwrócić uwagę, że prace te są pierwszymi opisanymi w literaturze światowej badaniami na temat tej grupy białek u *Lactobacillus helveticus*. Równolegle z badaniami proteomicznymi prowadzono eksperymenty wiązania komórek szczepów T159 i T103 do komórek nabłonka jelita linii HT-29. Wyniki potwierdziły zdecydowanie większą adhezję szczepu T159, współczynnik adhezji tego szczepu był na poziomie $A_x=15,8$ gdy w przypadku szczepu T103 osiągał zaledwie $A_x=1,82$. Wraz z doświadczeniami na tkance jelita prowadzono badania związane z autoagregacją i kongregacją szczepów T159 i T103 do innych gatunków bakterii G(+) i G(-). Eksperymenty te wykonano w dwóch wariantach, tj. uprzednio izolując z bakterii białka powierzchniowe przy pomocy chlorku litu i pozostawiając komórki z nieusuniętymi białkami powierzchniowymi. W obu przypadkach szczep T159 wykazywał znacznie wyższy odsetek komórek tworzących agregaty w obrębie swojego gatunku jak i gatunków o charakterze chorobotwórczym np. *E. coli*, *S. ureus*. Cecha ta jest niezwykle istotna z uwagi na fakt, że jest to jeden z elementów kwalifikujących szczepy bakterii mlekowych do szczepów potencjalnie probiotycznych. Jednocześnie eksperyment ten pokazał, że usunięcie białek powierzchniowych z komórek redukuje ich zdolności autoagregacji od 50 do 80%. Rolę białek powierzchniowych w tym procesie szczególnie dobrze widać w przypadku szczepu T103, którego komórki nie produkując białek S i posiadając obniżoną ekspresję białek adhezyjnych na powierzchni komórkowej tworzą agregaty zdecydowanie słabiej po ich usunięciu niż w przypadku szczepu T159. Dla potwierdzenia opisanego powyżej mechanizmu

wykorzystano w dalszych badaniach zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego pozwalające na ocenę powierzchni komórek badanych szczepów. Zdjęcia obrazowały złożoność strukturalną powierzchni bakterii, tzw. „profile width” pokazał, że bezwzględna wartość tego parametru w przypadku szczepu T159 wynosiła 1,0-4,9 μm podczas gdy w przypadku szczepu T103 jedynie 1,0-1,7 μm . Oczywiście wyniki te nie wskazują w sposób jednoznaczny, że różnice te wynikały z obecności białek na powierzchni komórek bakterii, dlatego też kolejnym krokiem było wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni FT-IR w analizie badanych szczepów. Widma uzyskane z tych analiz i nałożone na siebie nie pozostawiały wątpliwości w określeniu jakie struktury powierzchni komórek decydują o różnicach w ich wyglądzie na zdjęciach mikroskopowych. Zauważalne różnice pomiędzy szczepami widoczne były w regionie drgań 1200-1800 cm^{-1} , który to odpowiada wiązaniom peptydowym w peptydach. W kontekście powyższych analiz charakteryzujących struktury biologiczne powierzchni komórek szczepów *L. helveticus* zbadano ich wpływ na hydrofobowość/hydrofilowość komórek wykorzystując test MATS. W obu przypadkach adhezja komórek do rozpuszczalników organicznych takich jak: chloroform, octan etylu i heksadekan wskazywała na ich hydrofobową naturę. Z drugiej jednak strony wartości przylegania komórek do poszczególnych rozpuszczalników świadczą o tym, że w przypadku szczepu T103 komórki wykazują również cechy hydrofilowe. Podsumowując ten etap badań należy podkreślić, że mechanizm wiązania komórek *L. helveticus* do tkanki jelita jest w dużym stopniu uzależniony od obecności na ich powierzchni struktur białkowych o charakterystyce czynników adhezyjnych (białka S i „moonlighting”). Struktury te jednocześnie wpływają na właściwości fizyczne komórek bakterii ułatwiające interakcje ze środowiskiem w procesach adhezji i agregacji. Interesującą obserwacją jest fakt, że białka wielofunkcyjne, które same w sobie nie posiadają domen wiążących je z komórką mogą należeć do tzw. białek związanych z warstwą S (ang. S-layer associated proteins, SLAPs).

Opisane powyżej eksperymenty o charakterze badań podstawowych skłoniły mnie do wykorzystania tej wiedzy w sposób praktyczny w biotechnologii mikroorganizmów. Jako model eksperymentalny wykorzystano szczep *Lactobacillus rhamnosus* OXY, będący probiotycznym komponentem powszechnie stosowanego na rynku polskim suplementu diety Lakcid[®]. Produkt ten zawiera zliofilizowane komórki zawieszone w medium protekcyjnym. Głównym problemem przygotowania tego rodzaju preparatów jest duży spadek przeżywalności komórek bakterii w wyniku warunków stresowych, które mają miejsce podczas suszenia sublimacyjnego. Z tego też powodu przeprowadzone badania miały na celu takie przygotowanie komórek do procesu liofilizacji by zwiększyć ich przeżywalność.

