

Imię i nazwisko autora rozprawy: Monika Wicka-Grochocka
Dyscyplina naukowa: Biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: „Esteraza GDSL z psychrotolerancyjnego szczepu *Pseudomonas* sp. S9 - konstrukcja systemów ekspresyjnych opartych o komórki *Escherichia coli* i *Pichia pastoris*, produkcja, oczyszczanie i charakterystyka uzyskanych białek rekombinantowych”

Tytuł rozprawy w języku angielskim: „GDSL esterase from psychrotolerant strain *Pseudomonas* sp. S9 - construction of expression systems based on *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* cells, production, purification and characterization of recombinant proteins”.

Promotor	Promotor pomocniczy
<i>podpis</i>	<i>podpis</i>
Dr hab. inż. Hubert Cieśliński	Dr inż. Marta Wanarska

Podziękowania:

Składam serdeczne podziękowania Panu dr hab. inż. Hubertowi Cieślińskiemu i Pani dr inż. Marcie Wanarskiej za opiekę, udzieloną mi pomoc oraz wskazówki przydatne w czasie powstawania niniejszej pracy.

Dziękuję koleżankom i kolegom z Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej za miłą atmosferę pracy i życzliwość.

Dziękuję moim kochanym rodzicom za trud wykształcenia, wsparcie duchowe i wiarę we mnie ponad wszystko.

Osobne podziękowania składam mojemu mężowi za otuchę, cierpliwość i wyrozumiałość.

Niniejszą pracę pragnę zadedykować moim wspaniałym Rodzicom.

Spis treści

1. CEL PRACY	7
2. STRESZCZENIE	8
3. WSTĘP	12
3.1 Specyficzność enzymów lipolitycznych	14
3.2 Struktura enzymów lipolitycznych	14
3.3 Struktura enzymów lipolitycznych pochodzących z mikroorganizmów adaptowanych do zimna	15
3.4 Kinetyka i mechanizm reakcji hydrolizy katalizowanej przez enzymy lipolityczne	16
3.5 Wpływ pH i temperatury na aktywność enzymów lipolitycznych	18
3.6 Wpływ związków chemicznych na aktywność enzymów lipolitycznych	19
3.7 Podział bakteryjnych enzymów lipolitycznych	20
3.7.1 Rodzina I	20
3.7.2 Rodzina II - GDSL	22
3.7.3 Rodzina III	23
3.7.4 Rodzina IV	23
3.7.5 Rodzina V	23
3.7.6 Rodzina VI	24
3.7.7 Rodzina VII	24
3.7.8 Rodzina VIII	24
3.8 Biologiczna funkcja lipaz	25
3.9 Biologiczna funkcja esteraz	25
3.10 Zastosowanie enzymów lipolitycznych	26
3.10.1. Produkcja detergentów	26
3.10.2 Przemysł spożywczy	27
3.10.3 Przemysł kosmetyczny	28
3.10.4 Przemysł drzewno-papierniczy	29
3.10.5 Przemysł farmaceutyczny i synteza organiczna	30
3.10.6 Przemysł skórzaný	32
3.10.7 Przemysł tekstylny	32
3.10.8 Produkcja biodiesla	33
3.10.9 Pozostałe zastosowania	33
3.11 Enzymy aktywne w niskich temperaturach	33

3.11.1 Esterazy aktywne w niskich temperaturach	36
3.11.1.1 Esterazy aktywne w niskich temperaturach - zastosowanie	45
3.12 Sekrecja białek u bakterii Gram-ujemnych	54
3.13 System sekrecji typu V (autotransportery)	55
3.14 Biologiczne funkcje białek autotransporterowych z domeną GDSL	57
4. MATERIAŁY I METODY	59
4.1 Szczepy bakteryjne	59
4.2 Szczep drożdżowy	59
4.3 Wektory plazmidowe	59
4.4. Pożywki i podłoża	60
4.5 Dodatkowe składniki użyte do przygotowania pożywek i podłoży	63
4.6 Izolacja DNA	63
4.7 Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych	63
4.8 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	65
4.9. Wzorzec długości fragmentów DNA	65
4.10. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	65
4.11 Ligacja DNA	66
4.12 Przygotowanie komórek kompetentnych <i>Escherichia coli</i>	67
4.13 Transformacja komórek kompetentnych <i>Escherichia coli</i> plazmidowym DNA	67
4.14 Ekspresja genów <i>estS9auto</i> i <i>estS9short</i> w komórkach <i>E. coli</i> TOP10	68
4.15 Otrzymanie lizatów komórkowych oraz ekstraktów bezkomórkowych <i>E. coli</i> TOP10/pBADestS9auto i <i>E. coli</i> TOP10/pBADestS9short	68
4.16 Oczyszczanie białka EstS9short i EstS9Auto metodą chromatografii metalopowinowactwa w warunkach denaturujących	68
4.17 Przygotowanie komórek kompetentnych <i>Pichia pastoris</i> i transformacja plazmidowym DNA	70
4.18 Amplifikacja DNA techniką PCR	71
4.19 Badanie aktywności esterolitycznej rekombinantowych komórek <i>Pichia pastoris</i> X-33/sygestS9auto, <i>Pichia pastoris</i> X-33/sygestS9short, <i>Pichia pastoris</i> X-33/αestS9auto i <i>Pichia pastoris</i> X-33/αestS9short	75
4.20 Konstytutywna ekspresja genów sygestS9auto, sygestS9short, αestS9auto oraz αestS9short w komórkach <i>Pichia pastoris</i> X-33	75
4.21 Indukowana metanolem ekspresja genów sygestS9auto, sygestS9short, αestS9auto oraz αestS9short w komórkach <i>Pichia pastoris</i> X-33	76
4.22 Badanie płynów pochodzących oraz płynów po dezintegracji komórek rekombinantowych <i>Pichia pastoris</i> X-33	76



4.23 Oczyszczanie białka EstS9short wyprodukowanego w indukowanym systemie ekspresyjnym <i>Pichia pastoris</i>	77
4.24 Oznaczanie stężenia białka	78
4.25 Wzorce masy cząsteczkowej białek użyte podczas elektroforezy białek metodą SDS-PAGE	79
4.26 Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (metoda SDS-PAGE)	79
4.27 Detekcja białek za pomocą immunoblottingu	81
4.28 Oznaczanie aktywności enzymatycznej rekombinowanych białek EstS9auto, EstS9short i α EstS9short	82
4.29 Analiza poprawności skonstruowanych plazmidów rekombinantowych	85
4.30 Aparatura	86
5. WYNIKI I DYKUSJA	88
5.1 Charakterystyka właściwości biochemicznych esterazy EstS9Auto produkowanej w komórkach <i>Escherichia coli</i>	93
5.1.2 Analiza specyficzności substratowej EstS9Auto	93
5.1.3 Wpływ temperatury na aktywność esterazy EstS9Auto	94
5.1.4 Wpływ pH na aktywność EstS9Auto	95
5.1.5. Wpływ temperatury na stabilność EstS9Auto.....	96
5.1.6 Wpływ pH na stabilność EstS9Auto	97
5.1.7 Wpływ wybranych jonów metali na aktywność esterazy EstS9Auto.....	99
5.1.8 Wpływ wybranych związków chemicznych na aktywność esterazy EstS9Auto.....	100
5.1.9 Określenie parametrów kinetycznych EstS9Auto	101
5.2 Produkcja esterazy EstS9short w komórkach <i>E. coli</i>	101
5.2.1 Konstrukcja plazmidu ekspresyjnego pBADestS9short.....	102
5.2.2 Biosynteza esterazy EstS9short w komórkach <i>E. coli</i> TOP10	103
5.2.3 Oczyszczanie białka EstS9short metodą chromatografii metalopowinowactwa w warunkach denaturujących.....	104
5.2.4 Oznaczanie aktywności oczyszczonego preparatu esterazy EstS9short	105
5.3 Produkcja esterazy z <i>Pseudomonas sp. S9</i> w systemie ekspresyjnym <i>Pichia pastoris</i>	105
5.3.1 Produkcja esterazy z <i>Pseudomonas sp. S9</i> w konstytutywnym systemie ekspresyjnym <i>Pichia pastoris</i>	107
5.3.1.1 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych pGAPsygestautoS9 i pGAPsygestS9short	107
5.3.1.2 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych pGAP α estS9auto i pGAP α estS9short.....	110
5.3.1.3 Biosynteza białek α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto w komórkach <i>Pichia pastoris</i>	113

5.3.2 Produkcja esterazy z <i>Pseudomonas</i> sp. S9 w indukowanym systemie ekspresyjnym <i>Pichia pastoris</i>	116
5.3.2.1 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych pPICZ α estS9auto i pPICZ α estS9short.....	116
5.3.2.2 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych pPICZsygestS9auto i pPICZsygestS9short	119
5.3.3 Biosynteza białek α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto w indukowanym metanolem systemie ekspresyjnym <i>Pichia pastoris</i>	123
5.3.3.2 Oczyszczanie białka α EstS9short metodą chromatografii metalopowinowactwa	129
5.4 Charakterystyka właściwości biochemicznych esterazy α EstS9short produkowanej w komórkach <i>P. pastoris</i>	131
5.4.2 Analiza specyficzności substratowej α EstS9short.....	131
5.4.2 Wpływ temperatury na aktywność α EstS9short.....	132
5.4.3 Wpływ pH na aktywność α EstS9short.....	133
5.4.4 Wpływ temperatury na stabilność α EstS9short.....	134
5.4.5 Wpływ pH na stabilność α EstS9short.....	136
5.4.6 Wpływ wybranych jonów metali na aktywność esterazy α EstS9short.....	136
5.4.7 Wpływ wybranych związków chemicznych na aktywność α EstS9short	137
5.4.8 Określenie parametrów kinetycznych α EstS9short	139
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE.....	140
7. BIBLIOGRAFIA.....	145

1. CEL PRACY

Celem pracy było opracowanie metody produkcji rekombinantowych enzymów, wariantów sekwencyjnych aktywnej w niskiej temperaturze esterazy EstS9 pochodzącej z psychrotolerancyjnych bakterii *Pseudomonas* sp. S9, a także oczyszczenie uzyskanych enzymów, charakterystyka i porównanie ich właściwości biochemicznych oraz ocena ich potencjału biotechnologicznego.

2.STRESZCZENIE

Enzymy lipolityczne ze względu na swoje unikalne cechy takie jak m.in. chemo-, regio-, enancjoselektywność, a także zdolność do przeprowadzania reakcji zarówno w środowisku wodnym jak i niewodnym stały się jedną z najważniejszych grup biokatalizatorów. Wykorzystywane są głównie w przemyśle detergentów jako dodatki do środków piorących, a także w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i syntezie organicznej. Szczególnie interesujące są lipazy i esterazy pochodzące z mikroorganizmów psychrofilnych i psychrotolerancyjnych, ze względu na zdolność wydajnej katalizy reakcji hydrolizy, syntezy estrów lub transestryfikacji w obniżonych temperaturach. Zastosowanie enzymów lipolitycznych z mikroorganizmów adaptowanych do zimna niesie ze sobą wiele korzyści i jest alternatywą wobec wykorzystania w przemyśle esteraz i lipaz pochodzących z mikroorganizmów mezofilnych czy termofilnych. Po pierwsze, umożliwia syntezę wielu związków labilnych termicznie i ogranicza występowanie reakcji ubocznych mogących prowadzić do powstania niespecyficznych produktów. Po drugie, obniżenie temperatury prowadzonego procesu minimalizuje ryzyko zanieczyszczenia mikroorganizmami chorobotwórczymi, a także redukuje koszty produkcji np. poprzez ograniczenie ilości energii zużywanej do ogrzania bioreaktorów.

W celu opracowania wydajnej metody produkcji rekombinantowych wariantów sekwencyjnych enzymu esterolitycznego z psychrotolerancyjnego szczepu *Pseudomonas* sp. S9 zaprojektowano układy ekspresyjne umożliwiające ich produkcję w bakteriach *Escherichia coli* oraz drożdżach *Pichia pastoris*. W systemie ekspresyjnym *E. coli* wyprodukowano dwa warianty białek: EstS9Auto (białko zbudowane z domeny katalitycznej, domeny autotransportera, domeny oligohistydynowej) i EstS9short (białko zbudowane z domeny katalitycznej i domeny oligohistydynowej). Oba warianty białek, tj. EstS9Auto i EstS9short, produkowane były w systemie *E. coli* w postaci nieaktywnej, w ciałkach inkluzyjnych. W związku z powyższym, otrzymanie preparatów obu białek umożliwiających oznaczenie ich właściwości enzymatycznych wymagało przeprowadzenia oczyszczania tychże białek w warunkach denaturujących, z zastosowaniem chromatografii metalopowinowactwa, a następnie przeprowadzenia procesu renaturacji. W dalszych etapach pracy przeprowadzono charakterystykę biochemiczną rekombinantowego enzymu EstS9Auto,

a także porównano jego aktywność enzymatyczną z uzyskanym preparatem jednodomenowego wariantu esterazy - EstS9short. W związku z pojawiającym się problemem produkcji obu enzymów w formie ciał inkluzyjnych w komórkach *E. coli*, pracę rozszerzono o przetestowanie innego układu ekspresyjnego, tym razem opartego o zastosowanie mezofilnych drożdży *Pichia pastoris* jako gospodarza ekspresji heterologicznych genów. Zaprojektowane układy ekspresyjne umożliwiły uzyskanie dwóch rekombinantowych białek, tj. α EstS9Auto i α EstS9short. Charakterystykę biochemiczną przeprowadzono tylko dla białka rekombinantowego α EstS9short, gdyż tylko w tym wypadku uzyskano sekrecję białka na zewnątrz komórek drożdży. Dzięki użyciu dwóch różnych systemów ekspresyjnych udało się osiągnąć cel pracy jakim było m.in. porównanie charakterystyki enzymatycznej dwóch różnych wariantów sekwencyjnych esterazy pochodzącej z psychrotolerancyjnych bakterii *Pseudomonas* sp. S9. Ponadto, porównano właściwości obu enzymów z właściwościami biochemicznymi innych opublikowanych aktywnych w niskiej temperaturze esteraz.

Esteraza EstS9Auto wykazuje właściwości enzymatyczne typowe dla innych dobrze scharakteryzowanych aktywnych w niskiej temperaturze esteraz. Enzym ten wykazuje najwyższą aktywność w temperaturze 35°C, pH 9,0 wobec maślanu *p*-nitrofenylu. Jednakże, termostabilność EstS9Auto jest dużo wyższa od termostabilności większości esteraz aktywnych w niskiej temperaturze. Aktywność enzymatyczna esterazy EstS9Auto nie zmienia się po 3 h inkubacji w temperaturze 60°C.

Dla porównania enzym α EstS9short najwyższą aktywność wykazuje w temperaturze 60°C, natomiast preferowanym substratem w katalizowanej reakcji hydrolizy jest octan *p*-nitrofenylu. Ponadto, esteraza EstS9short zachowuje 90% swojej aktywności po 3 godzinnej inkubacji w zakresie temperatur 70-90°C. Co warto także podkreślić, enzym α EstS9short wyprodukowany w systemie ekspresyjnym *P. pastoris* wykazuje wyższą aktywność specyficzną (0,069 U/mg_{białka}) niż EstS9Short wyprodukowany w systemie ekspresyjnym *E. coli* (0,0025 U/mg_{białka}), jednak niższą niż enzym EstS9Auto także wyprodukowany w systemie ekspresyjnym *E. coli* (0,088 U/mg_{białka}).

ABSTRACT

Lipolytic enzymes, due to their unique properties such as chemo-, regio-, enantioselectivity and the ability to catalyse reactions both in aqueous and non-aqueous media, have become one of the most important groups of biocatalysts. They are mainly used in the detergent industry as additives in laundry detergents, as well as in the food, pharmaceutical and organic synthesis industries. Particularly interesting are the lipases and esterases from psychrotolerant and psychrotrophic microorganisms, due to their ability to efficiently catalyse reactions of hydrolysis, ester synthesis or transesterification at low temperatures. The use of lipolytic enzymes from cold-adapted microorganisms has many advantages and is an alternative to the use of esterases and lipases from mesophilic or thermophilic microorganisms in the industry. Firstly, it allows the synthesis of many thermally labile compounds and reduces the occurrence of side reactions that may lead to the formation of non-specific products. Secondly, lowering the temperature of the process minimises the risk of contamination with pathogenic microorganisms and reduces production costs, for example by limiting the amount of energy consumed to heat bioreactors.

In order to develop an efficient method for the production of recombinant sequence variants of the esterase from *Pseudomonas* sp. S9, *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* expression systems were used. In the *E. coli* expression system, two variants of the protein were produced, EstS9Auto (consists of the N-terminal catalytic domain, autotransporter domain, and C-terminal oligohistidine domain) and EstS9Short (consists of the N-terminal catalytic domain and C-terminal oligohistidine domain). Both recombinant protein variants, EstS9Auto and EstS9short, were produced in an inactive form (inclusion bodies). Accordingly, obtaining the enzymatically active recombinant proteins required: purification of these proteins under denaturing conditions using metal affinity chromatography, renaturation step, and dialysis to the urea-free buffer. Further, the biochemical characteristics of the recombinant EstS9Auto enzyme were performed and its enzymatic activity was compared with the other recombinant variant of esterase-EstS9short. Due to production of the proteins as inclusion bodies, we decided to test another expression system based on the use of mesophile cells of yeast *Pichia pastoris* as a host, where both recombinant proteins, α EstS9Auto and α EstS9short, were produced. Finally, we performed biochemical characterization only of recombinant protein α EstS9short, because only in this case protein was produced outside the cell.

