



**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

**Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu**

**Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności**

**Natalia Małgorzata Tomasz**

**Wpływ wybranych olejków eterycznych na metabolizm zależny  
od systemu quorum sensing u *Pseudomonas psychrophila* KM02  
wyizolowanych z żywności**

**Impact of selected essential oils on the quorum sensing-related metabolism  
of *Pseudomonas psychrophila* KM02 isolated from food**

**Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk rolniczych  
w dyscyplinie technologia żywności i żywienia**

**Promotor rozprawy doktorskiej:**

**prof. UPP dr hab. inż. Kamila Myszk**

**Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**

**Poznań, 2023 rok**

## Streszczenie w języku polskim

Świeże schłodzone ryby oraz produkty rybne o minimalnym stopniu przetworzenia łatwo ulegają mikrobiologicznemu zepsuciu. Za ten proces odpowiadają głównie psychrotrofowe gatunki *Pseudomonas* spp., w tym *Pseudomonas psychrophila*, których aktywność metaboliczna jest zależna od systemu quorum sensing. W tym systemie cząsteczki autoinduktorów (AI) rozpoznawane są przez białka receptorowe będące regulatorami transkrypcyjnymi określonej grupy genów. Ingerencja w powyższy mechanizm olejkami eterycznymi i ich składnikami, może wpłynąć na syntezę enzymów i egzopolisacharydów (EPS) oraz na proces degradacji tłuszczu przez drobnoustroje. Weryfikacja działania przeciw-quorum sensing w układach: *in vitro*, *in silico* oraz *in situ* może wspomóc opracowywanie w przyszłości alternatywnych/uzupełniających rozwiązań, zmierzających do eliminacji lub/i wyraźnego ograniczenia aktywności fizjologicznej drobnoustrojów saprofitycznych w matrycy żywności.

Celem głównym niniejszej pracy była ocena wpływu olejku eterycznego z estragonu (TEO) i pieprzu czarnego (BPEO) na system quorum sensing i aktywność metaboliczną bakterii *P. psychrophila* KM02 wyizolowanej z ryb.

W pracy TEO i BPEO otrzymano metodą hydrodestylacji, a ich skład chemiczny oceniono systemem GC-MS. Metodą szeregu seryjnych rozcieńczeń wyznaczono stężenia subinhibicyjne (subMIC) olejków eterycznych względem *Pseudomonas* spp. Systemem GC-FID oceniono zmiany w profilu kwasów tłuszczowych osłon komórkowych. Potencjał przeciw-quorum sensing testowanych czynników charakteryzowano poprzez: (i) ocenę zmian syntezy AI systemem UHPLC-MS/MS oraz (ii) komputerową analizę dokowania molekularnego głównych składników olejków eterycznych do białek receptorowych. Analizę całego genomu oraz transkryptomu przeprowadzono oceniając potencjał *P. psychrophila* KM02 do wzrostu/aktywności metabolicznej w matrycy żywności. Komputerową analizę dokowania molekularnego oraz technikę RT-qPCR wykorzystano w ocenie wpływu badanych czynników na systemy: efflux i T2SS, zależne od quorum sensing. Stopień inhibicji właściwości proteolitycznych i lipolitycznych oraz zmiany syntezy EPS przez TEO, BPEO i główne składniki olejków eterycznych u *P. psychrophila* KM02 oceniono prowadząc analizy spektrofotometryczne oraz RT-qPCR. Metodą płytkową Kocha, scharakteryzowano wzrost *P. psychrophila* KM02 w modelowym produkcie spożywczym, do którego zaaplikowano stężenia subMIC TEO i BPEO.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, iż stężenia subMIC TEO (70-75  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) i BPEO (100-135  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) ingerują w system *quorum sensing* i zaburzają aktywność metaboliczną badanych drobnoustrojów. Ekspozycja komórek *Pseudomonas* spp. na testowane czynniki skutkowała obniżeniem udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz kwasów tłuszczowych o budowie rozgałęzionej w osłonach komórkowych. *Pseudomonas* spp. w warunkach *in vitro* syntezowały autoinduktory (AI) systemu *quorum sensing* należące do grupy AHL (tj. 3-okso-C12-HSL, 3-okso-C14-HSL, 3-okso-C6-HSL, 3-okso-C8-HSL, C12-HSL, C4-HSL, C6-HSL) oraz związek chinolowy PQS. Stężenia subMIC TEO, BPEO oraz składników olejków eterycznych (tj. metyleugenolu (ME) 10-12  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ,  $\beta$ -felandrenu (PHE), 8-10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , limonenu (LIM) 60-65  $\mu\text{L}/\text{mL}$  i  $\beta$ -kariofilenu (CAR) 20-35  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) hamowały syntezę cząsteczek AI *Pseudomonas* spp.. ME, PHE, LIM i CAR wiązały się z białkami receptorowymi LasR, RhIR, TraR oraz PqsR systemu *quorum sensing* oraz białkami Mfs, MexB, MuxB systemu efflux *Pseudomonas* spp. W genomie i transkryptomie *P. psychrophila* KM02 odnotowano obecność czynników świadczących o zdolności bakterii do rozkładu białek i tłuszczu oraz sekrecji enzymów. W prezentowanej pracy, w zaproponowanych układach doświadczeń, stężenia subMIC: TEO, BPEO, ME, PHE, LIM i CAR obniżały aktywność proteolityczną, lipolityczną oraz syntezę EPS przez *P. psychrophila* KM02. Badane czynniki wprowadzone do marynaty octowo-olejowej hamowały wzrost komórek *P. psychrophila* KM02 w rybnym produkcie modelowym.

Niniejsza praca wykazała wpływ TEO i BPEO oraz ich głównych składników, tj. ME, PHE, CAR i LIM na system *quorum sensing* i aktywność metaboliczną *P. psychrophila* KM02. Powyższa zależność może spowolnić proces psucia ryb przechowywanych w warunkach chłodniczych, w który zaangażowany jest *P. psychrophila* KM02. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki uzupełniają również wiedzę dotyczącą systemu *quorum sensing* u bakterii saprofitycznych wyizolowanych z żywności.

**Słowa kluczowe:** quorum sensing, psucie ryb, system efflux, T2SS, dokowanie molekularne, genom, transkryptom

02.06.2023r. *Wioletta Tomasz*