Jednocześnie przeprowadzono analizę proteomiczną komórek bakterii w powiązaniu z czynnikiem zwiększającym przeżywalność komórek bakterii [*Acta Alimentaria*, 2013]. W opisanych badaniach przeanalizowano wpływ szoku osmotycznego na przeżywalność komórek bakterii po procesie liofilizacji. Zastosowanie tego czynnika w procesie hodowli i przygotowania bakterii do liofilizacji jest relatywnie proste i mało kosztowne w zastosowaniu. Przeprowadzone eksperymenty jednoznacznie wykazały, że analizowany szczep *L. rhamnosus* OXY charakteryzuje się wysoką tolerancją na stężenia chlorku sodu w zakresie 0,2-0,8 M. Cecha ta jest specyficzna gatunkowo, a wpływ na nią ma wysoki turgor wewnątrzkomórkowy ($\Delta P > 1$ M jonów potasu), skład kwasów tłuszczowych błony komórkowej i jej stabilność, obecność ABC transporterów błonowych transportujących związki osmotycznie czynne. Cecha ta jest korzystna z punktu widzenia przemysłowego wykorzystania badanego szczepu, ponieważ jednocześnie wskazuje na jego wyższą tolerancję na sole kwasów żółciowych obecne w ludzkim przewodzie pokarmowym. Dalszy etap eksperymentów dotyczył liofilizacji komórek bakterii w skali laboratoryjnej po szoku osmotycznym przy różnych stężeniach NaCl. Wyniki uzyskane wykazały, że w przypadku stężenia na poziomie 0,5 M NaCl przeżywalność komórek *L. rhamnosus* OXY wzrastała o 27% w stosunku do kontroli. Jednocześnie zwiększenie czynnika wywołującego warunki stresowe do poziomu 0,8 M spowodowało spadek przeżywalności komórek o około 40% w stosunku do stężenia 0,5 M i 15% w stosunku do kontroli. Wraz z badaniami mikrobiologicznymi wykonano również analizy proteomiczne, wyizolowano frakcje białek komórkowych z bakterii oczyszczono je i poddano elektroforezie dwuwymiarowej (2DE). Analiza spotów białkowych przy użyciu programu PDQuest pozwoliła na identyfikację białek szoku występujących w komórkach *L. rhamnosus* OXY. Stwierdzono, obecność takich białek szoku jak GroEL, GroES i DnaK, które jako białka wielofunkcyjne mają potwierdzony wpływ na stabilność mRNA, fałdowanie białek cytoplazmatycznych oraz przywracanie struktur aktywnych biologicznie białkom zdenaturowanym. Ponadto wykryto takie cytoplazmatyczne białka opiekuńcze jak: ClpB, TF, Pst1, HPr i L11, ekspresja tych białek w komórce wzrasta po działaniu czynników stresowych. Ich funkcja natomiast wiąże się nie tylko z kontrolą prawidłowego fałdowania powstających polipeptydów, ale także z transportem białek przez błony lub ich ponownym fałdowaniem i rozfałdowywaniem. Podsumowując ten cykl eksperymentów można stwierdzić, że zastosowana metoda przygotowania komórek bakterii do procesu suszenia sublimacyjnego efektywnie podniosła przeżywalność komórek bakterii i przyczynia się do zwiększenia wydajności procesu biotechnologicznego. Warto zwrócić uwagę, że indukowana ekspresja białek szoku to

nie tylko podniesienie przeżywalności komórek podczas liofilizacji ale również zwiększenie ich szansy na przeżycie w ludzkim przewodzie pokarmowym.