The use of two different expression systems helped to achieve the purpose of this studies, i.e., to compare the properties of two different sequence variants of the esterase from the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. S9. In addition, the biochemical properties of both enzymes were compared with biochemical properties of other well-characterized low-temperature esterases.

Esterase EstS9Auto exhibits enzymatic properties typical for other well-characterized esterases active at low temperature. This enzyme has optimum activity at a temperature of 35°C, pH 9.0 against *p*-nitrophenyl butyrate. However, the thermal stability of this enzyme is much higher than the thermal stability of most of the esterases active at low temperatures. The enzymatic activity of EstS9Auto esterase does not change after 3 h incubation at 60°C.

For comparison, α EstS9short esterase exhibits the highest activity at 60°C , while the preferred substrate for hydrolysis is *p*-nitrophenyl acetate. In addition, EstS9short esterase retains 90% of its activity after 3 hours incubation at 70-90°C. What should also be noted α EstS9short produced in *P. pastoris* expression system has a higher specific activity (0.069 U/mg protein) than EstS9Short produced in an expression system of *E. coli* (0.0025 U/mg protein), but lower than the EstS9Auto also produced in the *E. coli* expression system (0.088 U/mg protein).

3. WSTĘP

Enzymy lipolityczne ze względu na ich szerokie praktyczne zastosowanie są jedną z najważniejszych grup biokatalizatorów stosowanych we współczesnej biotechnologii. Wynika to w dużej mierze z faktu, że enzymy te przeprowadzają reakcje zarówno w środowisku wodnym jak i niewodnym. Charakteryzują się wysoką stabilnością, chemo-, regio- i enancjoselektywnością oraz posiadają zdolność do hydrolizy szerokiego spektrum substratów.

Enzymy lipolityczne należą do grupy hydrolaz, które w obecności wody, katalizują reakcję hydrolizy wiązań estrowych w cząsteczkach glicerydów, np. katalizują reakcję hydrolizy triglicerydów do diglicerydów, monoglicerydów, kwasów monokarboksylowych i glicerolu. Enzymy lipolityczne katalizują reakcje hydrolizy glicerydów na granicy faz lipid-woda. Substraty lipaz charakteryzują się niską rozpuszczalnością w wodzie. Stąd, enzymy te katalizują reakcje hydrolizy wiązań estrowych na powierzchni międzyfazowej, tj. pomiędzy fazą nierozpuszczalną w wodzie, stanowiącą substrat np. trigliceryd, a fazą wodną, w której rozpuszczony jest enzym (Saxena i in., 1999). Co ważne, wraz ze spadkiem ilości cząsteczek wody w środowisku, z reakcją hydrolizy estrów zaczyna konkurować reakcja ich syntezy. Ostatecznie, to stężenie cząsteczek wody w otoczeniu enzymu lipolitycznego determinuje kierunek reakcji (Gupta i in., 2004). Reakcja odwrotna - estryfikacja, formowanie glicerydów z kwasów monokarboksylowych i glicerolu, zachodzi przy niskiej zawartości wody w środowisku reakcji (Wong, 1995; Saxena i in., 1999). Trzecim typem reakcji jaki mogą katalizować enzymy lipolityczne jest reakcja transestryfikacji. W zależności od warunków, a w szczególności od tego czy drugim z substratów reakcji poza estrem jest inny ester, alkohol, amina bądź kwas karboksylowy, powstają specyficzne produkty reakcji transestryfikacji (Rys. 1).

Podsumowując, enzymy lipolityczne katalizują trzy typy reakcji: hydrolizy estrów, syntezy estrów i transestryfikacji (Rys. 1) (Saxena i in., 1999; Jaeger i in., 1994).

Ze względu na swoje unikalne cechy, lipazy i esterazy znalazły szereg zastosowań w przemyśle detergentów, spożywczym, skórzanym, włókienniczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, papierniczym i innych. Większość znanych enzymów lipolitycznych wyizolowano z bakterii i grzybów (Jaeger i in., 2002).

3.1 Specyficzność enzymów lipolitycznych

Enzymy lipolityczne można podzielić ze względu na ich specyficzność substratową na lipazy i esterazy (Wong, 1995). W reakcji hydrolizy preferowanym substratem lipaz są triacyloglicerole zawierające łańcuchy kwasów monokarboksylowych o długości równej bądź większej niż 10 atomów węgla. Natomiast mianem esteraz określa się te enzymy lipolityczne, które katalizują hydrolizę mniejszych cząsteczek estrów, częściowo rozpuszczalnych w wodzie triacylogliceroli, posiadających krótkie łańcuchy kwasów monokarboksylowych (mniej niż 10 atomów węgla) (Jeager i in., 2002).

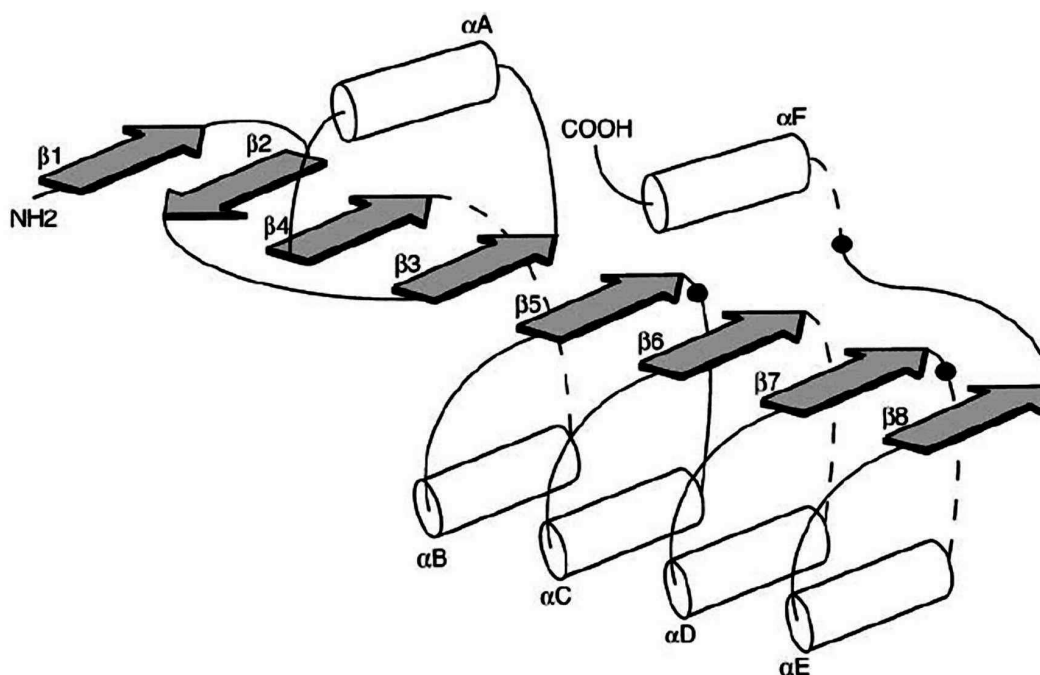
Specyficzność pozycyjna (regioselektywność) enzymów lipolitycznych, to preferencja poszczególnych lipaz do katalizowania reakcji hydrolizy określonych wiązań estrowych triacylogliceroli. Enzymy lipolityczne zazwyczaj nie katalizują reakcji hydrolizy wiązań estrowych tworzonych z udziałem grupy hydroksylowej znajdującej się w pozycji 2 cząsteczki glicerolu. Jednakże, w cząsteczkach monoacylogliceroli dochodzi do powolnego przeestryfikowania, prowadzącego do migracji reszty kwasu tłuszczowego z tej pozycji na grupę hydroksylową znajdującą się w pozycji 1 (pozycja α) cząsteczki glicerolu, a następnie hydrolizy tego ostatniego wiązania estrowego (Saxena i in., 1999).

Stereospecyficzność enzymów lipolitycznych to zdolność do „rozdzielenia” przez centrum aktywne enzymu konformacji przestrzennej grup acylowych w obrębie hydrolizowanego estru. Lipazy mogą rozróżniać dwie odrębne cząsteczki enancjomerów, bądź dwie chemicznie identyczne, ale stereochemicznie różne enancjomeryczne grupy wewnątrz prochiralnych cząsteczek substratu. W rezultacie oznacza to, że katalizują one przemianę tylko jednej z obecnych cząsteczek enancjomeru w mieszaninie racemicznej (Wong, 1995; Saxena i in., 1999).

3.2 Struktura enzymów lipolitycznych

Większość lipaz i esteraz należy do α/β hydrolaz. Rdzeń enzymów lipolitycznych najczęściej składa się z ośmiu β -krotek, przy czym druga z nich ułożona jest antyrównolegle do pozostałych. Sześć spośród ośmiu β -krotek ($\beta 3$ - $\beta 8$) połączonych jest strukturami α -helikalnymi (Rys. 2). Wiele α/β hydrolaz, w tym enzymów lipolitycznych, nazywa się hydrolazami serynowymi. Hydrolazy serynowe posiadają triadę katalityczną składającą się z reszt seryny, histydyny i kwasu asparaginowego bądź

kwasy glutaminowego (Hausmann i in., 2010). Reszta seryny znajduje się z reguły wewnątrz zakonserwowanego ewolucyjnie pentapetydu G-X-S-X-G, gdzie X oznacza dowolną resztę aminokwasową. Pętla, w której znajduje się reszta seryny nazywana jest „nukleofilowym łokciem” (Hausmann i in., 2010).



Rys 2. Struktura kanoniczna α/β -hydrolaz. Na rysunku α -helisa przedstawiona jest za pomocą walca, β -kartka to zacięta strzałka. Względna pozycja reszt aminokwasowych centrum aktywnego pokazana jest w formie czarnych kropek. Nukleofilem jest reszta aminokwasowa znajdująca się za 5 β -kartką, reszta Asp/Glu jest zlokalizowana za 7 β -kartką, reszta His znajduje się w pętli pomiędzy β 8 i α F (Jaeger i in., 1999).

3.3 Struktura enzymów lipolitycznych pochodzących z mikroorganizmów adaptowanych do zimna

Prowadząc studium literaturowe skupiające się na adaptowanych do zimna enzymach lipolitycznych, spotkałam się z pracami poświęconymi badaniom struktury tych enzymów. W pracach tych analizowano różnice w strukturze enzymów lipolitycznych izolowanych z mikroorganizmów adaptowanych do zimna (psychrofilnych i psychrotolerancyjnych), mezofilnych i termofilnych poszukując cech wpływających na zdolność enzymów lipolitycznych do prowadzenia sprawnej katalizy reakcji hydrolizy estrów w niskich temperaturach. Większość dostępnej literatury

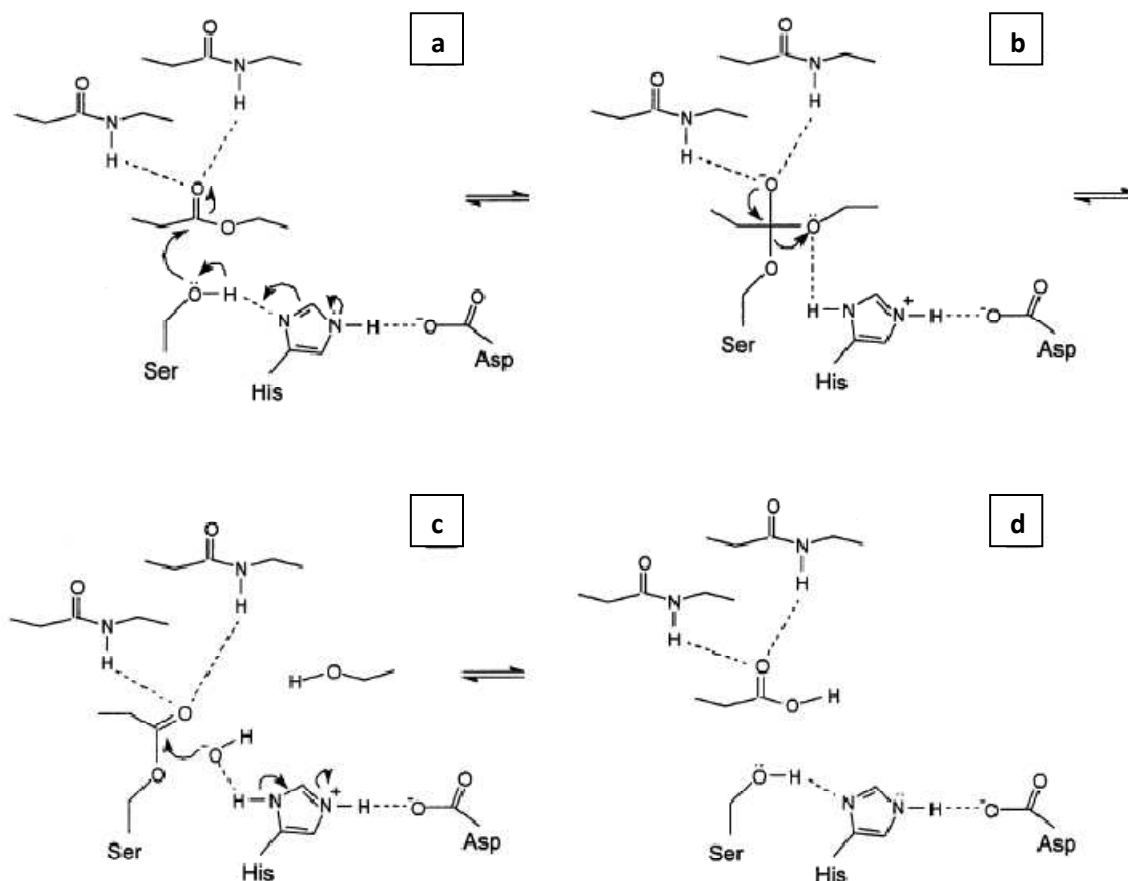
odnosi się do różnic w liczbie mostków solnych, oddziaływań hydrofobowych, liczby reszt proliny, argininy i glicyny, a także długości i składu aminokwasowego pętli znajdujących się między strukturami α -helis i β -kartek w cząsteczkach badanych enzymów w zależności od ich pochodzenia (Kovacic i in., 2016). Ustalono również, że za wysoką sprawność katalityczną enzymów lipolitycznych aktywnych w niskich temperaturach najprawdopodobniej odpowiada zwiększona elastyczność ich łańcucha polipeptydowego w niskich temperaturach, w porównaniu z wynikami uzyskanymi na podstawie analizy cząsteczek enzymów lipolitycznych izolowanych z mikroorganizmów mezofilnych lub termofilnych (Kovacic i in., 2016), (Babu i in., 2008). Na przykład, molekularne modelowanie lipazy pochodzącej z antarktycznej, psychrofilnej bakterii *Pseudomonas immobilis* wykazało: a) niski udział reszt argininy w stosunku do reszt lizyny i niską zawartość reszt proliny (prawdopodobnie niska zawartość reszt proliny i argininy odpowiedzialna jest za zwiększenie elastyczności szkieletu białka) oraz b) ogólny spadek liczby reszt aminokwasów niepolarnych, przy jednoczesnym zwiększeniu ilości tych reszt na powierzchni cząsteczki enzymu. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że wzrost liczby reszt aminokwasów niepolarnych na powierzchni enzymu jest odpowiedzialny za destabilizację płaszcza wodnego otaczającego enzym. Dodatkowo, adaptacji do prowadzenia katalizy w niskich temperaturach sprzyja zredukowana liczba mostków solnych oraz niewielki udział oddziaływań pierścieni aromatycznych znajdujących się w resztach aminokwasów aromatycznych w obrębie cząsteczki enzymu (Babu i in., 2008; Mohamad Ali i in., 2013).

3.4 Kinetyka i mechanizm reakcji hydrolizy katalizowanej przez enzymy lipolityczne

W przeciwieństwie do lipaz, esterazy spełniają zależność Michaelisa-Menten, tzn. reakcje katalizowane przez esterazy osiągają maksymalną szybkość przed nasyceniem roztworu przez substrat. Aktywność lipaz natomiast nie jest funkcją stężenia substratu. Wzrost aktywności lipaz obserwuje się po osiągnięciu takiego stężenia substratu, przy którym jest już on nierozpuszczalny w wodzie i zaczyna tworzyć emulsję (Wong, 1995; Jaeger i in., 1999). Lipazy podlegają zjawisku aktywacji międzyfazowej na granicy faz woda/olej (Wong, 1995). Lipazy, aby mogły katalizować reakcję hydrolizy, muszą przeniknąć do przestrzeni międzyfazowej, gdzie kontakt

enzymu z hydrofobowym substratem indukuje zmianę jego konformacji, co w rezultacie powoduje wzrost jego aktywności. Triada katalityczna osłonięta jest tzw. wiekiem (ang. lid), czyli ruchomym oligopeptydem. W pierwszym etapie reakcji dochodzi do aktywacji enzymu, otwarcia wieka, co inicjowane jest przez kontakt z hydrofobowym substratem. Następnie, tworzy się kompleks enzym-substrat. Po zakończeniu reakcji hydrolizy następuje uwolnienie enzymu wcześniej zaadsorbowanego na powierzchni substratu (Wong, 1995).