Kolejnym etapem badań przeprowadzonych w ramach zgłaszanego osiągnięcia naukowego była charakterystyka biochemiczna proteiny związanej z powierzchnią komórki pochodzącej z *L. rhamnosus* OXY oraz ocena jej potencjalnego wykorzystania w przemyśle mleczarskim [*Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2012*]. Należy zwrócić uwagę, że w przypadku szczepów probiotycznych obecność proteinaz związanych z powierzchnią komórki ułatwia komórkom proces adhezji do nabłonka jelita, a tym samym wpływa na przeżywalność drobnoustrojów w układzie pokarmowym. W wyniku dwustopniowej procedury oczyszczania proteiny *L. rhamnosus* OXY (chromatografia jonowymienna, sączenie molekularne) otrzymano homogeniczne białko o masie cząsteczkowej 60 kDa należące do II typu proteinaz o małych masach cząsteczkowych wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Podstawowe parametry biochemiczne oczyszczonego enzymu wykazywały, że jest on typową proteinazą serynową typu P_I w pierwszej kolejności rozkładającą enzymatycznie β -kazeinę. Optymalne wartości pH i temperatury dla jego działania, wyniosły odpowiednio 7,0 i 40° C, enzym był stabilny termicznie w powyższych warunkach przez 2 godziny. Aktywność enzymatyczna proteiny była stymulowana obecnością jonów Mg²⁺ i Ca²⁺, natomiast intensywnie hamowana przez jony Fe²⁺, Zn²⁺ i Cu²⁺, które wiązały się najprawdopodobniej z centrum aktywnym enzymu. Dodatkowo wykazano, że aktywność oczyszczonego enzymu niemal całkowicie hamowana była przez zewnątrzkomórkowe chylaty jonów wapnia (EDTA, DTT i L-cysteinę) co wskazuje na to, że struktura przestrzenna enzymu stabilizowana jest obecnością powyższych jonów. Oczyszczony enzym hamowany był przez nieodwracalnie wiążące się inhibitory aktywności specyficzne dla proteinaz serynowych. Równolegle zidentyfikowano obecność genu *prtR2* kodującego proteinazę *L. rhamnosus* OXY w DNA chromosomalnym tego szczepu. Zaprojektowane startery użyte do identyfikacji genu kodującego analizowany enzym zlokalizowane były we fragmentach kodujących domenę H i domenę katalityczną.

Z uwagi na fakt, że w obu opisanych przykładach praktycznego zastosowania składników egzoproteomu bakterii mlekowych podstawowe znaczenia ma możliwość hodowli dużej ilości biomasy komórek bakterii podjęto prace związane z optymalizacją wytwarzania biomasy *L. rhamnosus* OXY metodą odpowiedzi płaszczyzn RSM (ang. *Response Surface Method*). Zastosowana metoda optymalizacji to połączenie technik matematycznych i statystycznych, które pozwalają na ocenę wpływu wielu czynników na badane zjawisko wraz z określeniem interakcji jakim te czynniki podlegają [*Acta Biologica Hungarica,*

2010]. Jednocześnie metoda ta pozwala na precyzyjne wyznaczenie optymalnych parametrów procesu biotechnologicznego, spełniających założone na wstępie kryteria. Jako pierwszy element procesu optymalizacji wytwarzania biomasy komórkowej *L. rhamnosus* OXY dokonano wyboru istotności czynników wchodzących w skład medium hodowlanego zgodnie z macierzą Placketta-Burmana. Niezwykle interesującym wynikiem uzyskanym w tych eksperymentach była informacja na temat najwydajniejszego źródła węgla wykorzystywanego przez badany szczep. Źródłem tym okazała się glukoza i pirogronian sodu o łącznym stężeniu 2% (stosunek odpowiednio 4:1). Stosując wymienione źródło węgla zaobserwowano klasyczną dwufazową krzywą wzrostu (diauksja), która jednocześnie pozwalała na zwiększenie biomasy komórek badanego szczepu. Dzięki zastosowaniu metody Placketta-Burmana możliwe było również ograniczenie ilości składników podłoża hodowlanego koniecznych do efektywnego wzrostu bakterii do ekstraktu mięsnego i wybranych organicznych i nieorganicznych soli. W celu weryfikacji uzyskanych wyników wykonano analizę statystyczną metodą regresji wielokrotnej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że modelem najlepiej dopasowanym do danych doświadczalnych był zredukowany model kwadratowy, dla którego $p < 0,01$, a wielkość poprawionego współczynnika determinacji Adj. – R^2 wynosiła 0,86. Opracowany skład podłoża hodowlanego w wyniku powyższych eksperymentów wykorzystano do zoptymalizowania warunków hodowli w bioreaktorze. Stwierdzono, że składniki pożywki hodowlanej (glukoza 12,38 g/l; pirogronian 3,15 g/l; ekstrakt mięsny 4,08 g/l, fosforan potasu 1,46 g/l, octan sodu 3,65 g/l i cytrynian amonu 1,4,6 g/l) pH na stałym poziomie 5,5 oraz temperatura 37°C pozwalają na uzyskanie maksymalnej ilości biomasy komórek na poziomie 5,1 g/l po czasie 20 godzin. Jednocześnie ocena kosztów wytwarzania tej ilości komórek bakterii jest najniższa z opisanych dotychczas w literaturze światowej i kształtuje się na poziomie 1€ /g suchej masy komórek bakterii.