Z chemicznego punktu widzenia hydroliza substratu katalizowana przez enzymy lipolityczne odbywa się w dwóch etapach. Pierwszy rozpoczyna się atakiem atomu tlenu grupy hydroksylowej nukleofilowej reszty seryny na aktywny karbonylowy atom węgla triacyloglicerolu (Rys. 3a). W ten sposób utworzony zostaje ujemnie naładowany, tetraedryczny produkt pośredni. Produkt ten stabilizowany jest dipolem helisy C, wiązaniami wodorowymi pomiędzy negatywnie naładowanym atomem tlenu grupy karbonylowej (ang. oxyanion) i przynajmniej dwiema grupami NH (ang. oxyanion hole) (Rys. 3b). Kolejny etap to deacylacja, podczas której reszty histydyny aktywują cząsteczkę wody poprzez oderwanie od niej protonu. W następstwie jon OH^- atakuje atom węgla grupy karbonylowej oksoanionu. Wiązanie estrowe między resztą seryny i acylową częścią triacyloglicerolu zostaje rozerwane w wyniku przemieszczenia protonu z reszty histydyny na atom tlenu aktywnej reszty seryny (Rys. 3c). Następuje uwolnienie produktu i cząsteczki enzymu (Rys. 3d) (Jaeger i in., 1999). Schemat mechanizmu przebiegu opisaney reakcji przedstawiony jest na rysunku 3.



Rys 3. Schemat reakcji hydrolizy substratu katalizowanej przez enzymy lipolityczne (Jaeger i in., 1999).

3.5 Wpływ pH i temperatury na aktywność enzymów lipolitycznych

Optymalna temperatura działania enzymów lipolitycznych z reguły mieści się w zakresie 30-35°C dla enzymów pochodzących z organizmów mezofilnych oraz 40-60°C dla enzymów izolowanych z organizmów termofilnych (Saxena i in., 1999). Z psychrofilnych i psychrotolerancyjnych mikroorganizmów izolowano enzymy lipolityczne, które wykazują aktywność w zakresie temperatur 20-35°C (Tabela 2).

Większość znanych enzymów lipolitycznych charakteryzuje się największą aktywnością w pH obojętnym bądź lekko zasadowym. Przykładem mogą być lipazy CALA i CALB pochodzące z drożdży *Candida antarctica*, lipaza LipCst z termofilnej bakterii *Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis* (Royter i in., 2009), lipaza pochodząca z *Thermus thermophilus* HB8 (Kretza i in., 2012), a także esteraza pochodząca z *Salimicrobium* sp. LY19 (Xin i Hui-Ying, 2013), dla których optymalnym

pH dla aktywności enzymatycznej jest pH równe 7 (Kirk i in., 2002), a także esterazy i lipazy m.in. EstO, EstK, Est11, Est12, LipP (Tabela 2), Est0796 (Inmaculada i in., 2013), LipTth (Royter i in., 2009), które wykazują największą aktywność w środowisku lekko alkalicznym.

3.6 Wpływ związków chemicznych na aktywność enzymów lipolitycznych

Enzymy lipolityczne należą do hydrolaz serynowych i nie wymagają kofaktorów. Jony wapnia zwykle stymulują działanie tych enzymów, co prawdopodobnie związane jest z tworzeniem soli wapnia długołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, które są uwalniane w reakcji hydrolizy estrów (Gupta i in., 2004).

Jony metali ciężkich na ogół silnie hamują aktywność enzymów lipolitycznych, wymieć tu można jony Co^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} . Niewielki spadek aktywności następuje zwykle w obecności jonów Zn^{2+} , Mg^{2+} (Gupta i in., 2004).

Inhibitory lipaz można podzielić na inhibitory odwracalne niespecyficzne oraz inhibitory specyficzne. Te pierwsze to związki, które nie wpływają bezpośrednio na centrum aktywne enzymu, jednakże mają wpływ na zmianę konformacji białka bądź jego właściwości międzyfazowe. Do tego typu inhibitorów można zaliczyć środki powierzchniowo czynne, sole kwasów żółciowych, inne białka. Drugim rodzajem inhibitorów są związki oddziałujące na centrum aktywne enzymu, wiążące się z nim bezpośrednio. Inhibitory specyficzne mogą być odwracalne i nieodwracalne. Pochodne kwasu borowego i analogi substratów w sposób odwracalny łączą się z centrum aktywnym enzymów lipolitycznych. Związki hamujące enzym w sposób nieodwracalny zwykle wiążą się z resztami aminokwasowymi miejsca aktywnego lub jego otoczenia. Ponieważ duża grupa enzymów lipolitycznych należy do hydrolaz serynowych (triada katalityczna Ser-His-Asp/Glu), inhibitory serynowe stanowią potencjalnie nieodwracalne inhibitory centrum aktywnego. Do tej grupy inhibitorów należą fluorek fenylometrylosulfonylu (PMSF), fosforan dietylo-*p*-nitrofenylowy, kwas fenyloborowy (Gupta in., 2004).

β -Merkaptoetanol można stosować w badaniach nad enzymami lipolitycznymi, gdyż nie powinien zasadniczo wywierać wpływu na ich aktywność. Wynika to z analizy struktury tych enzymów. Obecność wolnych grupy tiolowych i mostków

disiarczkowych nie jest wymagana do aktywności katalitycznej większości enzymów lipolitycznych. Również obecność kwasu etylenodiaminotertraoctowego (EDTA) w większości przypadków nie wpływa na aktywność enzymów lipolitycznych (Gupta i in., 2004).

3.7 Podział bakteryjnych enzymów lipolitycznych

Ze względu na fakt, że praca dotyczy charakterystyki wybranych właściwości enzymatycznych rekombinantowych esteraz uzyskanych na bazie genu bakteryjnej esterazy z *Pseudomonas* sp. S9, postanowiłam skupić się na omówieniu podziału enzymów lipolitycznych produkowanych przez bakterie.

Na dzień dzisiejszy, bakteryjne enzymy lipolityczne podzielono na osiem rodzin. Podział ten stworzono na podstawie analizy ich sekwencji aminokwasowych oraz ich funkcji biologicznych (Hausmann i in., 2010).

3.7.1 Rodzina I

Do I rodziny bakteryjnych enzymów lipolitycznych zalicza się tzw. lipazy właściwe. Ponadto, w obrębie tej rodziny wyróżnia się osiem podrodzin (I.1-I.8) (Tabela1).

Tabela 1. Podział bakteryjnych lipaz właściwych (Hausmann i in., 2010)

Podrodzina	Źródło lipazy	Uwagi
I.1	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Pseudomonas mendocina</i> • <i>Rhodoferax ferrireducens</i> • <i>Vibrio cholerae</i> • <i>Vibrio parahaemolyticus</i> • <i>Vibrio harveyi</i> • <i>Aeromonas hydrophila</i> • <i>Dehalococcoides</i> sp. VS • <i>Chromobacterium violaceum</i> • i 16 innych 	<p>Masa cząsteczkowa tych enzymów wynosi ~30-32 kDa.</p> <p>Enzymy z tej podrodziny wykazują wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej z sekwencją aminokwasową lipazy <i>P. aeruginosa</i>.</p> <p>Do tej podrodziny zalicza się lipazy bakterii Gram-ujemnych. Sekrecja tych białek odbywa się za pomocą mechanizmu II.</p>
I.2	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Burkholderia glumae</i> • <i>Burkholderia cenocepacia</i> • <i>Burkholderia multivorans</i> • <i>Burkholderia thailandensis</i> • <i>Pseudomonas</i> KWI-56 • <i>Burkholderia cepacia</i> • <i>Pseudomonas luteola</i> 	<p>Masa cząsteczkowa lipaz należących do tej podrodziny wynosi ~33 kDa.</p> <p>Jest ona większa od masy cząsteczkowej lipaz podrodziny I.1 ze względu na insercję w obrębie ich sekwencji dodatkowej sekwencji aminokwasowej tworzącej dwie antyrównoległe β-kartki na</p>

	<ul style="list-style-type: none"> • i 7 innych 	<p>powierzchni białka.</p> <p>Enzymy z tej podrodziny wykazują wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasowej z sekwencją aminokwasową lipazy z <i>B. glumae</i>. Do tej podrodziny zalicza się lipazy bakterii Gram-ujemnych. Sekrecja tych białek odbywa się za pomocą mechanizmu II.</p>
I.3	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO1 • <i>Pseudomonas fluorescens</i> • <i>Pseudomonas</i> sp.7323 • <i>Pseudomonas entomophila</i> • <i>Serratia proteamaculans</i> • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Psychrobacter</i> sp. PR-Wf-1 • Metagenomowe DNA (NCBI nr.77133) 	<p>Masa cząsteczkowa białek należących do tej podrodziny wynosi ok. 50-65 kDa. Charakteryzują się obecnością C-terminalnej sekwencji sygnałnej zamiast N-terminalnej. Sekrecja tych białek odbywa się według mechanizmu typu I.</p>
I.4	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> • <i>Bacillus pumilus</i> • <i>Bacillus licheniformis</i> • <i>Bacillus</i> sp. NK13 • <i>Bacillus megaterium</i> • <i>Bacillus clausii</i> 	<p>Lipazy należące do tej podrodziny są najmniejszymi znanymi lipazami właściwymi. Masa cząsteczek lipaz należących do tej rodziny wynosi ~20 kDa. Enzymy te izolowano z bakterii Gram-dodatnich. Zakonserwowany pentapeptyd Gly-X-Ser-X-Gly w przypadku białek z tej podrodziny zastąpiony został pentapeptydem Ala-X-Ser-X-Gly.</p>
I.5	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus thermocatenulatus</i> • <i>Geobacillus zalihae</i> • <i>Bacillus</i> sp. L2 • <i>Geobacillus</i> sp. SF1 • <i>Bacillus stearothermophilus</i> • <i>Geobacillus kaustophilus</i> • i 5 innych 	<p>Lipazy izolowane z bakterii Gram dodatnich. Lipazy z tej podrodziny, wyizolowane z bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i> wykazują tylko ok. 15% podobieństwa sekwencji aminokwasowych względem sekwencji aminokwasowych lipaz wyizolowanych z bakterii z tego samego rodzaju, ale należących do podrodziny I.4.</p>
I.6	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus hyicus</i> • <i>Staphylococcus simulans</i> • <i>Staphylococcus xylosus</i> • <i>Staphylococcus epidermie</i> • <i>Staphylococcus haemolyticus</i> • <i>Staphylococcus warneri</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> 	<p>Do tej podrodziny należy kilka lipaz wyizolowanych z bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i>, których masa molekularna wynosi ok. 75 kDa. Charakteryzują się one obecnością N-terminalnej domeny (ok. 200 reszt aminokwasowych), która pełni rolę wewnątrzcząsteczkowego białka opiekuńczego i umożliwia ich translokację na zewnątrz komórki. Po sekrecji domena ta zostaje odcięta. Dojrzałe białko ma masę cząsteczkową ~46 kDa.</p>

I.7	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptomyces cinnamoneus</i> • <i>Propionibacterium agnes</i> • <i>Corynebacterium glutamicum</i> 	Enzymy z tej podrodziny wykazują znaczące podobieństwo do lipaz z podrodziny I.2 w centralnej części tego białka (od 50 do 150 reszty aminokwasowej). Dwa poznane enzymy tj. lipaza z <i>Streptomyces cinnamoneus</i> i <i>Propionibacterium agnes</i> mają masy molekularne kolejno 29,2 i 36,6 kDa.
I.8	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> • <i>Hahella chejuensis</i> • <i>Colwellia psychrerythraea</i> • <i>Pseudoalteromonas tunicata</i> 	Podrodzina ta reprezentuje nową podrodzinę lipaz, która została ustanowiona w oparciu o zidentyfikowaną i scharakteryzowaną lipazę Lip1 z psychrofilnej bakterii <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> . Lip1 ma masę molekularną równą 51 kDa i jest związana z błoną komórkową. Ponadto, w sekwencji aminokwasowej tego białka wyróżnić można nowy motyw LGG(F/L/Y)STG, który traktuje się jako nowe centrum aktywne, zamiast pentapeptydu GX SXG.

3.7.2 Rodzina II - GDSL

Enzymy lipolityczne należące do II rodziny charakteryzują się brakiem ewolucyjnie zakonserwowanego pentapeptydu Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly. Zamiast niego białka te w swojej sekwencji aminokwasowej posiadają motyw Gly-Asp-Ser-Leu (GDSL). Aktywna katalitycznie reszta seryny znajduje się bliżej N-końcowej części białka niż w przypadku pozostałych enzymów lipolitycznych z innych rodzin. Rodzinę hydrolaz GDSL ustanowiono w 1995 roku (Hausmann i in., 2010).

W drugiej rodzinie enzymów lipolitycznych wyróżnić można podgrupę hydrolaz SGNH. Reszty aminokwasowe składające się na ten motyw, tj. reszta seryny, glicyny, asparagianinu i histydyny, pełnią kluczową rolę w reakcji katalitycznej i znajdują się w obrębie ewolucyjnie zakonserwowanych bloków sekwencji aminokwasowych. Aktywna katalitycznie reszta seryny występuje w I bloku, natomiast reszta glicyny i asparagianinu kolejno w II i III bloku, pełniąc funkcje donorów protonu dla wnęki oksyanionowej. W bloku V znajduje się reszta histydyny, która zwiększa

nukleofilowość katalitycznej reszty seryny poprzez deprotonację jej grupy hydroksylowej.

Niektóre hydrolazy GDSL, np. te pochodzące z *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* i *Photobacterium luminescens*, posiadają dodatkową domenę znajdującą się w C-terminalnej części białka i stanowiącą około jednej trzeciej cząsteczki całego białka. Domena ta składa się z 12 β -kartek, które tworzą β -beczkę kotwiczącą enzym w błonie zewnętrznej bakterii. N-koniec białka pełni funkcję katalityczną i jest transportowany na zewnątrz komórki przez strukturę β -beczki. Enzymy tej grupy zidentyfikowano w kilku chorobotwórczych bakteriach i nazwano je autotransporterami. Białka te odpowiadają za wirulencję mikroorganizmów, które je produkują (Hausmann i in., 2010).

3.7.3 Rodzina III

Do tej rodziny należą zewnątrzkomórkowe enzymy lipolityczne izolowane z bakterii z rodzajów *Streptomyces* i *Moraxella*. Lipazy z rodziny trzeciej charakteryzują się masą cząsteczkową wynoszącą 32-35 kDa (Hausmann i in., 2010).

3.7.4 Rodzina IV

Do rodziny czwartej zaliczono esterazy pochodzące z bakterii zarówno psychrofilnych, mezofilnych jak i termofilnych. Sekwencja aminokwasowa tych białek wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji aminokwasowej ssaczej lipazy HSL (ang. hormone-sensitive lipase). Jednak białka z tej rodziny różnią się od ssaczej lipazy HSL spektrum substratowym. Ssacza lipaza HSL wykazuje wysoką specyficzność substratową zarówno wobec krótkołańcuchowych estrów jak i wobec nierozpuszczalnych w wodzie substratów takich jak trójoctan glicerolu, laurynian winylu, oliwa z oliwek. Bakteryjne esterazy z rodziny IV wykazują wysoką aktywność tylko w stosunku do estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych jak tributeryna i propionian winylu (Hausmann i in., 2010).

3.7.5 Rodzina V

Enzymy tej rodziny pochodzą z bakterii o różnych wymaganiach względem zakresu temperatur optymalnych dla ich wzrostu, psychro-, mezo-, termofili. Enzymy

lipolityczne tej grupy izolowane są z bakterii z rodzajów *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Moraxella*. Wykazują podobieństwo do innych bakteryjnych enzymów posiadających strukturę charakterystyczną dla α/β hydrolaz, ale nie wykazujących właściwości lipolitycznych takich jak hydrolazy epoksydowe, dehalogenazy, haloperoksydazy (Hausmann i in., 2010).

3.7.6 Rodzina VI

Do tej grupy należą białka o małej masie cząsteczkowej (23-26 kDa) z jednym wyjątkiem, esterazy kodowanej przez gen wyizolowany z biblioteki metagenomowej, który to enzym ma masę cząsteczkową równą 31,6 kDa (Kim i in., 2006). Enzymy lipolityczne z rodziny szóstej wykazują podobieństwo sekwencji aminokwasowej (ok. 40%) do sekwencji aminokwasowej lizofosfolipazy pochodzenia eukariotycznego (Arpigny i Jaeger, 1999). Karboksyoesteraza z *Pseudomonas fluorescens* była pierwszym scharakteryzowanym enzymem należącym do tej rodziny. Natywny enzym z *P. fluorescens* jest dimerem i wykazuje aktywność wobec estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, tj. maślanu *p*-nitrofenylu i octanu *p*-nitrofenylu (Hausmann i in., 2010).

3.7.7 Rodzina VII

Esterazy należące do tej rodziny charakteryzują się masą cząsteczkową ok. 55 kDa i wykazują wysokie podobieństwo do esteraz acetylocholinowych oraz karboksyoesterazy znajdującej się w wątrobie i jelicie. Do białek rodziny siódmej należą enzymy lipolityczne pochodzące z *Bacillus* sp., *Peonibacillus* sp., *Geobacillus* sp. (Hausmann i in., 2010).

3.7.8 Rodzina VIII

Enzymy lipolityczne z tej rodziny różnią się znacznie od wszystkich innych lipaz i esteraz dotychczas scharakteryzowanych i należących do α/β -hydrolaz. Wykazują natomiast wysokie podobieństwo strukturalne do β -laktamaz i DD-peptydaz (Hausmann i in., 2010).

3.8 Biologiczna funkcja lipaz

Regulacja ekspresji genu kodującego lipazę u wielu bakterii chorobotwórczych z rodzaju *Pseudomonas* zależna jest od mechanizmu quorum-sensing (QS). Jako że mechanizm ten reguluje ekspresję genów związanych z wirulencją, niektóre z lipaz uznawane są za czynniki wirulencji bakterii. Przykładem może być oportunistyczna bakteria *Pseudomonas aeruginosa*, która wywołuje infekcję układu oddechowego pacjentów z mukowiscydozą. Lipaza oraz fosfolipaza C z *P. aeruginosa* mogą rozkładać L- α -dipalmitylfosfatydylocholina (DPPC), główny składnik surfaktantu płucnego, który obniża napięcie powierzchniowe (Hausmann i in., 2010).

Lipazy uczestniczą w rozkładzie lipidów, których produkty mogą stać się źródłem węgla dla mikroorganizmów wytwarzających te enzymy. Dobrym przykładem jest bakteria *P. aeruginosa* YS-7 zdolna do wzrostu w niszy ekologicznej jaką jest emulsja olejowa o niskiej zawartości wody (1%). Poziom ekspresji genów kodujących lipazy może być stymulowany poprzez zastosowanie związków hydrofobowych jako dodatków do hodowli mikroorganizmów produkujących te enzymy. Lipazy biorą udział w rozkładzie alkanów, jednakże dokładny mechanizm tego procesu dotychczas nie został w pełni poznany (Hausmann i in., 2010).

3.9 Biologiczna funkcja esteraz

Bakteryjne esterazy pełnią ważną biologiczną funkcję, gdyż regulują interakcję i komunikację międzygatunkową. Niektóre esterazy są zdolne do degradacji cząsteczek sygnalnych QS. Przykładem może być esteraza *Pseudomonas fluorescens*, która degraduje laktony będące sygnałami QS w wielu gatunkach bakterii należących do rodzaju *Pseudomonas* (Hausmann i in., 2010).

Gatunki z rodzaju *Clostridium* i *Lactobacillus* mogą rozkładać ścianę komórkową roślin poprzez produkcję esteraz katalizujących hydrolizę wiązań estrowych między kwasami hydroksycynamonowymi a cukrami (Hausmann i in., 2010).

Esteraza EstV *Helicobacter pylori* jest bezpośrednio związana z rozwojem wrzodów trawiennych i raka żołądka. Bakteria ta ma zdolność do degradacji śluzu trawiennego, co dzieje się za sprawą esterazy EstV (Hausmann i in., 2010; Olukoshi i Packter, 1994).

Esterazy z bakterii z rodzaju *Streptomyces* hydrolizują wybrane triacyloglicerole do kwasów monokarboksylowych i glicerolu, które następnie służą jako źródło węgla do syntezy antybiotyków (Hausmann i in, 2010).

Ponadto, esterazy bardziej niż lipazy odpowiadają za wirulencję chorobotwórczych bakterii. Esteraza EstA z *Pseudomonas aeruginosa* została zidentyfikowana jako białko autotransporterowe uczestniczące w procesie wirulencji tych bakterii (Hausmann i in., 2010).

3.10 Zastosowanie enzymów lipolitycznych

3.10.1 Produkcja detergentów

Detergenty wykorzystywane przez nas w życiu codziennym charakteryzują się podobnym składem i mechanizmem działania. Nowoczesne środki czyszczące w swym składzie mają jeden bądź kilka enzymów, tj. proteazy, amylazy, celulazy i lipazy. Enzymy lipolityczne w detergentach używane są m.in. do usuwania plam z materiałów tekstylnych. Enzym o aktywności lipolitycznej w detergencie tworzy kompleks tkanina-lipaza, który usuwa tłuste plamy i zapobiega denaturacji enzymu w obecności środków powierzchniowo czynnych obecnych w detergencie oraz pod wpływem podwyższonej temperatury. Tworzący się kompleks podczas prania pozostaje na powierzchni tkaniny, nie traci aktywności po wysuszeniu tkaniny, a także podczas jej przechowywania i noszenia. Lipazy stosowane w detergentach muszą charakteryzować się niską specyficznością substratową, wykazywać stabilność i aktywność w środowisku alkalicznym (pH 10-11) i temperaturze 30-60°C, a także w obecności substancji powierzchniowo czynnych oraz innych enzymów, przede wszystkim proteaz. Szacuje się, iż każdego roku około 1000 ton lipaz wykorzystywanych jest do produkcji 13 miliardów ton detergentów (Hasan i in., 2010). Pierwszą wprowadzoną na rynek lipazą był preparat enzymu o nazwie „Lipolase” firmy Novo Nordisk. Enzym z *Thermomyces lanuginosus* produkowany był w *Aspergillus oryzae* (Jaeger, 1998). Obecnie istnieje wiele komercyjnie dostępnych preparatów lipaz m.in. Lumfast (enzym z *Pseudomonas mendocina*) i Lipomax (enzym z *Pseudomonas alcaligenes*) firmy Genencor International, a także enzymy lipolityczne z *Pseudomonas glumae* (Unilever) i *Bacillus pumilus* (Solvay) (Gupta i in., 2004), które są wykorzystywane przy produkcji środków piorących.

3.10.2 Przemysł spożywczy

Tłuszcze i oleje są głównymi składnikami żywności. Właściwości fizyczne i odżywcze triglicerydów, a także ich walory smakowe zależą od wielu czynników. Wśród tych czynników wymienić należy m.in. długość łańcucha węglowodorowego oraz stopień jego nienasylenia, jak również rodzaj kwasów monokarboksylowych oraz ich położenie w szkieletcie triglicerydów. Enzymy lipolityczne stosuje się w celu modyfikacji właściwości tłuszczów. Poprzez reakcje katalizowane przez lipazy i esterazy możliwe są zmiany położenia kwasów monokarboksylowych w cząsteczce triglicerydu lub zastępowanie wybranych reszt kwasów monokarboksylowych innymi (Sharma i in., 2001; Andualema i in., 2012).

Enzymy lipolityczne wykorzystywane są przy produkcji olejów roślinnych. Ich użycie pozwala na zwiększenie w nich m.in. zawartości kwasu oleinowego, a także zmniejszenie ich kaloryczności (Andualema i in., 2012).

Enzymy lipolityczne służą także do syntezy estrów z krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych i alkoholi, stanowiących związki zapachowe i smakowe w żywności. Wzbogacają one smak wielu produktów codziennego użytku tj. sera, masła, margaryny, wielu napojów alkoholowych, mlecznej czekolady i innych słodczy (Sharma i in., 2001; Andualema i in., 2012).

Enzymy lipolityczne są także stosowane w procesie odtłuszczania mleka. Ponadto, lipazy stosuje się w celu poprawy smaku oraz przyspieszania procesu dojrzewania serów, np. enzym z *Penicillium roqueforti* odpowiedzialny jest za charakterystyczny zapach oraz smak serów pleśniowych. Enzymy te wykorzystuje się również w przetwórstwie produktów seropodobnych. Stosuje się je przy produkcji EMC (ang. Enzyme Modified Cheeses), czyli serów modyfikowanych enzymatycznie. Sery te inkubuje się w obecności enzymów w podwyższonej temperaturze. W ten sposób dochodzi do wyprodukowania skoncentrowanego „smaku sera”, następnie wykorzystywanego do produkcji innych produktów takich jak sosy, zupy, chipsy i inne produkty spożywcze (Hasan i in., 2006).

Lipazy używane są także w celu polepszenia walorów smakowych zabielaaczy do kawy - wytworzenia kremowego smaku, jak również dla uzyskania maślanej struktury toffi czy karmelu.

Warunki fermentacji oraz rodzaj lotnych substancji, które powstają w czasie enzymatycznego rozpadu lipidów błonowych wpływają na smak i jakość czarnej

herbaty. W tym celu, do produkcji czarnej herbaty stosowane są głównie enzymy z *Rhizomucor miehei*, których aktywność zwiększa poziom wielonienasyconych kwasów monokarboksylowych (Hasan i in., 2006), (Ravichandran i in., 2010).

Ponadto, lipazy stosowane są przy produkcji chudego mięsa i ryb, z których za ich sprawą usuwany jest tłuszcz. Proces ten nazywany jest biolipolizą (Andualema i in., 2012). Enzymy lipolityczne odgrywają ogromną rolę w procesach fermentacji kiełbas determinując zmiany w długołańcuchowych kwasach monokarboksylowych uwalnianych w trakcie ich dojrzewania (Andualema i in., 2012).

Kiedyś bakteryjne enzymy lipolityczne używane były również do rafinacji aromatu ryżu, modyfikacji mleka sojowego, a także do przyspieszania fermentacji wina jabłkowego (Sharma i in., 2001; Andualema i in., 2012).

Masło kakaowe znajdujące się m.in. w czekoladzie, ze względu na wysoką zawartość tłuszczu (kwasy palmitynowy i stearynowy), a także temperaturę topnienia wynoszącą około 37°C, wywołuje u osoby konsumującej produkt czekoladowy wrażenie „rozpływania się w ustach”. Obecnie, ze względu na niemożność pokrycia pełnego zapotrzebowania na ten składnik, firmy produkujące słodczyce coraz częściej korzystają z substytutów masła kakaowego. Do produkcji tańszych substytutów masła kakaowego wykorzystuje się lipazy. Przykładem jest zastosowanie w tym celu immobilizowanego enzymu lipolitycznego z *Rhizomucor miehei*. Enzym ten katalizuje reakcję transestryfikacji polegającą na wymianie reszty kwasu palmitynowego w oleju palmowym na resztę kwasu stearynowego, w wyniku czego uzyskuje się pożądany trigliceryd stearynowo-oleinowo-stearynowy – substytut masła kakaowego (Hasan i in., 2006).

Enzymy lipolityczne są też szeroko stosowane w przemyśle piekarniczym. Zwiększenie objętości bochenków, przedłużenie przydatności pieczywa do spożycia, poprawa koloru czy struktury chleba to tylko niektóre z efektów zastosowania lipaz. Przykładami enzymów wykorzystywanych w piekarnictwie są lipazy pochodzące z *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* i *Candida cylindracea* (Hasan i in., 2006).

3.10.3 Przemysł kosmetyczny

W przemyśle kosmetycznym enzymy lipolityczne stosowane są do produkcji związków chemicznych takich jak 2-etyloheksylopalmitynian, mirystynian izopropylu oraz palmitynian izopropylu, używanych jako środki zmiękczające w wielu produktach

kosmetycznych m.in. w kremach, kremach do opalania, olejkach do kąpieli (Hasan i in., 2006).

Estry woskowe to wysokocząsteczkowe estry długołańcuchowych alkoholi i długołańcuchowych kwasów. Naturalnymi źródłami estrów woskowych są olej jajoba i olej kaszalota. Zastosowanie lipaz umożliwia produkcję estrów woskowych z tańszych materiałów, a także skrócenie czasu ich produkcji, co pozwala pokryć rosnące zapotrzebowanie przemysłu kosmetycznego na te składniki (Jeager i in., 2002).

Enzymy lipolityczne mogą być też stosowane w kremach wyszczuplających oraz doustnych preparatach odchudzających, których rola polega na ułatwianiu trawienia tłuszczów znajdujących się w spożywanych pokarmach w przypadku braku lub zmniejszenia wydzielania enzymów trawiennych przez organizm (Andualema i in., 2012).

Lipazy wykorzystywane są do produkcji estrów będących składnikami perfum. Przykładem jest lipaza z *Burkholderia cepaciae*. Enzym ten stosowany jest w procesie transestryfikacji (\pm)-mentolu w celu otrzymania jednego z jego enancjomerów (-)-mentolu (Jaeger i in., 2002). Innym przykładem jest zastosowanie komercyjnie dostępnej lipazy P (Amano Enzyme Inc) do produkcji jasmonianu metylu (Kiyota i in., 2001).

3.10.4 Przemysł drzewno-papierniczy

Przemysł drzewno-papierniczy przetwarza rocznie ogromne ilości biomasy lignocelulozowej. Metody enzymatyczne, wykorzystujące między innymi lipazy, na dużą skalę wykorzystuje się od 1990 roku (Hasan i in., 2006). Trójglicerydy i woski obecne w drewnie powodują poważne problemy w produkcji celulozowo-papierniczej. Lipazy hydrolizując ok. 90% tych związków powodują, że drewno staje się bardziej hydrofilowe, co ułatwia ich dalsze usuwanie (Sharma i in., 2001; Andualema i in., 2012). Metoda enzymatyczna, oparta o wykorzystanie do tego celu lipazy z *Candida rugosa*, od 1990 roku jest stałym etapem procesów przetwarzania biomasy w przemyśle celulozowo-papierniczym (Andualema i in., 2012). Zastosowanie lipazy umożliwia uzyskanie papieru o zwiększonej intensywności bieli, a także wiąże się z oszczędnością czasu i energii, zmniejszeniem ilości powstających odpadów poprodukcyjnych i przedłużaniem żywotności maszyn produkcyjnych (Hasan i in., 2006; Andualema i in.,

2012). Enzymy lipolityczne stosowane są również do odbarwiania makulatury (Jaeger i in., 1994).

3.10.5 Przemysł farmaceutyczny i synteza organiczna

Enzymy lipolityczne wykorzystywane są w syntezie asymetrycznej związków chemicznych, katalizują kinetyczne rozdzielanie racemicznych alkoholi, kwasów, estrów, amin czy desymetryzację związków prochiralnych. Wykorzystuje się je z powodzeniem w regioselektywnych reakcjach estryfikacji lub transestryfikacji związków polifunkcyjnych. Lipazy mogą brać udział w licznych niekonwencjonalnych procesach, takich jak addycja Michaela czy reakcje aldolowe (Gotor-Fernandez i in., 2007).

Chemoenzymatyczna metoda otrzymywania propanololu - β -adrenergicznego, środka blokującego, opiera się głównie na etapie hydrolizy katalizowanej przez enzymy lipolityczne (Gotor-Fernandez i in., 2007). Związek ten wykorzystywany jest w leczeniu nadciśnienia i dławicy piersiowej. Powstający (S)-enancjomer jest 100 razy aktywniejszy niż jego enancjomer (R) (Bornscheuer i Kazlauskas, 2006). Podobnie jest w przypadku powstawania pojedynczego enancjomeru kwasu arylopropionowego - niesteroidowego środka przeciwzapalnego, czy pochodnych optycznie czynnej 1,4-dihydropirydyny będącej antagonistą jonów wapnia (Gotor-Fernandez i in., 2007; Bornscheuer i Kazlauskas, 2006).

Enzymy lipolityczne stosuje się również w produkcji baclofeny, substancji czynnej, która wykorzystywana jest w celu zmniejszenia napięcia mięśniowego w stwardnieniu rozsianym, po urazach i w chorobach rdzenia kręgowego. Działanie lipazy polega na rozdzieleniu mieszaniny enancjomerów kwasu (R,S)- β -(aminometylo)-4-chlorobenzenopropionowego używanego w procesie jej produkcji (Hasan i in., 2006).

Innym przykładem jest użycie enancjoselektywnej reakcji transestryfikacji katalizowanej przez lipazę *Pseudomonas* sp. (Amano) w celu przekształcenia racematu 2-fenoksy-1-propanolu w pojedynczy enancjomer (Sharma i in., 2001; Miyazawa i in., 1998).

Enzymy lipolityczne zwykle katalizują reakcje hydrolizy estrów w dwufazowym środowisku wodnym. Odnotowano jednak, iż lipaza z *Pseudomonas cepacia* przeprowadza reakcję hydrolizy palmitynianu nitrofenylu w rozpuszczalniku organicznym – heptanie (Sharma i in., 2001).

PUFA (ang. Polyunsaturated Fatty Acid), czyli wielonienasycone kwasy tłuszczowe, wykorzystywane są nie tylko w przemyśle farmaceutycznym, ale również w produkcji nutraceutyków i dodatków do żywności. Produkcja PUFA z lipidów zwierzęcych i roślinnych odbywa się przy użyciu lipaz bakteryjnych. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe wolne od mono- czy diglicerydów stosowane są do produkcji wielu farmaceutyków. Wymienić tu można m.in. leki obniżające poziom cholesterolu, leki trombolityczne i przeciwzapalne (Sharma i in., 2001).

Lipaza z *Serratia marcescens* wykorzystywana jest w procesie przemysłowej produkcji diltiazemu, leku z grupy antagonistów jonów wapnia, stosowanego w chorobie niedokrwiennej serca (Bornscheuer i Kazlauskas, 2006).

Enzymy lipolityczne wykorzystywane są do syntezy wielu prekursorów stosowanych do produkcji leków, m.in. leku przeciwnowotworowego - taxolu oraz lamivudinu stosowanego w terapii HIV (Bornscheuer i in., 2006), czy do produkcji popularnych substancji o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym takich jak ketoprofen, ibuprofen czy naproksen (Jeager i in., 1998; Sharma i in., 2001).

Przykładem reakcji acylacji alkoholi za pomocą katalizowanej enzymatycznie reakcji transestryfikacji jest synteza chiralnych farmaceutyków z racemicznego 3-chloro-1-fenylpropan-1-olu. Produkowane są w ten sposób trzy antydepresanty: fluoksetin, tomoxetin i inisoxetin (Gotor-Fernandez i in., 2007).

Enzymy lipolityczne katalizują też reakcję tworzenia wiązań amidowych podczas reakcji acylacji amoniaku i amin. Reakcja racematu chloropropionianu etylu z alifatycznymi i aromatycznymi aminami katalizowana przez lipazę *Candida cylindracea* jest przykładem tego typu syntezy. Enzym ten jest również biokatalizatorem w procesie formowania się chiralnych diamidów z odpowiednich diamin (Gotor, 1999).

Białka o aktywności lipolitycznej stosowane są w celu katalizy reakcji symetryzacji prochiralnego diestru w wyniku amonolizy i aminolizy. Przykładem jest reakcja 3-hydroksyglutaranu dimetylu z amoniakiem i aminami. Powstanie czystego optycznie amidoestru katalizowane jest przez enzym lipolityczny z *Candida antarctica* (Gotor, 1999).

Substratami reakcji prowadzących do wyprodukowania wielu różnych farmaceutyków są chiralne aminy. Lipazy są wykorzystywane do produkcji wielu optycznie czystych amin ze względu na zdolność katalizowania reakcji w

rozpuszczalnikach organicznych w obecności niewielkiej ilości wody. Przykładem lipazy o takich właściwościach jest ta pochodząca z *Candida antarctica* (Gotor, 1999).