Praktyczne wykorzystanie składników egzoproteomu komórek bakterii to również możliwość zastosowania białek powierzchniowych do identyfikacji gatunkowej bakterii jelitowych. Z uwagi na to, że spośród ponad 30 gatunków i podgatunków bifidobakterii tylko niewielka część posiada w pełni zsekwencjonowane genomy, aspekt ten zasługuje na szczególną uwagę w obrębie rodzaju *Bifidobacterium*. Dodatkowo analiza genomów tych gatunków wykazała bardzo wysokie podobieństwo, na poziomie 99%, dlatego też genetyczna identyfikacja gatunków w obrębie rodzaju oparta na analizie DNA jest skomplikowana. Mając powyższe na uwadze wykonano analizę polimorfizmu probiotycznych gatunków *Bifidobacterium* w oparciu o białka związane z powierzchnią komórki [*Polish Journal of*

Microbiology, 2012]. Jako model badawczy wykorzystano pięć uznanych za probiotyczne gatunki bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, z których wyizolowano białka związane z powierzchnią komórki a następnie wykonano elektroforezę SDS-PAGE, 2DE, analizę skupień (UPGMA) oraz sekwencjonowanie białek z wykorzystaniem LC-MS/MS. Wyniki uzyskane z opisanych analiz bardzo wyraźnie pokazały, że można wykazać polimorfizm międzygatunkowy w obrębie rodzaju *Bifidobacterium* wykorzystując białka związane z powierzchnią komórek. Co więcej jest on skorelowany z analogicznymi badaniami opartymi na analizie kwasów nukleinowych. Równoległe badania tego samego materiału za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej wykazały, że maksymalnie 41% wszystkich zidentyfikowanych białek powierzchni komórek pochodzących z różnych gatunków były białkami o tych samych masach cząsteczkowych i punktach izoelektrycznych. Daje to duże możliwości do identyfikacji markerów białkowych znajdujących się na powierzchni komórek różnych gatunków z rodzaju *Bifidobacterium*, które mogą być pomocne w identyfikacji gatunkowej. Dla potwierdzenia powyższej hipotezy poddano sekwencjonowaniu białka charakterystyczne dla badanych gatunków. Efektem tego były wyniki świadczące, że również wśród różnych gatunków bifidobakterii obecne są na ich powierzchni komórek białka o charakterystyce białek multifunkcyjnych. Należy podkreślić, że to podejście może w przyszłości być dodatkowym narzędziem w identyfikacji gatunkowej mikroorganizmów jelitowych, szczególnie przy wykorzystaniu spektrometrii mas z detekcją czasu przelotu (MALDI-TOF).

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* bytując w ludzkim przewodzie pokarmowym stanowią naturalną mikroflorę jelit i dzięki swojej obecności korzystnie wpływają na ludzki organizm. Białka wchodzące w skład egzoproteomów bakterii jelitowych mają duże znaczenie zarówno w funkcjonowaniu komórek w przewodzie pokarmowym jak również coraz częściej są wykorzystywane do celów biotechnologicznych. Białka te wykazują właściwości adhezyjne, immunomodulacyjne oraz hamujące aktywność mikroflory patogennej, co predestynuje je do wykorzystania jako elementy doustnych szczepionek o cechach terapeutycznych i zapobiegających infekcjom układu pokarmowego. Nie należy również zapominać, że poszczególne składniki egzoproteomu, takie jak białka powierzchniowe S, to również interesujący przedmiot badań w nanotechnologii. Przykładem mogą być liposomy konstruowane w oparciu o powyższe struktury i wykorzystywane jako inteligentne systemy transportu leków, białka fuzyjne służące do immunizowania ludzi i zwierząt, sygnały ekspresji / wydzielania w heterologicznej ekspresji genu, membrany

ultrafiltracyjne czy też matryce do immobilizacji cząstek aktywnych. Wydaje się więc, że badania na temat składników egzoproteomów bakterii jelitowych leżą u podstaw zrozumienia ich interakcji z innymi mikroorganizmami oraz nabłonkiem ludzkiego przewodu pokarmowego i stanowią obiecującą perspektywę zarówno dla mikrobiologii jak i biotechnologii.

Najważniejsze wyniki badań związane z opisanym powyżej nurtem badawczym, zawarte w monotematycznym cyklu 7 oryginalnych prac eksperymentalnych:

- ✓ wyizolowanie i scharakteryzowanie struktury I, II-rzędowej oraz właściwości fizykochemicznych 6 białek powierzchniowych S wyizolowanych z polskich szczepów *Lactobacillus helveticus*. Ponadto wykazanie ich pokrewieństwa filogenetycznego do innych białek S w obrębie rodzaju *Lactobacillus*, a także stwierdzenie że ich obecność nie jest konieczna do przeżycia różnych szczepów bakterii *Lactobacillus helveticus* w konkretnej niszy ekologicznej,
- ✓ wyjaśnienie roli warstwy powierzchniowej S w komórkach bakterii *Lactobacillus helveticus* w środowisku zawierającym 38 strukturalnie zróżnicowanych pochodnych kwasów fenolowych oraz ocena ich aktywności antymikrobiologicznej w stosunku do analizowanych bakterii w badaniach *in vitro*,
- ✓ wykorzystanie po raz pierwszy do oceny ekspresji białek „moonlighting” metody label-free oraz określenie ich wpływu na proces adhezji do tkanki jelita w komórkach szczepów *Lactobacillus helveticus*,
- ✓ opracowanie wydajnej metody przygotowania komórek bakterii z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* do procesu suszenia sublimacyjnego i wykazanie roli ochronnej białek szoku w powyższym procesie technologicznym,
- ✓ oczyszczenie i określenie właściwości biochemicznych proteiny związanej z powierzchnią komórki *Lactobacillus rhamnosus* oraz genu kodującego ten enzym,
- ✓ zoptymalizowanie składu podłoża hodowlanego oraz warunków hodowli bakterii *Lactobacillus rhamnosus* OXY, wynikiem czego było 6-krotne, w porównaniu z danymi literaturowymi zwiększenie biomasy komórek,

- ✓ ocena przydatności białek tworzących egzoproteom bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* do opracowania metody identyfikacji gatunkowej w obrębie tego rodzaju.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Po uzyskaniu stopnia doktora zostałem, 1 października 2004 roku, zatrudniony na stanowisku adiunkta w Katedrze Biotechnologii Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności UP, w której pracuję do dnia dzisiejszego. Głównym przedmiotem moich zainteresowań w tym okresie, były badania nad analizą proteomu bakterii kwasu mlekowego które opisałem w punkcie 4 niezależnie od tego poszukiwałem nowej tematyki badawczej do której należą:

a) Charakterystyka strukturalna bakteryjnych egzopolisacharydów oraz ocena ich aktywności biologicznej i możliwości wykorzystania praktycznego

Egzopolisacharydy (EPS) wytwarzane przez bakterie kwasu mlekowego pełnią w komórce różnorodne funkcje: od ochronnych przed niekorzystnymi czynnikami środowiska np. temperaturą, pH, obecnością jonów metali, bakteriofagami itp. po czynniki pomagające w zasiedlaniu środowiska. Praktyczne wykorzystanie egzopolisacharydów bakterii mlekowych związane jest głównie z obniżeniem zawartości tłuszczu, obniżeniem zawartości lub wyeliminowaniem obecnie stosowanych zagęstników, czy stabilizatorów, może zapobiegać synerezie, a także zwiększać zawartość błonnika rozpuszczalnego oraz poprawiać odczucia sensoryczne w jamie ustnej. Poza doniesieniami dotyczącymi ich wykorzystania jako naturalne zagęstniki żywności duże zainteresowanie egzopolisacharydami bakterii mlekowych spowodowane jest m.in. ich prozdrowotnym działaniem na organizm człowieka. Związane jest to z działaniem ochronnym na nabłonek przewodu pokarmowego, efektem immunomodulacyjnym, obniżeniem poziomu cholesterolu, a także zapobieganiem powstawaniu nowotworów. Piśmiennictwo z zakresu analizy strukturalnej i biologicznej EPS-ów pochodzących z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych bezpośrednio z ludzkiego

przewodu pokarmowego to zaledwie kilka pozycji. Mając to na uwadze podjęto badania nad polisacharydami w oparciu o powszechnie komercyjnie wykorzystywany w suplementach diety (Lacid®) szczep *Lactobacillus rhamnosus* E/N.