Synteza karbaminianów nukleozydów mających zastosowanie w przemyśle leków odbywać się może przy udziale niektórych enzymów lipolitycznych, które charakteryzują się zdolnością do katalizowania reakcji alkoksykarbonylacji amin (Gotor, 1999).

Enzymy lipolityczne wykorzystać również można w reakcjach kondensacji stosowanych do syntezy estrów prowadzonej w rozpuszczalnikach organicznych. Zainteresowanie katalizą enzymatyczną w reakcjach kondensacji wynika ze zdolności lipaz do przeprowadzania reakcji w łagodnych warunkach oraz w jednym etapie, z pominięciem etapów zakładania i zdejmowania grup ochronnych z grup funkcyjnych. Enzymy o aktywności lipolitycznej znalazły zastosowanie do produkcji kwasu polimlekowego, laktonów oraz estrów alkilowych kwasów monokarboksylowych (Kobayashi i in., 2004).

3.10.6 Przemysł skórzany

Skóry we włóknach kolagenu zawierają tłuszcz, który przed garbowaniem skór należy częściowo bądź całkowicie usunąć. Zastąpienie w garbarniach związków chemicznych używanych w procesie namaczania, odwłazania i odtłuszczenia skór, „przyjaznymi dla środowiska” enzymami lipolitycznymi, które nie uszkadzają ich przy tym, ogranicza produkcję ścieków, które są niebezpieczne dla środowiska naturalnego (Andualema i in., 2012).

3.10.7 Przemysł tekstylny

Enzymy lipolityczne znalazły zastosowanie w przemyśle tekstylnym głównie do odtłuszczenia tkanin i zwiększenia podatności materiału m.in. na farbowanie. Na dużą skalę wykorzystuje się lipazy i α -amylazy do usuwania klejony z dżinsu i innych materiałów bawełnianych. Poliesterazy stosuje się w celu modyfikacji włókien poliestrowych, co czyni je bardziej podatnymi na dalsze modyfikacje. Zmiany te wpływają m.in. na poprawę zdolności tkaniny do pobierania związków chemicznych tj. związków kationowych zmiękczających tkaninę, barwników czy związków antystatycznych. Tkanina poliestrowa ma wiele zalet takich jak wysoka odporność na rozciąganie, wysoka sprężystość i wytrzymałość (Andualema i in., 2012).

3.10.8 Produkcja biodiesla

Biodiesel to estry długołańcuchowych kwasów monokarboksylowych i alkoholi krótkołańcuchowych takich jak metanol czy etanol. Konwencjonalna produkcja tego biopaliwa w procesie alkalicznej katalizy ma swoje wady, które wiążą się głównie z problemem oczyszczania powstającego w tym procesie glicerolu, usunięcia katalizatora i zużywania dużych ilości wody podczas procesu. Zdolność enzymów lipolitycznych do przeprowadzania procesów transestryfikacji czyni ich użycie w tym procesie potencjalnie atrakcyjnym, niekonwencjonalnym rozwiązaniem wymienionych problemów. Rozwiązanie to jest jednak bardzo kosztowne, w związku z czym podejmowane są liczne próby mające na celu obniżenie kosztów syntezy biodiesla m.in. biokataliza z udziałem enzymów immobilizowanych. Immobilizacja w tym wypadku pozwala zwiększyć stabilność użytych enzymów, a także umożliwia ich wielokrotne użycie (Andualema i in., 2012).

3.10.9 Pozostałe zastosowania

Enzymy lipolityczne mogą być wykorzystywane jako biosensory w celu analizy ilościowej uwolnionego glicerolu z triglicerydów w badanej próbce (Abhijiti in., 2012). Przykładem może być unieruchomienie lipazy na elektrodach pH/tlen w połączeniu z oksydazą glukozową. Rolą tak skonstruowanego biosensora jest oznaczanie poziomu cholesterolu we krwi (Hasan i in., 2006).

3.11 Enzymy aktywne w niskich temperaturach

Badania nad aktywnymi w niskich temperaturach enzymami wynikają z obserwowanego w ostatnich kilkunastu latach znaczącego wzrostu zainteresowania możliwością zastosowania unikalnych cech enzymów izolowanych z psychrofilii i psychrotolerantów do rozwoju nowych biotechnologii lub eliminacji „wad” w już istniejących biotechnologiach wynikających z użycia enzymów pochodzących z organizmów mezofilnych.

Zastosowanie psychrozymów w procesach przemysłowych prowadzonych w niskiej temperaturze daje wiele korzyści: a) skraca czas trwania procesów wymagających obniżonej temperatury, b) redukuje koszty wynikające z mniejszego zużycia energii podczas procesu (np. grzanie bioreaktorów), c) ogranicza przebieg

możliwych w wyższych temperaturach reakcji ubocznych mogących prowadzić do powstania niespecyficzných produktów, d) umożliwia produkcję związków labilnych termicznie, e) pozwala na ochronę termolabilnych substratów reakcji enzymatycznych i f) redukuje straty wynikające z użycia w procesie wysoce lotnych substratów. Ponadto, prowadzenie reakcji w niższej temperaturze znacznie ogranicza rozwój niekorzystnej mikroflory, tj. organizmów mezofilnych o charakterze chorobotwórczym, co jest szczególnie istotne w przemyśle spożywczym. W związku z tym prowadzone są liczne badania nad izolacją i charakterystyką biochemiczną nowych enzymów wykazujących aktywność w niskich temperaturach. Interesujące jest również poznanie mechanizmu mającego wpływ na adaptację tych enzymów do prowadzenia wydajnej katalizy w niskich temperaturach. Dotychczasowe badania wskazują na związek aktywności psychrozymów z elastycznością łańcucha polipeptydowego i stabilnością cząsteczek tych enzymów. Okazuje się, że struktura enzymu aktywnego w niskiej temperaturze jest bardzo plastyczna, dzięki czemu enzym z dużą specyficznością łączy się z substratem, nie wymagając przy tym dużych nakładów energii. Ponadto, elastyczna budowa psychrozymu wpływa na obniżenie jego termostabilności. Podwyższenie temperatury powoduje spadek aktywności enzymu lub go inaktywuje, co pozwala na łatwe kontrolowanie reakcji katalizowanej przez enzym. Łatwość inaktywacji psychrozymu po zakończeniu procesu enzymatycznego poprzez podwyższenie temperatury może być atrakcyjną cechą tych enzymów, zachęcającą do ich wykorzystania w wybranych procesach biotechnologicznych (Gerday, 2013).

Zastosowanie labilnych termicznie fosfataz alkalicznych, w miejsce stosowanej w biologii molekularnej fosfatazy z jelita cielęcego (ang. CIP, Calf Intestine Phosphatase) do m.in. defosforylacji 5'P końców cząsteczek dsDNA wektorów stosowanych w klonowaniu, ogranicza starty użytego DNA, gdyż umożliwia przeprowadzenie w jednej próbówce następujących po sobie reakcji defosforylacji wektora a następnie jego ligacji z DNA insertu. W tym przypadku nie ma konieczności usuwania fosfatazy przed reakcją ligacji, gdyż w wyniku podwyższenia temperatury dochodzi do jej inaktywacji. Przykładem takiego psychrozymu może być Antarktyczna Fosfataza firmy New England Biolabs (Feller, 2013).

Enzymy z mikroorganizmów adaptowanych do zimna posiadają zdolność do prowadzenia reakcji katalizy w niższych temperaturach niż enzymy z mikroorganizmów mezofilnych czy termofilnych, co czyni je atrakcyjnymi z punktu widzenia zastosowań przemysłowych, np. do produkcji mleka o obniżonej zawartości

laktozy. Ponieważ w ostatnich latach wzrosła liczba osób cierpiących na nietolerancję tego cukru, stosuje się mezofilne β -galaktozydazy w celu hydrolizy laktozy znajdującej się w mleku. Alternatywne zastosowanie β -galaktozidaz pochodzących z organizmów adaptowanych do zimna daje możliwość hydrolizy laktozy podczas przechowywania mleka w niskich temperaturach (skrócenie czasu produkcji mleka o obniżonej zawartości laktozy, oszczędność energii), jak również ogranicza ryzyko rozwoju niepożądaną mezofilnej mikroflory w czasie prowadzenia procesu w wyższej temperaturze (Feller, 2013; Santiago i in., 2016).

Psychrozymy są stosowane w procesach biotechnologicznych, w których podwyższenie temperatury reakcji skutkowałoby pogorszeniem właściwości organoleptycznych produktu, głównie w przemyśle spożywczym. Przykładem może być wykorzystanie aktywnej w niskiej temperaturze pektynazy w celu zmniejszenia lepkości i poprawienia klarowności soków owocowych (Gerday i in., 2000).

Psychrozymy mogą być też z powodzeniem wykorzystywane do produkcji detergentów gdyż, umożliwiają pranie w obniżonej temperaturze bez spadku ich aktywności. Efektywne usuwanie plam w niskiej temperaturze, a także ochrona materiału tj. koloru i tekstury to główne pozytywne aspekty takiego zastosowania. Na rynku środków czyszczących dominuje wykorzystanie subtylizyny (alkalicznej proteazy) produkowanej przez bakterie z gatunku *Bacillus* (Procter&Gamble). Tą aktywną w niskiej temperaturze alkaliczną proteazę stosuje się w celu usunięcia plam pochodzenia białkowego, np. plam z krwi (Feller, 2013).

Kolejne praktyczne zastosowanie psychrozymów to użycie ksylanaz aktywnych w niskich temperaturach do produkcji chleba, co poprawia jakość pieczywa m.in. poprzez zwiększenie wielkości bochenków (Feller, 2013).

Działające w rozpuszczalnikach organicznych aktywne w niskich temperaturach enzymy są użyteczne przy syntezie wysokiej jakości produktów, lotnych i labilnych termicznie, takich jak związki zapachowe i smakowe (Margesin, 2009; Santiago i in., 2016; Feller, 2013).

Enzymy z mikroorganizmów adaptowanych do zimna wykorzystywane są też w bioremediacji i ochronie środowiska m.in. umożliwiając utylizację odpadów w temperaturze otoczenia w umiarkowanym bądź zimnym klimacie (Margesin, 2009; Santiago i in., 2016; Feller, 2013).

Podsumowując, prognozuje się, że dzięki rozwojowi inżynierii genetycznej możliwa będzie produkcja coraz większej liczby rekombinowanych aktywnych w

niskich temperaturach enzymów o nowych właściwościach i aktywnościach co zwiększy skalę zastosowania psychrozymów w biotechnologicznych procesach w różnych gałęziach przemysłu.

3.11.1 Esterazy aktywne w niskich temperaturach

Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, dotychczas scharakteryzowano 30 aktywnych w niskiej temperaturze esteraz. Źródłem genów kodujących te enzymy są mikroorganizmy adaptowane do zimna i metagenomowe DNA (Tabela 2). Poniżej, przedstawiam krótką charakterystykę poszczególnych enzymów, a w podsumowaniu rozdziału porównanie najważniejszych właściwości enzymatycznych tych białek.

Źródłem genu kodującego aktywną w niskiej temperaturze esterazę CHA2 była biblioteka metagenomowa gleby antarktycznej. Wyizolowany gen esterazy o długości 1044 par zasad koduje enzym o masie cząsteczkowej wynoszącej 34,7 kDa. Wyznaczony dla tego enzymu punkt izoelektryczny wynosi 9,21. W systemie ekspresyjnym *E. coli* esteraza produkowana była w formie nierozpuszczalnej, w postaci ciał inkluzyjnych. Przywracanie natywnej struktury białka zakończyło się sukcesem i umożliwiło otrzymanie dużej ilości aktywnego enzymu. Analiza aktywności CHA2 wykazała maksymalną aktywność enzymu wobec estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych. Preferowanym substratem enzymu okazał się propionian *p*-nitrofenylu. Spadek aktywności odnotowano wraz ze wzrastającą ilością atomów węgla w łańcuchu węglowodorowym kwasu monokarboksylowego, rozpoczynając od łańcuchów zbudowanych z co najmniej 8 atomów węgla (C8). Analiza biochemiczna wykazała aktywność esterazy CHA2 w przedziale temperatury 5-40°C, z optimum w 20°C. Nie wykazano aktywności enzymu w temperaturze poniżej 5°C. Esteraza pozostawała aktywna w przedziale pH 5-12, a optymalne jej działanie odnotowano w pH 11. Ze względu na niską aktywność w przedziale pH 5-9, esteraza CHA2 została przyporządkowana do esteraz alkalifilnych (Hu i in., 2012).

Gen kodujący esterazę EstIM1 został wyizolowany z biblioteki metagenomowej uzyskanej z użyciem DNA wyizolowanego z gleby Góry Ibam w Korei Południowej. Masa cząsteczkowa esterazy kodowanej przez zidentyfikowany gen została oszacowana na około 34 kDa. Punkt izoelektryczny EstIM1 wynosi 4,32. Enzym składa się z 311 reszt aminokwasowych. Analiza sekwencji aminokwasowej i porównanie jej z sekwencjami dostępnymi w bazach danych umożliwiła zakwalifikowanie EstIM1 do IV

rodziny enzymów lipolitycznych. Białko charakteryzuje się obecnością takich sekwencji jak pentapeptyd GDSAG w pozycji 155-159 i GGGX w pozycji 84-87. Białko posiada również triadę katalityczną reszt Ser-157, Asp-252, His-159. Esteraza EstIM1 wykazywała aktywność w przedziale temperatury 1-50°C, z maksimum przy 40°C. Ponadto odnotowano znaczną aktywność EstIM1 wynosząca powyżej 60% nawet w przypadku temperatury równej 1°C. Optymalne działanie enzymu odnotowano w pH 8. Esteraza EstIM1 była stabilna w zakresie pH 6-9. Analiza specyficzności substratowej wykazała wyższą aktywność enzymu w przypadku hydrolizy estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, z najwyższą aktywnością dla propionianu *p*-nitrofenylu (C3) (Ko i in., 2012).

Szczep *Pseudoalteromonas arctica* izolowany z próbek wody pochodzących ze Spitzbergenu jest źródłem enzymu esterolitycznego EstO o masie cząsteczkowej równej 44,1 kDa. Białko to składa się z 400 reszt aminokwasowych, a jego punkt izoelektryczny określono na 6,23. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność zakonserwowanego motywu typowego dla α/β hydrolaz tj. GX SXG. EstO preferencyjnie katalizuje hydrolizę katalizę hydrolizy estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych. Najwyższą aktywność enzym wykazywał wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4). Optymalnymi warunkami dla działania esterazy EstO są pH równe 7,5 oraz temperatura wynosząca 25°C (Khudary i in., 2010).

Esteraza pochodząca ze szczepu bakterii *Pseudomonas mandeli* charakteryzowała się najwyższą aktywnością wobec octanu *p*-nitrofenylu (C2). Masę cząsteczkową białka określono na 33 kDa. Enzym esterolityczny EstK wykazywał stabilność w zakresie temperatury 4-40°C, przy czym optymalna temperatura dla jego działania wynosiła 40°C. Optymalne działanie enzym wykazywał w pH równym 8,5. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej EstK, wykazano obecność peptydu sygnałnego składającego się z 23 reszt aminokwasowych oraz zakonserwowanego ewolucyjnie motywu GX SXG (Hong i in., 2012).

Źródłem kolejnego aktywnego w niskiej temperaturze enzymu esterolitycznego o potencjalnym biotechnologicznym zastosowaniu stał się mikroorganizm pochodzący z przewodu pokarmowego kryla antarktycznego *Euphasia superba* Dana. Szczep ten sklasyfikowano jako *Pseudoalteromonas* sp. 643A. Masa cząsteczkową esterazy EstA zbudowanej z 207 reszt aminokwasowych została oszacowana na 27 kDa. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej, enzym ten zaliczono do rodziny enzymów lipolitycznych GDSL (II rodzina enzymów lipolitycznych) oraz podrodziny hydrolaz

SGNH. Esteraza EstA najefektywniej katalizuje reakcje hydrolizy estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych. Najwyższą aktywność enzym wykazywał wobec octanu *p*-nitrofenylu (C2). Enzym EstA wykazuje stabilność w zakresie pH 9,0-11,5, przy czym optymalne pH dla działania enzymu wynosiło 8,0. Maksymalną aktywność enzym wykazywał w temperaturze równej 35°C, a w temperaturze 65°C ulegał inaktywacji. W systemie ekspresyjnym *E. coli* esteraza ta produkowana była w postaci ciał inkluzyjnych. Aktywną formę enzymu uzyskano po rozpuszczeniu ciałek inkluzyjnych w moczniku i dalej na drodze renaturacji uzyskano preparat aktywnego enzymu (Ciesliński i in., 2007).

Szczep *Pseudomonas* sp. B11-1 został wyizolowany z gleby pobranej na Alasce. Produkowana przez *Pseudomonas* sp. B11-1 esteraza ma masę cząsteczkową równą 69 kDa i składa się z 637 reszt aminokwasowych. Spośród dotychczas opisanych i scharakteryzowanych esteraz aktywnych w niskiej temperaturze jest to największe białko. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej wykazano obecność motywu GDSL charakterystycznego dla II rodziny enzymów lipolitycznych, a także motywu typowego dla α - β hydrolaz. Charakterystyka biochemiczna białka wykazała, iż optymalne pH dla działania enzymu równe jest 8,0. Enzym PsEstI pozostawał stabilny w szerokim przedziale pH tj. 2,2-11,9. Optymalna temperatura dla działania tego enzymu wynosiła 45°C. Ponadto, maksymalną aktywność enzym wykazywał wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4). W systemie ekspresyjnym *E. coli* esteraza produkowana była w postaci ciał inkluzyjnych. Następnie uzyskano aktywny enzym, na drodze denaturacji w roztworze buforowym z mocznikiem a później renaturacji podczas której wyeliminowano czynnik denaturujący z roztworu buforowego, na drodze dializy (Suzuki i in., 2003).