W powyższych eksperymentach wyizolowano, oczyszczono i określono strukturę oraz podstawowe właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne heteropolisacharydu ze szczepu *Lactobacillus rhamnosus* E/N. Wykazano, że są to heteropolisacharydy zbudowane z czterech cząsteczek ramnozy (α -L-Rhap), dwóch glukozy (α - i β -D-Glcp) i jednej reszty galaktozy (α -D-Galp) z pirogronianem w roli podstawnika. Masa molekularna polimeru wytwarzanego przez badany szczep na glukozie jako podstawowym źródle węgla wynosiła 200 kDa. Jednocześnie trzeba podkreślić, że ten sam szczep wytwarzał na różnych źródłach węgla (galaktoza, sacharoza, laktoza i maltoza) polimery o identycznym łańcuchu głównym aczkolwiek różne były jego masy cząsteczkowe. Wiązało się to z morfologią łańcuchów polimerów uzyskanych na wymienionych źródłach węgla, którą przeanalizowano stosując technikę AFM (Atomic Force Microscopy). Z uwagi na fakt, że opisany polimer może być syntetyzowany w ludzkim przewodzie pokarmowym określono aktywność antyoksydacyjną egzopolisacharydu uzyskanego na różnych źródłach węgla stosując metodę ABTS w dwóch modyfikacjach z mioglobina i nadsiarczanem potasu. Najwyższą zdolność do usuwania wolnych rodników tlenowych miały polimery uzyskane po hodowli badanych szczepów na galaktozie glukozie i sacharozie, co wiązało się najprawdopodobniej z różną masą cząsteczkową polimerów, a tym samym ilością dostępnych grup funkcyjnych. Równolegle dla tych samych próbek oceniono potencjał bifidogeny w stosunku do pięciu gatunków bifidobakterii (*B. infantis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. animalis* ssp. *lactis*, *B. longum*). W większości przypadków dodatek egzopolisacharydów do podłoża hodowlanego stymulował wzrost bakterii jelitowych z rodzaju *Bifidobacterium*. W kolejnym cyklu eksperymentów wykorzystano badany egzopolisacharyd jako naturalny biosorbent wiążący jony kadmu i glinu. Analiza mikroskopowa SEM (Scanning Electron Micrography) oraz FT-IR w sposób jednoznaczny wykazały że za wiązanie jonów metali w strukturze egzopolisacharydu odpowiadają grupy karboksylowe i hydroksylowe obecne na powierzchni polimeru. Wyniki tej pracy zwracają uwagę na fakt że heteropolimer wytwarzany przez probiotyczny szczep *Lactobacillus rhamnosus* E/N może zapobiegać przenikaniu wolnych jonów metali ciężkich w przewodzie pokarmowym bezpośrednio do krwioobiegu. Równolegle określono rolę EPS-u wytwarzanego przez badany szczep na jego adhezję

do tkanki jelita wykorzystując model HT-29. Przeprowadzone badania były tematem 5 artykułów naukowych:

- ✓ Polak–Berecka, M., **Waśko, A.**, Skrzypek, H., Kreft, A., 2013: Production of exopolysaccharides by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus*: biosynthesis and purification methods. *Acta Alimentaria*. 42 (2), 220–228.
- ✓ Polak-Berecka, M., **Waśko, A.**, Sz wajgier, D., Choma, A., 2013: Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources. *Polish Journal of Microbiology*. 62, (2), 181-188.
- ✓ Polak-Berecka, M., **Waśko, A.**, Paduch, R., Skrzypek, T., Sroka-Bartnicka, A., 2014: The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106, 751-762.
- ✓ Polak-Berecka, M., Sz wajgier, D., **Waśko, A.**: 2014. Biosorption of Al⁺³ and Cd⁺² by an Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Science*. (DOI:10.1111_1750.3841.12674).
- ✓ Polak-Berecka, M., Choma, A., **Waśko, A.**, Górska, S., Gamian, A., Cybulska, J.,: 2014 Physicochemical characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* on various carbon sources. *Carbohydrate Polymers*. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.10.006.

b) Charakterystyka biochemiczna i genetyczna bakterii kwasu mlekowego

Równoległe z badaniami nad składnikami proteomu bakterii mlekowych, które stanowiły główny nurt badawczy prezentowanego osiągnięcia, uczestniczyłem również w pracach dotyczących charakterystyki biochemicznej i genetycznej bakterii mlekowych związanych z możliwością ich biotechnologicznego wykorzystania. Warto zwrócić uwagę że wykorzystanie bakterii mlekowych z uwagi na ich potencjał metaboliczny w biotechnologii jest niezwykle szerokie dlatego też opisywane badania związane są z różnymi aspektami ich fizjologii.

Jednym z aspektów podjętych w badaniach nad bakteriami mlekowymi była rola esteraz kwasu fenolowego (FAE, EC 3.1.1.73) w pozyskiwaniu kwasów fenolowych jako silnych przeciwutleniaczy z frakcji błonnika roślinnego.

Wytwarzanie tego rodzaju enzymów przez bakterie jelitowe jest szczególnie cenne i stanowi o dodatkowym potencjale biotechnologicznym szczepów wytwarzających esterazy. Mając na uwadze to zagadnienie udało się wyselekcjonować wydajnego producenta esterazy kwasu fenolowego jakim był *Lactobacillus acidophilus* K1 i wykorzystać go w hodowlach fermentorowych do produkcji powyższego enzymu. Jednocześnie dokonano charakterystyki biochemicznej enzymu, który był dimerem o masie ok. 40 kDa. Identyfikację enzymu potwierdzono stosując sekwencjonowanie metodą LC-MS/MS. Optimum temperaturowe i pH badanego enzymu wynosiło odpowiednio 37°C i 6,3. Enzym efektywnie uwalniał wolne kwasy fenolowe z wysłodzin piwowskich. Opracowano również relatywnie niedrogą metodę wytwarzania powyższego enzymu w celach komercyjnych dedykowanych dla przemysłu browarniczego.