Szczep zimnolubnej bakterii *Pseudomonas* sp. B11-1 jest źródłem dwóch enzymów lipolitycznych, tj. poza wcześniej wymienionym PsEstI, także źródłem enzymu LipP. Enzym składa się z 308 reszt aminokwasowych, a jego masa cząsteczkowa, szacowana na podstawie analizy bioinformatycznej sekwencji aminokwasowej masa cząsteczkowa jest równa 33,714 kDa. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała także obecność pentapeptydu GDSAG. Na podstawie przeprowadzonych badań biochemicznych enzymu wykazano, iż optymalne pH i temperatura dla działania LipP wynoszą 8,0 i 45°C. Preferowanym substratem esterazy okazał się maślan *p*-nitrofenylu (C4) (Choo i in., 1998).

Kolejnym scharakteryzowanym enzymem o właściwościach esterolitycznych jest EstC produkowany przez bakterie *Streptomyces coelicolor* A3(2) o optymalnej temperaturze wzrostu w 25°C. Masę cząsteczkową enzymu, na podstawie jego sekwencji aminokwasowej oszacowano na równą 34,665 kDa. Maksymalną aktywność EstC wykazywał w temperaturze 35°C oraz pH 8,5-9,0. Enzym był aktywny wobec substratów stanowiących estry krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, z największą aktywnością wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4) (Brault i in., 2012).

Enzym esterolityczny LipA z *Sorangium cellulosum* So0157-2 to kolejny przedstawiciel enzymów aktywnych wobec estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, z maksymalną aktywnością wobec octanu *p*-nitrofenylu (C2). LipA składa się z 326 reszt aminokwasowych i ma masę cząsteczkową około 35,6 kDa. W obrębie sekwencji aminokwasowej enzymu znajduje się pentapeptyd (GHSMG) oraz triada katalityczna (Ser-Asp-His). Analiza biochemiczna LipA wykazała, iż optymalne warunki dla działania tego enzymu to pH 8,0 oraz 30°C (Cheng i in., 2011).

Psychrofilna bakteria izolowana z próbki gleby antarktycznej *Psychrobacter* sp. Ant300 produkuje enzym esterolityczny o masie cząsteczkowej oszacowanej na 43,681 kDa. Analiza sekwencji aminokwasowej PsyEst wykazała obecność motywu charakterystycznego dla α/β hydrolaz. Ponadto, na podstawie wyników analizy sekwencji aminokwasowej enzym ten przyporządkowano do rodziny białek HSL, tzw. lipaz hormonozależnych. Badania wykazały, iż PsyEst odznaczał się maksymalną aktywnością w temperaturze 35°C. Preferowanym substratem enzymu okazał się heksanian *p*-nitrofenylu (C6) (Kulakova i in., 2004).

Źródłem esterazy MtEst45 o teoretycznej masie cząsteczkowej wynoszącej 45,564 kDa (495 reszt aminokwasowych) jest szczep *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. Bakteria ta izolowana była z próbki gleby pochodzącej ze wschodniego wybrzeża Republiki Korei. Teoretyczny punkt izoelektryczny białka wynosi 5,48. W obrębie sekwencji aminokwasowej esterazy znajduje się ewolucyjnie zakonserwowany motyw GX SXG, a także triada katalityczna Ser-133, Asp-237, His-265. Białko to produkowane było w systemie ekspresyjnym *E. coli*. Na podstawie przeprowadzonych badań nad właściwościami biochemicznymi enzymu MtEst45 wykazano, że preferuje on katalizowanie reakcji hydrolizy maślanu *p*-nitrofenylu (C4), z najwyższą aktywnością w temperaturze 46,27°C i pH równym 8,17. Esteraza pozostaje aktywna również w niższych temperaturach tj. 1-15°C (Lee i in., 2016).

Psychrotolerancyjna bakteria *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T o optymalnej temperaturze wzrostu równej 22°C, stała się źródłem genu kodującego esterazę EstPc o wyliczonej *in silico* masie cząsteczkowej 34,562 kDa (315 reszt aminokwasowych). Teoretyczny punkt izoelektryczny białka wynosi 6,55. Rekombinantowy enzym produkowany był w komórkach *E. coli*. Maksymalną aktywność wykazywał w 35°C i pH 8,5. EstPc w temperaturze 0-5°C wykazywał 90% aktywności (Novototskaya - Vlasova i in., 2012). Ponadto, esteraza ta została wykorzystana do stworzenia białka hybrydowego, które prócz sekwencji aminokwasowej kodującej esterazę zawierało sekwencję aminokwasową autotransportera GDSL pochodzącego również z *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. Białko hybrydowe zakotwiczone było na powierzchni komórki *E. coli* co było zamierzone, gdyż z punktu widzenia biotechnologicznego interesujące jest stosowanie całych komórek jako biokatalizatorów. Esteraza EstPc877 jest aktywnym w niskiej temperaturze białkiem, z najwyższą aktywnością w temperaturze 25°C, przy czym enzym ten wykazuje aktywność w zakresie temperatury 5-30°C (Petrovskaya i in., 2015).

Esteraza pochodząca ze szczepu bakterii *Acinetobacter venetianus* V28 rosnącego w 25°C jest białkiem składającym się z 338 reszt aminokwasowych, o teoretycznej masie cząsteczkowej wynoszącej 37,186 kDa i wyliczonym teoretycznie punkcie izoelektrycznym równym 8,38. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność zakonserwowanego motywu GX SXG i triady katalitycznej Ser-His-Asp. Esteraza V28 charakteryzuje się najwyższą aktywnością wobec kaprylanu *p*-nitrofenylu (C8), w temperaturze 40°C i pH 9,0. Ponadto, esteraza pozostaje aktywna w środowisku detergentów i rozpuszczalników organicznych, co czyni ją potencjalnie użyteczną w przemyśle detergentów i syntezie organicznej (Kim i in., 2012).

Kolejny scharakteryzowany enzym z psychrofilnej bakterii *Rhodococcus* sp. AW25M09 to esteraza RhLip. Enzym ten w komórkach *E. coli* był produkowany w postaci nieaktywnej tj. ciał inkluzyjnych, jednak został z powodzeniem zrenaturowany i zbadany pod kątem jego właściwości biochemicznych. Enzym preferuje katalizę reakcji hydrolizy estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych z maksymalną aktywnością wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4), w temperaturze 30°C i pH 11. RhLip charakteryzuje się tolerancją na różne stężenia chlorku sodu, a także aktywnością w związkach organicznych. Ponadto, zmniejszająca się stabilność białka powyżej 30°C, a co za tym idzie łatwa inaktywacja enzymu w wyższych temperaturach czyni go interesującym biokatalizatorem do zastosowań przemysłowych, np. w przemyśle

spożywczym gdzie ważne jest zachowanie smaku i struktury żywności (De Santi i in., 2014).

Szczep *Photobacterium* sp. MA1-3 jest źródłem esterazy MA1-3 o masie cząsteczkowej wynoszącej 35 kDa (315 reszt aminokwasowych) i punkcie izoelektrycznym określonym na 6,06. W obrębie sekwencji aminokwasowej znaleźć można zakonserwowany ewolucyjnie pentapeptyd GX SXG. Przeprowadzona analiza biochemiczna esterazy MA1-3 produkowanej w komórkach *E. coli* wykazała, iż najwyższą aktywność enzym wykazuje w 30°C i pH 8,0. Enzym efektywnie katalizuje hydrolizę estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych z maksymalną aktywnością wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4). W temperaturze 5°C esteraza pozostaje aktywna (45% maksymalnej aktywności). Wysoka aktywność MA1-3 i niska wartość energii aktywacji w zakresie 5-50°C sugeruje, że enzym mógłby zostać z powodzeniem zastosowany jako biokatalizator oraz dodatek enzymatyczny do detergentów (Kim i in., 2013).

Esteraza pochodząca ze szczepu bakterii *Salinisphaera* sp. P7-4, dla którego optymalna temperatura wzrostu to 25°C, składa się z 316 reszt aminokwasowych i ma teoretyczną masę cząsteczkową oszacowaną na 34,443 kDa. Sekwencja aminokwasowa P7-4 charakteryzuje się obecnością motywu GX SXG i triady katalitycznej (Ser-Asp-His). Enzym należy do grupy psychrozymów, gdyż wykazuje aktywność w zakresie temperatur 5-25°C (Kim i in., 2011).

Psychrofilna bakteria *Thalassospira* sp. GB04J01 stała się źródłem genu kodującego esterazę ThaEst2349, wyprodukowaną w systemie ekspresyjnym *E. coli*, wykazującą największą aktywność w temperaturze 45°C i pH równym 8,5. Enzym ten charakteryzuje się zdolnością do katalizowania reakcji hydrolizy krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, z najwyższą aktywnością wobec octanu *p*-nitrofenylu (C2). Analiza sekwencji aminokwasowej białka wykazała obecność triady katalitycznej Ser-158, His-285, Asp-255. W świetle przedstawionych wyników dotyczących aktywności enzymu ThaEst2349 w temperaturze 30-60°C i niższej, a także w środowisku alkalicznym stwierdzono, że enzym z powodzeniem mógłby być zastosowany w przemyśle chemicznym do produkcji środków czyszczących (De Santi i in., 2016).

Kolejnym z dotychczas scharakteryzowanych enzymów estereolitycznych jest esteraza rEstSL3, wyprodukowana w systemie ekspresyjnym *E. coli*, pochodząca ze szczepu *Alkalibacterium* sp. SL3. rEstSL3 ma masę cząsteczkową 24,4 kDa (211 reszt

aminokwasowych). Ze względu na właściwości biochemiczne enzymu, tj. maksymalną aktywność w 30°C, 70% aktywności w 0°C, działanie w środowisku lekko alkalicznym, a także tolerancję na wysokie stężenia soli (powyżej 5 M NaCl), jest on potencjalnie atrakcyjnym biotechnologicznie biokatalizatorem, który mógłby być wykorzystywany w przemyśle farmaceutycznym czy syntezie organicznej (Wang i in., 2016).

Mikroorganizm *Photobacterium* sp. J15 stał się źródłem genu kodującego esterazę GDSL J15, którą zaklasyfikowano do II rodziny enzymów lipolitycznych tj. esteraz GDSL. Enzym wyprodukowany w systemie ekspresyjnym *E. coli* charakteryzował się maksymalną aktywnością w 20°C i pH 8,0 wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4). Masa cząsteczkowa białka wynosiła 35,6 kDa (347 reszt aminokwasowych), a jego punkt izoelektryczny 6,3 (Shakiba i in., 2016).

Enzym Est10 pochodzący z psychrotolerancyjnej bakterii *Psychrobacter pacificensis* wykazywał aktywność w temperaturze 25°C i pH 7,5. Enzym pozostaje aktywny w 0°C (55% aktywności maksymalnej). Oszacowana *in silico* masa cząsteczkowa enzymu wynosi 24,6 kDa. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność triady katalitycznej Ser-121, Asp-173, His-204. Maksymalną aktywność Est10 wykazuje wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4) i pozostaje stabilny w środowisku o wysokim stężeniu soli (NaCl) oraz w obecności związków organicznych (Wu i in., 2013).

Esteraza Est11 pochodząca z psychrofilnej bakterii *Psychrobacter pacificensis* ma masę cząsteczkową 32,9 kDa (297 reszt aminokwasowych). Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała obecność triady katalitycznej Ser-162, Asp-239, His-273. Maksymalną aktywność enzym wykazywał w temperaturze 25°C, pH 7,5 wobec estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksyłowych, z najwyższą aktywnością wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4). Esteraza Est11 pozostaje wysoce aktywna w 10°C (70%). Enzym charakteryzuje się tolerancją na wysokie stężenia soli (5 M NaCl). Esteraza Est11 wykazuje wysoką stabilność w rozpuszczalnikach organicznych, zatem mogłaby zostać z powodzeniem wykorzystana jako biokatalizator w procesach zachodzących w środowiskach niewodnych (Wu i in., 2015).

Szczep *Psychrobacter celer* 3Pb1 stał się źródłem kolejnej aktywnej w niskiej temperaturze esterazy Est12. Masę cząsteczkową enzymu oszacowano na podstawie jego sekwencji aminokwasowej na 35,150 kDa (329 reszt aminokwasowych). Enzym charakteryzował się maksymalną aktywnością wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4) w temperaturze 35°C i pH 7,5. Ponadto, enzym esterolityczny Est12 toleruje wysokie

stężenie soli (4,5 M NaCl). Właściwości biochemiczne enzymu wskazują na możliwość jego zastosowania w przemyśle, m.in. do bioremediacji gleb i przy produkcji związków farmaceutycznych (Wu, Zhang i in., 2013).

Bakteria z rodzaju *Serratia* stała się źródłem genu kodującego esterazę EstS, którego ekspresję z powodzeniem przeprowadzono w komórkach *E. coli*. Rekombinantowy enzym charakteryzował się optymalną aktywnością w 10°C i pH 8,5. Esteraza EstS pozostawała stabilna w temperaturze 0°C i wykazywała aż 92% maksymalnej aktywności enzymatycznej w tej temperaturze. Ponadto, zanotowano wzrost aktywności esterazy w obecności 4 M NaCl (Jiang i in., 2016).

Kolejna scharakteryzowana esteraza aktywna w niskiej temperaturze jest produkowana przez bakterie *Zunongwangia profunda*. EstLiu składa się z 273 reszt aminokwasowych i ma masę cząsteczkową równą 30 kDa. Sekwencja aminokwasowa esterazy charakteryzuje się obecnością triady katalitycznej (Ser-158, Asp-211, His-243). Enzym esterolityczny EstLiu wykazuje 75% aktywności w 0°C. Ponadto, jest to kolejna esteraza preferencyjnie katalizująca hydrolizę estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, z maksymalną aktywnością wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4). Właściwości enzymu, takie jak stabilność w rozpuszczalnikach organicznych i środowisku o wysokim stężeniu NaCl, stanowią o jego potencjalnym zastosowaniu w różnych gałęziach przemysłu (Rahman i in., 2016).

Podczas dojrzewania serów kluczową rolę odgrywa aktywność metaboliczna mikroorganizmów. *Lactobacillus plantarum* jest przykładem bakterii biorącej udział w tym procesie. Szczep *Lactobacillus plantarum* WCFS1 stał się źródłem genów *lp_3505* oraz *lp_2631* kodujących nowe esterazy aktywne w niskich temperaturach. Esteraza Lp_3505 wykazuje maksymalną aktywność w 5°C i pH 6,0, zaś Lp_2631 w 20°C i pH 6,5. Oba białka charakteryzują się tolerancją na wysokie stężenia NaCl co czyni je biokatalizatorami potencjalnie użytecznymi w przemyśle spożywczym, np. w procesie dojrzewania sera (Esteban-Torres i in. 2014).

Psychrotolerancyjna bakteria *Acinetobacter* sp. szczep oznaczony numerem 6, izolowana z gleby pobranej na Syberii, stała się źródłem genu *aelh* kodującego nowy, aktywny w niskiej temperaturze enzym esterolityczny AELH. Enzym najwyższą aktywność wykazywał wobec octanu *p*-nitrofenylu (C2). Sekwencja aminokwasowa tego enzymu składa się z 258 reszt aminokwasowych, a w jej obrębie wyróżnić można ewolucyjnie zakonserwowany pentapeptyd GX SXG i triadę katalityczną Asp-His-Ser. Masę cząsteczkową AELH oszacowano na 28,4 kDa. Enzym ma zdolność do katalizy

reakcji transestryfikacji w temperaturze 4°C, np. pomiędzy propionianem winylu i propanolem, a produktem reakcji jest propionian propylu. Wyniki te wskazują na przydatność esterazy AELH w syntezie organicznej (Suzuki i in., 2002).

Esteraza EstTB11 z *Pseudomonas* sp. TB11 o masie cząsteczkowej wynoszącej 65 kDa, charakteryzuje się maksymalną aktywnością w temperaturze 25°C w pH 8,5 wobec kaprylanu *p*-nitrofenylu (C8). Enzym ten zachowuje 38% swojej maksymalnej aktywności w 0°C. Badania wykazały, że enzym posiada zdolność do hydrolizy tłuszczu znajdującego się w mleku, zatem mógłby być z powodzeniem zastosowany w przemyśle spożywczym do polepszenia walorów aromatycznych mleka (Dong i in., 2015).

Kolejnym wyprodukowanym w systemie ekspresyjnym *E. coli* i scharakteryzowanym aktywnym w niskiej temperaturze enzymem esterolitycznym jest Esth pochodzący z bakterii z rodzaju *Shewanella*. Wyliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej (enzym zbudowany z 223 reszt aminokwasowych) masa cząsteczkowa tego białka wynosi 24 kDa. Esth zaklasyfikowano do VI rodziny enzymów lipolitycznych, co wyróżnia go na tle większości znanych zimnolubnych enzymów esterolitycznych należących do rodziny I lub II. W 0°C enzym wykazuje 50% swojej aktywności, a maksymalną aktywność zanotowano w pH 8,0 i 30°C wobec maślanu *p*-nitrofenylu (C4) (Hang i in., 2016).

Podsumowując przedstawione powyżej informacje oraz analizując pozostałe dane przedstawione w tabelach 2 i 3, można przedstawić kilka konkluzji.

Zgodnie z danymi zamieszczonymi w tabelach 2 i 3, masą cząsteczkową powyżej 40 kDa charakteryzują się esterazy z *Pseudomonas arctica* (44,1 kDa), *Pseudomonas* sp. B11-1 (69 kDa) i *Pseudomonas* sp. TB11 (65 kDa). Do znacznie mniejszych białek, o masie cząsteczkowej poniżej 30 kDa, należą EstA, rEstSL3, Est10, AELH, Esth i Lp_2631. Pozostałe esterazy, stanowiące większość z obecnie znanych i scharakteryzowanych esteraz aktywnych w niskiej temperaturze, mają masę cząsteczkową w zakresie 30-40 kDa (Tabela 2).

Większość z aktywnych w niskiej temperaturze esteraz (20 enzymów z tabeli 2) charakteryzuje się obecnością w obrębie sekwencji aminokwasowej zakonserwowanego pentapeptydu GX SXG, charakterystycznego dla enzymów należących do I rodziny enzymów lipolitycznych. Cztery enzymy z zamieszczonych w tabeli 2, tj. EstA, PsEstI, AT877 i esteraza J15 GDSL, należą do II rodziny enzymów lipolitycznych, gdyż charakteryzują się obecnością motywu GDSL zamiast GX SXG. Wyjątkiem jest esteraza

Est12 (Wu, Zhang i in., 2013) należąca do potencjalnie nowej rodziny enzymów lipolitycznych, która nie klasyfikuje się do żadnej z ośmiu rodzin już istniejących oraz Esth zaklasyfikowana do rodziny VI enzymów lipolitycznych (Hang i in., 2016).

Ponadto, większość aktywnych w niskiej temperaturze esteraz preferuje katalizę reakcji hydrolizy estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych tj. octanu (C2), propionianu (C3) i maślanu *p*-nitrofenylu (C4). Z kolei, PsyEst maksymalną aktywność wykazuje wobec heksanianu *p*-nitrofenylu (C6), zaś V28 i EstB11 wobec kaprylanu *p*-nitrofenylu (C8) (Tabela 2).

Większość esteraz aktywnych w niskich temperaturach nie jest stabilna w temperaturach wyższych niż optymalne. Podwyższenie temperatury skutkuje obniżeniem aktywności enzymów bądź ich inaktywacją. Przykładem może być esteraza PsEstI, która najwyższą aktywność wykazuje w 45°C, zaś 30 minutowa inkubacja w temperaturze o 5°C wyższej niż optymalna ją inaktywuje. Ta sama sytuacja występuje m.in. w przypadku esterazy EstC ($T_{opt} = 35^{\circ}\text{C}$, 1h inkubacja w 40°C inaktywuje enzym) i esterazy ThaEst2349 ($T_{opt} = 45^{\circ}\text{C}$, 20 min inkubacja w 50°C, sprawia, że enzym wykazuje zaledwie 10% maksymalnej aktywności) (Tabela 2).

Esterazy aktywne w niskich temperaturach działają głównie w środowisku lekko alkalicznym (pH 7,5-9,0). Tylko dwie esterazy, tj. CH2A i RhLip, wykazują najwyższą aktywność w pH równym 11, zaś Lp_3505 i Lp_2631 w pH kolejno 6,0 i 6,5 (Tabela 2).

Spośród scharakteryzowanych pod względem parametrów kinetycznych esteraz, LipA, EstC, PsyEst, REstSL3, EstS posiadają wysoką wydajność katalityczną (Tabela 3). Najwyższą wartością parametru k_{cat} , określającego liczbę cząstek produktu jaki powstaje w jednostce czasu przy wysyceniu enzymu substratem charakteryzują się esterazy EstS ($2,339 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$) i rEstSL3 ($307,69 \text{ s}^{-1}$) (Tabela 3).

3.11.1.1 Esterazy aktywne w niskich temperaturach - zastosowanie

W świetle przeanalizowanych przeze mnie danych literaturowych, na dzień dzisiejszy żadna ze scharakteryzowanych aktywnych w niskich temperaturach esteraz nie została jeszcze wdrożona do użycia w przemyśle. W większości prac wskazuje się jednak na kilka głównych możliwych kierunków zastosowania takich enzymów. W tych spośród wymienionych powyżej adaptowanych do zimna esteraz, które są odporne na działanie wysokich stężeń NaCl i charakteryzują się aktywnością w pH zasadowym

upatruje się nowych enzymatycznych składników środków piorących i czyszczących w niskiej temperaturze, tzw. „praniu na zimno” (Kim i in., 2012; Kim i in., 2013; De Santi i in., 2016). Wiele psychrozymów izolowanych jest z mikroorganizmów pochodzących ze środowisk morskich, zatem niektóre z nich są odporne na wysokie stężenia soli. Przykładem esterazy tolerującej wysokie stężenie soli jest Est12 z *Psychrobacter celer*. Enzym ten wykazuje najwyższą aktywność i stabilność w 4,5 M NaCl. Dodatkowo, 0,5-1% (v/v) Tween 20, Tween 80, Triton X-100, CHAPS znacznie zwiększa aktywność enzymu (nawet do 200%). Ponadto, enzym Est12 wykazuje ponad połowę swojej aktywności po 1 h inkubacji z 5-30% (v/v) etanodiolem, metanolem, DMSO oraz 5-20% (v/v) izopropanolem i etanolem (Santiago i in., 2016).

Drugim kierunkiem zastosowania tych enzymów może być przemysł spożywczy (De Santi i in., 2014; Wang i in., 2016; Esteban-Torres i in., 2014; Rahman i in., 2016; Wu i in., 2013; Dong i in., 2015). Przykładem takiej obiecującej aktywnej w niskiej temperaturze esterazy jest enzym Lp_2631 pochodzący z *Lactobacillus plantarum*, którego właściwości czynią go atrakcyjnym w procesach produkcji fermentowanej żywności (Esteban-Torres i in., 2014).

Trzecim szczególnie interesującym zastosowaniem jest wykorzystanie tych enzymów do prowadzenia syntezy związków chemicznych w środowisku niewodnym lub o bardzo małej aktywności wody (Zhang i in., 2013). W mieszaninach reakcyjnych rozpuszczalniki organiczne stosuje się w celu zwiększenia rozpuszczalności hydrofobowych substratów (Santiago i in., 2016). Aktywna w niskiej temperaturze esteraza LipA pochodząca z *Sorangium cellulosum* jest dobrym przykładem enzymu charakteryzującego się stabilnością w rozpuszczalnikach organicznych (eter dietylowy, chloroform, benzen, toluen, *p*-ksylen, cykloheksan, n-heksanu, n-heptan, izooktan), a także w obecności różnych detergentów (0,1-1% (v/v) Tween 20, Tween 80, Triton X-100) (Santiago i in., 2016).

Tabela 2. Porównanie wybranych właściwości esteraz aktywnych w niskich temperaturach.

Nazwa	Źródło	Charakterystyczny motyw w sekwencji aminokwasowej	~ Masa Cząsteczkowa [kDa]	Optymalne pH	Optymalna Temperatura [°C]	Inhibitory i aktywatory	Wpływ temperatury na stabilność enzymu	pH stabilność	Preferowany substrat	Literatura
CH2A	DNA metagenomowe	GXSXG, SGH	34,7	11,0	20	Brak danych	Brak danych	Brak danych	propionian <i>p</i> -nitrofenylu (C3)	Hu i in., 2012
EstIM1	DNA metagenomowe	GXSXG, SDH	34,0	8,0	40	Inhibitory: Hg ²⁺ , Zn ²⁺ Aktywatory: brak danych	W zakresie 1-30°C enzym pozostaje stabilny. Po 40min w 35°C wykazuje 50% aktywności.	6-9	propionian <i>p</i> -nitrofenylu (C3)	Ko i in., 2012
EstO	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	GXSXG, SDH	44,1	7,5	25	Inhibitory: Al ³⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Cr ²⁺ , Co ²⁺ , β-merkaptioetanol, DTT, PMSF, EDTA; Aktywatory: Na ⁺	Po 24 h w 35°C wykazuje 35% aktywności. Po 2,5 h w 90°C wykazuje 50% aktywności.	6-10 (powyżej 60% aktywności)	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Khudary i in., 2010
EstK	<i>Pseudomonas mandelii</i>	GXSXG	33,0	8,5	40	Brak danych	Po 20 min w 60°C następuje inaktywacja enzymu.	Brak danych	octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	Hong i in., 2012
EstA	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 643A	SGNH, GDSL	23,1	8,0	35	Inhibitory: PMSF, β-merkaptioetanol, DTT, glutation, Hg ⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Sn ²⁺ Aktywatory: Ca ²⁺	Enzym w 30°C pozostaje stabilny przez 60 min.	9-11,5	octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	Cieśliński i in., 2007



Tabela 2. Porównanie wybranych właściwości esteraz aktywnych w niskich temperaturach.

PsEstI	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	GDSL, SDH	69,0	8,0	45	Inhibitory: PMSF, EDTA, Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , Mn ²⁺ , Hg ²⁺ (brak znaczącego wpływu hamującego, enzym wykazuje powyżej 70% aktywności) Aktywatory: brak	Po 60 min w 30°C wykazuje 90% aktywności. Po 30 min w 50°C następuje inaktywacja enzymu.	2,2-11,9	maślan <i>p</i> - nitrofenylu (C4)	Suzuki i in.,2003
EstC	<i>Streptomyces</i> <i>coelicolor</i> A3(2)	GXSXG, SDH	34,7	8,5-9,0	35	Inhibitory: Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , ,DTT, PMSF Aktywatory: brak danych	Po 60 min w 40°C następuje inaktywacja enzymu.	6-11	maślan <i>p</i> - nitrofenylu (C4)	Brault i in., 2012
LipA	<i>Sorangium</i> <i>cellulosum</i> So0157-2	GXSXG, SDH	35,6	8,0	30	Inhibitory: Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ , Hg ²⁺ ; Aktywatory: Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Po 30 min w 55°C wykazuje 20% aktywności.	6-9	octan <i>p</i> - nitrofenylu (C2)	Cheng i in.,2011
LipP	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	GXSXG	33,7	8,0	45	Inhibitory: Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Hg ²⁺ ; Aktywatory: EDTA (nieznacznie)	Po 20 min w 70°C następuje inaktywacja enzymu. W zakresie 30- 40°C enzym pozostaje stabilny (powyżej 88% aktywności).	Brak danych	maślan <i>p</i> - nitrofenylu (C4)	Choo i in.,1998
PsyEst	<i>Psychrobacter</i> sp. Ant300	HSL, GXSXG, SDH	43,7	Brak danych	35	Inhibitory: Hg ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , EDTA, PMSF; Aktywatory: Ca ²⁺	Po 16 min w 40°C wykazuje 50% aktywności.	Brak danych	heksanian <i>p</i> - nitrofenylu (C6)	Kulakova i in., 2004
MtEst45	<i>Microbulbifer</i> <i>thermotolerans</i> DAU221	GXSXG, SDH	45,6	8,0	46	Inhibitory: PMSF, Hg ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ⁺ ; β-merkaptioetanol (silny wpływ hamujący), EDTA (nieznaczny wpływ hamujący); Aktywatory: brak	Enzym pozostaje stabilny 3 h w zakresie 25-30°C. Po 3h w 60°C wykazuje 18% aktywności.	Brak danych	maślan <i>p</i> - nitrofenylu (C4)	Lee i in.,2016

Tabela 2. Porównanie wybranych właściwości aktywnych w niskich temperaturach.

EstPc877	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5 ^T	GDSL, SDH	66,0	Brak danych	25	Inhibitory: PMSF, SDS, metanol Aktywatory: brak danych	Brak danych	Brak danych	dekanian <i>p</i> -nitrofenylu (C10)	Petrovskaya i in., 2015
V28	<i>Acinetobacter venetians</i> V28	GXSXG, SDH	37,2	9,0	40	Inhibitory: Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺ Aktywatory: Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Ni ²⁺ , EDTA	Brak danych	Brak danych	kaprylan <i>p</i> -nitrofenylu (C8)	Kim i in., 2012
RhLip	<i>Rhodococcus</i> sp. AW25M09	GTSXGG, SDH	38,0	11,0	30	Inhibitory: Ca ²⁺ Aktywatory: Mg ²⁺ , EDTA	Po 2h w 50°C wykazuje 20% aktywności.	Brak danych	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	De Santii in., 2014
MA1-3	<i>Photobacterium</i> sp. MA1-3	GXSXG, SDH	35,0	8,0	30	Inhibitory: Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ Aktywatory: Mg ²⁺	Enzym pozostaje stabilny w zakresie 5-40°C. Powyżej 50°C enzym traci aktywność.	7-10	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Kim i in., 2013
P7-4	<i>Salinisphaera</i> sp. P7-4	GXSXG, SDH	34,4	9,0	25	Inhibitory: Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Ni ²⁺ , Zn ²⁺ , PMSF; Aktywatory: EDTA (nieznaczący wpływ)	Po 30 min w 50°C wykazuje ok. 20% aktywności. Po 30 min w 70°C następuje inaktywacja enzymu.	Brak danych	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Kim i in., 2011
ThaEst2349	<i>Thalassospira</i> sp. GB04J01	GXSXG, SDH	35,0	8,5	45	Inhibitory: Cr ²⁺ , Fe ²⁺ , Cr ²⁺ , Co ²⁺ Aktywatory: Li ⁺ , Sn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , DTT EDTA, PMSF, β-merkaptotetanol (nieznaczący wpływ)	Po 20 min w 50°C wykazuje 10% aktywności.	Brak danych	octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	De Santii in., 2016
rEstSL3	<i>Alkalibacterium</i> sp. SL3	SDH	24,0	9,0	30	Inhibitory: Ag ⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Hg ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Cr ³⁺ Aktywatory: Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , β-merkaptotetanol, EDTA	Enzym pozostaje stabilny przez ponad 60 min w 50°C. Po 2 min w 60°C następuje inaktywacja enzymu.	Brak danych	octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	Wang i in., 2016

Tabela 2. Porównanie wybranych właściwości esteraz aktywnych w niskich temperaturach.

EstPc	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5 ^T	GXSXG, SDH	35,6	8,5	35	Inhibitory: Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Mg ²⁺ Aktywatory: Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , EDTA	Po 60min w 80°C wykazuje powyżej 60% aktywności.	Brak danych	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Novototskaya-Vlasovai in.,2012
Esteraza J15 GDSL	<i>Photobacterium</i> sp. J15	GDSL, SGNH, SDH,	36,0	8,0	20	Inhibitory: Li ⁺ , Rb ⁺ , Cs ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Fe ³⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , EDTA, PMSF, Aktywatory: DTT, β-merkaptioetanol	Po 3h w 25°C następuje inaktywacja enzymu.	Brak danych	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Shakiba i in., 2016
Est11	<i>Psychrobacter pacificensis</i>	GXSXG, SDH	33,0	7,5	25	Inhibitory: Zn ²⁺ , Cu ²⁺ ; Aktywatory: Mn ²⁺ , EDTA	Po 20 min w 70°C następuje inaktywacja enzymu.	Brak danych	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Wu i in., 2015
Est12	<i>Psychrobacter celer</i> 3Pb1	SDH	35,2	7,5	35	Inhibitory: Zn ²⁺ , Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , EDTA, PMSF; Ca ²⁺ Aktywatory: DTT(nieznaczący wpływ)	Po 15 min w 50°C następuje inaktywacja enzymu. Enzym pozostaje stabilny do 40°C.	6-10	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Wu, Zhang i in., 2013
Est10	<i>Psychrobacter pacificensis</i>	GXSXG, SDH	24,6	7,5	25	Inhibitory: DTT, PMSF Aktywatory: Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , EDTA	Po 2h w 50°C wykazuje 34,2% aktywności. Po 20 min w 60°C wykazuje 20% aktywności.	7-10	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Wu i in., 2013
EstS	<i>Serratia</i> sp.	GXSXG, SDH	32,5	8,5	10	Inhibitory: Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , PMSF Aktywatory: Mg ²⁺ , Mn ²⁺	Po 50 min w 50°C wykazuje 41,23% aktywności. Po 20 min w 55°C następuje inaktywacja enzymu.	5,5-9,5	octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	Jiangi in., 2016
EstLiu	<i>Zunongwangia profunda</i>	GXSXG, SDH	30,0	8,0	30	Inhibitory: Fe ³⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺ , PMSF, Ba ²⁺ , K ⁺ , Ni ²⁺ , β-merkaptioetanol, DTT, EDTA	Po 2 h w 50°C wykazuje 5% aktywności. Po 2h w 40°C wykazuje 56% aktywności.	Brak danych	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Rahman i in.,2016

Tabela 2. Porównanie wybranych właściwości esteraz aktywnych w niskich temperaturach.

Lp_3505	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Brak danych	30,0	6,0	5	Brak danych	Po 20 h w 20°C wykazuje powyżej 60% aktywności.	Brak danych	octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	Esteban-Torres i in., 2014
Lp_2631	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	Brak danych	28,0	6,5	20	Inhibitory: Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ Aktywatory: Mn ²⁺	Po 20h w 20°C wykazuje do 80% aktywności. Po 4h w 30°C wykazuje 50% aktywności.	Brak danych	octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	Esteban-Torres i in., 2014
AELH	<i>Acinetobacter</i> sp. szczep nr. 6	GXSXG, SDH	28,4	7,5-8,0	25	Inhibitory: Cu ²⁺ , PMSF, SDS; Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺ (nieznaczący wpływ hamujący) Aktywatory: brak danych	Po 30 min w 40°C wykazuje 90% aktywności. Powyżej 50°C następuje inaktywacja enzymu.	Brak danych	octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	Suzuki i in., 2002
EstTB11	<i>Pseudomonas</i> sp. TB11	Brak danych	65,0	8,5	25	Inhibitory: Ca ²⁺ , Al ³⁺ , Mn ²⁺ , Fe ³⁺ Aktywatory: K ⁺ , Na ⁺ , Mg ²⁺	Po 15 min w 55°C wykazuje 8% aktywności.	7-10	kaprylan <i>p</i> -nitrofenylu (C8)	Dong i in., 2015
Esth	<i>Shewanella</i> sp.	GXSXG, SDH	24,0	8,0	30	Inhibitory: Zn ²⁺ Aktywatory: Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Co ⁺ , Cu ²⁺ , Ni ⁺ , Ca ²⁺	Po 20 min w 55°C wykazuje 50%. W 60°C następuje inaktywacja enzymu.	Brak danych	maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	Hang i in., 2016

Tabela 3. Porównanie parametrów kinetycznych esteraz aktywnych w niskich temperaturach.