Z punktu widzenia biotechnologii najczęściej wykorzystywaną aktywnością biochemiczną bakterii mlekowych jest kompleks enzymów proteolitycznych, z tego też powodu podjęto prace nad analizą jego zmienności w obrębie gatunku *Lactobacillus helveticus*. W pracach nad tą tematyką skupiono się na kodowaniu proteaz związanych z powierzchnią komórki bakterii w powiązaniu z ich aktywnością. Zagadnienie to ma duże praktyczne znaczenie ponieważ pozwala na dokonanie prawidłowego wyboru szczepów używanych w kulturach starterowych. Wpływa to również na przyspieszenie procesów proteolizy, powstawanie peptydów o bioaktywnym znaczeniu i dojrzewanie serów.

Genom bakterii mlekowych zbudowany jest z chromosomu oraz plazmidów, a ich rola w biochemii i fizjologii tych bakterii jest istotna szczególnie jeśli chodzi o cechy o znaczeniu przemysłowym. Na plazmidach zlokalizowane są geny kodujące tak ważne cechy jak oporność na antybiotyki, fagi, wytwarzanie bakteriocyn, egzopolisacharydów czy też hydrolazy kwasów żółciowych. Z tego też powodu opracowano w naszym laboratorium metodykę efektywnej izolacji niskokopijnych dużych plazmidów, która prowadziła do uzyskania wysokiej jakości DNA. Wynikiem prac był wybór najważniejszych etapów w procedurze izolacji na które składała się warunki hodowli bakterii, lizy komórek oraz precypitacji plazmidów.

Jedną z podstawowych cech bakterii probiotycznych, która decyduje o możliwościach ich zastosowania jest ich antybiotykooporność, dlatego też

ta tematyka była przedmiotem oddzielnych eksperymentów. W ramach badań wykonano analizę genetyczną oporności na erytromycynę dwóch szczepów *Lactobacillus rhamnosus* o skrajnych opornościach. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że za oporność na erytromycynę w szczepie wysokoopornym (<512 µg/ml) odpowiada obecność 3 genów *erm A*, *B*, i *C* oraz mutacja w genie 23S rRNA. Podczas gdy w szczepie o oporności na poziomie 2 µg/ml nie wykazano obecności genu *erm B* oraz mutacji.

Zainteresowanie możliwością różnicowania różnych gatunków mikroorganizmów w obrębie jednego rodzaju bakterii jelitowych, zaowocowała pracami, w których wykorzystano molekularne metody oparte zarówno o kwasy nukleinowe jak i białka komórkowe. Wyniki tych prac pokazały, że w przypadku bakterii kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* komplementarne zastosowanie metod opartych na analizie proteomu i genomu może stanowić interesującą alternatywę dla konwencjonalnych metod biochemicznych i genetycznych i pozwala na efektywne różnicowanie na poziomie międzyszczepowym. Rezultaty w/w badań opublikowano w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym.

- ✓ Sz wajgier, D., **Waśko, A.**, Targoński, Z., Niedźwiadek, M., Bancarzewska, M., 2010: The use of novel ferulic acid esterase from *Lactobacillus acidophilus* K1 for the release of phenolic acids from brewer's spent grain. *Journal Institute of Brewing*. 116 (3), 293-303.
- ✓ Skrzypczak, K., Gustaw, W., **Waśko, A.**, 2014: Rola i znaczenie proteinaz związanych z powierzchnią komórki bakterii *Lactobacillus helveticus*. *Postępy Mikrobiologii*. 53(1), 49-60.
- ✓ Polak-Berecka, M., **Waśko, A.**, 2011: A comparison of methods for isolating large plasmid DNA from lactococci. *Annales UMCS, Sectio C*. LXV (1): 7-14.
- ✓ **Waśko, A.**, Skrzypczak, K., Polak-Berecka, M., Kuzdraliński A., 2012: Genetic mechanisms of variation in erythromycin resistance in *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Journal of Antibiotics*. 65 (11), 583-586.
- ✓ Jarocki, P., Podleśny, M., **Waśko, A.**, Siuda, A., Targoński Z., 2010: Differentiation of Three *Lactobacillus rhamnosus* Strains (E/N, Oxy, and Pen) by

SDS-PAGE and Two-Dimensional Electrophoresis of Surface-Associated Proteins.
Journal Microbiology & Biotechnology. 20(3), 558-562.

c) **Optymalizacja procesów biotechnologicznych metodami statystycznymi**

Ważnym elementem mojej pracy naukowej w okresie po obronie pracy doktorskiej było poszerzenie swojej wiedzy na temat optymalizacji procesów biotechnologicznych z zastosowaniem metod statystyczno-matematycznych. Skłoniły mnie do tego moje wcześniejsze doświadczenia z jednowymiarową metodą optymalizacji gdzie modyfikacji podlega tylko jeden czynnik podczas gdy pozostałe przyjmowały niezmiennie wartości, co wpływało na czasochłonność i kosztowność takiego procesu optymalizacji. Dodatkowo takie podejście nie pozwalało na wykrycie ewentualnych interakcji jakie miały miejsce pomiędzy poszczególnymi czynnikami procesu optymalizacji. Z tego też względu poznałem i wykorzystuję praktycznie wielowymiarową metodę odpowiedzi płaszczyzn (ang. RSM, Response Surface Method) którą zastosowałem między innymi do optymalizacji: składu podłoża hodowlanego dla bakterii rodzaju *Lactobacillus*, warunków hodowli do wytwarzania egzopolisacharydów, medium liofilizacyjnego czy też wytwarzania enzymów. Elementem wspólnym w podejściu do procesów optymalizacji zgodnie z opisaną metodą jest opracowanie najlepiej dopasowanego modelu w oparciu o dane eksperymentalne i analizę regresji wielokrotnej. Parametrami charakteryzującymi uzyskane modele są współczynnik determinacji R^2 oraz test braku dopasowania modelu (ang. Lack-of-fit) w zakresie zmienności przyjętych czynników dla każdego modelu. Każdy z uzyskanych modeli regresji i wartości optymalne podlegają weryfikacji eksperymentalnej co pozwala na wyznaczenie przedziałów ufności i błędów standardowych, a tym samym na stwierdzenie poprawności zoptymalizowanych warunków procesów biotechnologicznych. Opisane powyżej badania były tematem 5 publikacji naukowych i 1 patentu.

- ✓ Polak-Berecka, M., **Waśko, A.**, Kordowska-Wiater, M., Podleśny, M., Targoński Z., Kubik-Komar A., 2010: Optimization of Medium Composition for Enhancing

Growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN Using Response Surface Methodology. Polish Journal of Microbiology. 59 (2), 113-118.

- ✓ Polak-Berecka, M., Kordowska-Wiater, M., **Waśko, A.**, Kubik-Komar A., Targoński, Z., 2011: Application of Response Surface Methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. Brazilian Journal of Microbiology. 42(4):1485-94.
- ✓ Kordowska-Wiater, M., **Waśko, A.**, Polak-Berecka, M., Kubik-Komar A., Targoński, Z., 2011: Spirulina enhances the viability of *Lactobacillus rhamnosus* E/N after freeze-drying in a protective medium of sucrose and lactulose. Letters of Applied Microbiology. 53(1):79-83.
- ✓ Polak-Berecka, M., **Waśko, A.**, Kubik-Komar, A., 2014: Optimization of culture conditions for exopolysaccharide production by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* E/N. Polish Journal of Microbiology. 63(2): 253-257.
- ✓ Wiater, A., **Waśko, A.**, Białas, W., Pleszczyńska, M., Polak-Berecka, M., Szczodrak, J., Kubik-Komar, A., 2014: Optimization of mutanase production by *Trichoderma harzianum*. African Journal of Biotechnology. 13(25): 2538-2546.
- ✓ **Waśko, A.**, Kordowska-Wiater, M., Polak-Berecka, M., Kubik-Komar, A., Targoński, Z., Preparat bakteryjny oraz medium liofilizacyjne Patent RP P.393189.

Plany na przyszłość

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania związane z analizą interakcji pomiędzy komórkami bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* a nabłonkiem jelita. Moje zainteresowania zmierzają do szczegółowego poznania roli białek powierzchniowych obecnie sklasyfikowanych jako proteom powierzchniowy (ang. surfom) w procesach adhezji oraz rozpoznanie ich właściwości terapeutycznych. Właściwości immunomodulacyjne oraz hamujące aktywność mikroflory patogenicznej białek powierzchniowych tej grupy bakterii zostały już potwierdzone, dlatego też perspektywa zastosowania ich w nowych produktach takich chociażby jak doustne szczepionki wydaje się niezwykle atrakcyjna z punktu widzenia komercjalizacji badań. W związku z tym, że jak opisano powyżej niektóre z białek powierzchni pochodzących z rodzaju *Lactobacillus* są szczególnie atrakcyjne biotechnologicznie zamierzam podjąć próbę uzyskania ich w heterologicznych systemach ekspresji genów. Niezwykle interesującym układem w kontekście wytwarzania białek powierzchniowych jest bezpieczny i dopuszczony do stosowania w przemyśle system NICE (ang. Nisin Controlled Gene Expression System). Rozwiązanie to pozwoliłoby na efektywne wytwarzanie interesujących z punktu widzenia biotechnologicznego białek, a także ułatwiłoby dalsze badania nad ich strukturą i właściwościami.

Zaangażowany jestem również, w badania związane z metagenomiczną identyfikacją mikroorganizmów środowiskowych w kontekście procesów związanych z metanogenezą i metanotrofią.