Nazwa	Źródło	Parametry kinetyczne			Literatura
		Km [mM]	kcat [s ⁻¹]	kcat/Km [mM ⁻¹ s ⁻¹]	
CH2A	DNA metagenomowe	0,44	0,23	0,523	Hu i in., 2012
EstIM1	DNA metagenomowe	0,2903	0,0168	0,05787	Ko i in., 2012
EstO	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	0,511	-	-	Khudary i in., 2010
EstK	<i>Pseudomonas mandelii</i>	0,106	2, 318	21,87	Hong i in., 2012
EstA	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 643A	-	-	-	Ciesliński i in., 2007
PsEstI	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	~0,3 (45°C)	-	-	Suzuki i in., 2003
EstC	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	0,27	199	737	Brault i in., 2012
LipA	<i>Sorangium cellulosum</i> So0157-2	0,174	29,225	168,114	Cheng i in., 2011
LipP	<i>Pseudomonas</i> sp. B11-1	~0,02 (45°C)	-	-	Choo i in., 1998
PsyEst	<i>Psychrobacter</i> sp. Ant300	0,07	58	828	Kulakova i in., 2004
MtEst45	<i>Microbulbifer thermotolerans</i> DAU221	0,0998	-	-	Lee i in., 2016
AT877	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5 ^T	-	-	-	Petrovskaya i in., 2015
V28	<i>Acinetobacter venetianus</i> V28	-	-	-	Kim i in., 2012
RhLip	<i>Rhodococcus</i> sp. AW25M09	0,753	1,63	2,16	De Santi i in., 2014
MA1-3	<i>Photobacterium</i> sp. MA1-3	-	-	-	Kim i in., 2013
P7-4	<i>Salinisphaera</i> sp. P7-4	-	-	-	Kim i in., 2011
ThaEst2349	<i>Thalassospira</i> sp. GB04J01	0,94	47,7	50,6	De Santi i in., 2016
rEstSL3	<i>Alkalibacterium</i> sp. SL3	0,15	307,69	-	Wang i in., 2016
EstPc	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5 ^T	-	-	-	Novototskaya-Vlasova i in., 2012
Esteraza J15 GDSL	<i>Photobacterium</i> sp. J15	-	-	-	Shakiba i in., 2016

Tabela 3. Porównanie parametrów kinetycznych esteraz aktywnych w niskich temperaturach.

Est11	<i>Psychrobacter pacificensis</i>	-	-	-	Wu i in., 2015
Est12	<i>Psychrobacter celer</i> 3Pb1	0,069	4,2	60,72	Wu, Zhang i in., 2013
Est10	<i>Psychrobacter pacificensis</i>	0,57667	3,92	-	Wu i in., 2013
EstS	<i>Serratia</i> sp.	0,074	2339	316000	Jiang i in., 2016
EstLiu	<i>Zunongwangia profunda</i>	0,121	110	900	Rahman i in., 2016
Lp_3505	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	-	-	-	Esteban-Torres i in., 2014
Lp_2631	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	-	-	-	Esteban-Torres i in., 2014
AELH	<i>Acinetobacter</i> sp. szczep nr. 6	1,0	-	-	Suzuki i in., 2002
EstTB11	<i>Pseudomonas</i> sp. TB11	-	-	-	Dong i in., 2015
Esth	<i>Shewanella</i> sp.	0,939	27,7	29,5	Hang i in., 2016

3.12 Sekrecja białek u bakterii Gram-ujemnych

Ze względu na obecność w badanym enzymie EstS9 domeny autotransportera potencjalnie umożliwiającej sekrecję natywnego białka poza komórkę bakterii *Pseudomonas* sp. S9, postanowiłam po krótko przyjrzeć się możliwym drogom sekrecji białek u bakterii Gram-ujemnych.

Badania potwierdzają, że wydzielanie białek na zewnątrz komórki bakteryjnej może odbywać się według różnych mechanizmów, w zależności od właściwości i docelowego przeznaczenia białka (Jeager i in., 1999). Mechanizmy sekrecji u bakterii Gram-ujemnych dedykowane są głównie transportowi białek o charakterze wirulentnym (Green i Mecsas, 2016; Leo i in., 2012).

Wydzielanie białek na zewnątrz komórki to dla bakterii Gram-ujemnych szczególne wyzwanie ze względu na konieczność pokonania dwóch błon komórkowych, błony cytoplazmatycznej i błony zewnętrznej. Można wyróżnić sześć szlaków sekrecji białek. Poniżej przedstawione szlaki, prócz pierwszego, zaliczane są do sekrecji „Sec-zależnej”. Większość enzymów lipolitycznych posiada N-końcową sekwencję sygnałną, umożliwiającą transport przez błonę cytoplazmatyczną, co dzieje się za pośrednictwem systemu Sec. W jego skład wchodzi białka SecB, ATPaza SecA, a także wewnątrz błonowy kompleks białkowy (tj. podjednostki białkowe SecY, SecE, secD, SecE, SecG i YajC). Pierwszy ze szlaków sekrecji białek u bakterii Gram-ujemnych nazywany jest szlakiem sekrecji typu ABC (ang. ATP-binding cassette), białko bezpośrednio transportowane jest przez obie błony komórkowe z pominięciem przestrzeni periplazmatycznej. Do transportu białka potrzebny jest udział trzech białek, białka ABC (ang. ATP-binding cassette) tworzącego kompleks z pozostałymi dwoma białkami tj. MFB (ang. membrane fusion protein) i OMP (ang. outer membrane protein). W przypadku II szlaku sekrecji, proces podzielony jest na dwa etapy, system Sec bierze udział w transportowaniu białka przez błonę wewnętrzną, a następnie odrębny aparat sekrecyjny odpowiedzialny jest za transport białka przez przestrzeń periplazmatyczną i błonę zewnętrzną. Z kolei, szlak sekrecji typu trzeciego funkcjonuje u bakterii wyłącznie w celu dostarczania czynników wirulencji bezpośrednio do komórki gospodarza „zaatakowanego” przez komórkę bakterii. System transportu białek typu czwartego, podobnie jak typu drugiego, podzielony jest na dwa etapy, transport przez system Sec odpowiedzialny za transport białka przez błonę wewnętrzną do periplazmy, a potem unikalny system transportu białka z przestrzeni

periplazmatycznej przez błonę zewnętrzną na powierzchnię komórki. Rozróżnienie pomiędzy system typu drugiego i czwartego oraz piątego wynika z różnic występujących w mechanizmie sekrecji białek z przestrzeni periplazmatycznej przez błonę zewnętrzną komórki bakteryjnej. Transport białek typu V odbywa się za pomocą autotransporterów oraz białek wymagających pojedynczych czynników dodatkowych (Green i Meccas, 2016). Szlak sekrecji typu VI (T6SS) odkryty został jako ostatni ze wszystkich szlaków sekrecji, tj. w 2006 roku. Rola i działanie tego systemu nie została dotychczas w pełni poznana (Mougousi in., 2006).

3.13 System sekrecji typu V (autotransportery)

Ze względu na obecność w badanym enzymie domeny autotransportera (AT) typowej dla białek bakterii Gram-ujemnych transportowanych przez system sekrecyjny typu V, poniżej przedstawiam najważniejsze informacje dotyczące tego systemu sekrecji. Rodzina białek AT bakterii Gram-ujemnych to unikalny zespół białek niewymagających dodatkowego aparatu wspomagającego transport białek z przestrzeni periplazmatycznej na zewnątrz komórki (Green i Meccas, 2016).

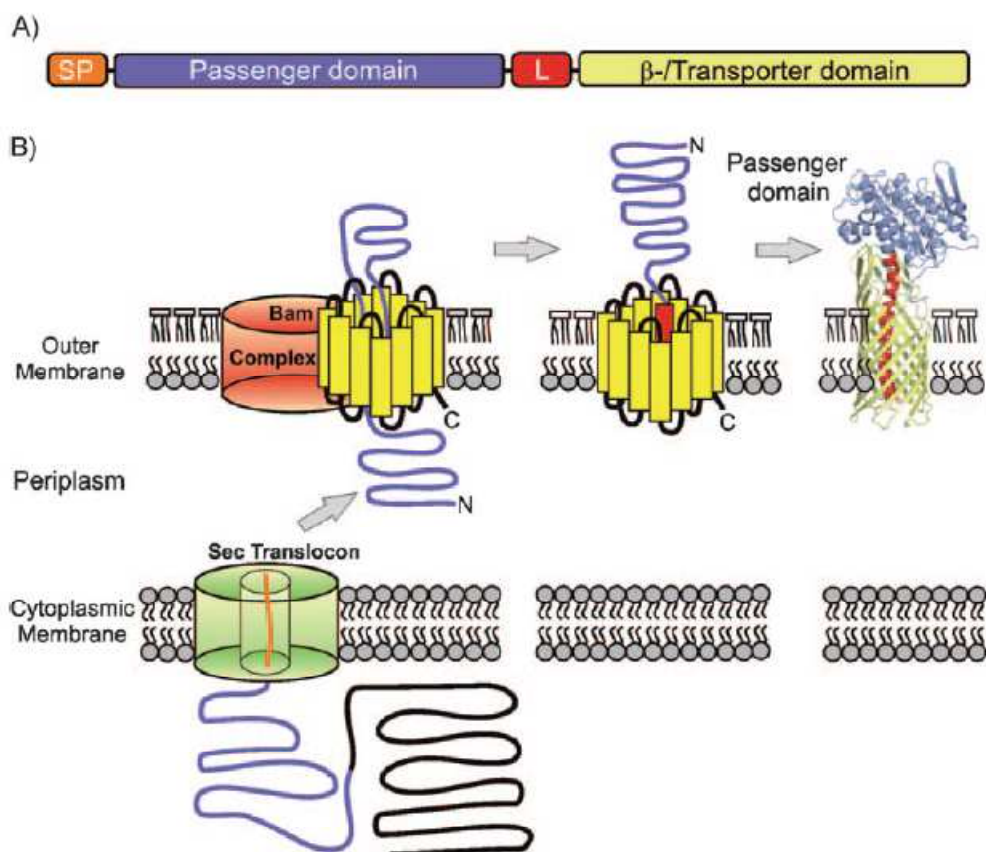
System sekrecyjny typu V, nazywany systemem T5SS bądź systemem autotransporterowym (AT), podzielony jest na trzy różne podtypy tj. Va, Vb, Vc (Wilhelm i in., 2011). Pierwszy z nich, tj. Va, stanowi rodzinę białek autotransporterowych o strukturze monomerycznej, do których należy wiele bakteryjnych czynników wirulencji, m.in. proteaza IgA z *Neisseria meningitides*, adhezyna (AIDA)-I z *Escherichia coli* i pertaktyna z *Bordetella pertussis* (Leo, 2012). Monomeryczne autotransportery to białka o aktywności enzymatycznej podlegające procesowi proteolizy (Leo i in., 2012).

Białko transportowane za pomocą systemu Va składa się z N-terminalnego peptydu sygnałowego, domeny „pasażera”, która ma specyficzną funkcję, domeny linkerowej (tzw. łącznika) i domeny transporterowej, która ma postać postaci β -beczki i kotwicy białko w błonie zewnętrznej bakterii (Wilhelm i in., 2011). Rolą N-terminalnego peptydu sygnałowego jest skierowanie białka w kierunku komponentów systemu Sec w błonie wewnętrznej. Za pomocą systemu Sec białko transportowane jest do przestrzeni periplazmatycznej, gdzie odpowiednie peptydazy odcinają sekwencję sygnałową. Następnie C-terminalna β -domena (domena transportera) integruje się z błoną zewnętrzną tworząc kanał (domena ta przyjmuje strukturę β -beczki), przez który

przemieszcza się domena „pasażera” (Rys. 4). N-terminalna domena „pasażera” pozostaje zakotwiczona na powierzchni komórki, bądź jest uwalniania poprzez proteolizę. Domena „pasażera” przemieszcza się przez błonę zewnętrzną rozpoczynając od C-końca do jej N-końca. Transport domeny „pasażera” odbywa się bez udziału ATP (Wilhelm i in., 2011).

System sekrecji Vb (układ dwóch partnerów, nazywany też systemem TPS), w przeciwieństwie do typowych autotransporterów (Va), stanowi dwa osobne białka tj. białko pasażera (TpsA) i białko odpowiadające za translokację (TpsB) (Wilhelm i in., 2011). Przykładem białek transportowanych z udziałem systemu Vb są włókienkowa hemaglutynina (FHA) z *Bordetella pertussis* oraz wysokocząsteczkowe adhezyny HMW1 i HMW2 z *Haemophilus influenzae* (Leo, 2012).

Trimeryczne autotransportery (Vc) są ważnymi czynnikami wirulencji patogennych bakterii Gram-ujemnych. W odróżnieniu od wielu monomerycznych białek autotransporterowych Va, są to zwykle adhezyny, które nie posiadają funkcji enzymatycznych i nie podlegają procesowi autoproteolizy (Leo i in., 2013; Wilhelm i in., 2011).



Rys. 4. Autotransporterowy system sekrecji Va. A) Elementy strukturalne białka i B) mechanizm jego sekrecji na przykładzie EstA z *P. aeruginosa*. SP - peptyd sygnałny, L - odcinek linkerowy (Wilhelm i in., 2011).

3.14 Biologiczne funkcje białek autotransporterowych z domeną GDSL

Pseudomonas aeruginosa produkuje na zewnątrz komórki wiele różnych białek, w tym kilka enzymów lipolitycznych takich jak fosfolipazy, lipazy i esterazy. Białko EstA o aktywności esterazy z domeną autotransportera należy do rodziny białek GDSL i charakteryzuje się najwyższą aktywnością wobec krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych (C4-C6). Białko EstA bierze udział w produkcji ramnolipidu, biosurfaktantu będącego czynnikiem wirulentnym bakterii *P. aeruginosa*, a także wpływającego na ruchliwość komórki. Ponadto, biosurfaktant ten bierze udział w tworzeniu biofilmu (Wilhelm i in., 2011).

Innym przykładem jest esteraza ApeE pochodząca z *Salmonella typhimurium* o masie cząsteczkowej 67 kDa, która charakteryzuje się szeroką specyficznością

substratową, ma zdolność do katalizowania reakcji hydrolizy kaprynianu metyloumbeliferylu, co czyni ją użyteczną w laboratoriach klinicznych do rozróżniania szczepów z rodzaju *Salmonella*. Ponadto, enzym ten prawdopodobnie bierze udział w metabolizowaniu fosfolipidów (Wilhelm i in., 2011).

Serratia liquefaciens produkuje esterazę EstA należącą również do rodziny białek GDSL i także zawierającą domenę AT. Enzym ten wykazuje aktywność wobec krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych (C2-C4), z preferowanym substratem jakim jest maślan *p*-nitrofenyłu. EstA bierze udział w produkcji cząsteczek AHL (ang. acylatedhomoserine), powszechnie uznawanych za „hormony” bakterii Gram-ujemnych (Wilhelm i in., 2011).

Enzym PLB pochodzący z *Maraxella bovis*, bakterii będącej patogenem bydła, uważany jest za czynnik wirulencji tej bakterii gdyż, bierze udział w lizie komórek gospodarza.

Kolejnym przykładem może być białko MCP z bakterii chorobotwórczej *Maraxella cathornalis*. Białko to odpowiedzialne jest za adhezję mikroorganizmu do komórki ludzkiej. Przeprowadzona mutacja skutkująca utratą zdolności C-terminalnej domeny AT do tworzenia kanału transportowego w zewnętrznej błonie komórki spowodowała spadek aktywności lipolitycznej enzymu oraz zdolności komórki bakterii do adhezji do komórek gospodarza (Wilhelm i in., 2011).

Podsumowując, w świetle danych przedstawionych w rozdziałach 3.12 i 3.13 możliwe jest, że badane białko EstS9 może pełnić rolę czynnika wirulencji psychrotolerancyjnej bakterii *Pseudomonas* sp. S9. Co jednak ważne, obecność domeny AT wskazuje, że EstS9 po sekrecji z użyciem mechanizmu Va może w całości pozostać związane z komórką bakterii (domena z aktywnością esterazy jest „wystawiana” na zewnątrz komórki), albo domena z aktywnością katalityczną jest oddzielana na drodze proteolizy od domeny AT po przetransportowaniu jej na zewnątrz komórki bakterii. Stąd, z punktu biotechnologicznej przydatności badanego enzymu wydało się nam ważne uzyskanie dwóch wariantów białka EstS9, tj. zbudowanego z dwóch wspomnianych domen oraz zbudowanego tylko z domeny katalitycznej, a także oznaczenie i porównanie ich właściwości enzymatycznych.

4.MATERIAŁY I METODY

4.1 Szczepy bakteryjne

- ❖ *Escherichia coli* TOP10: F- mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ- (Invitrogen) – szczep bakterii wykorzystywany na etapie konstrukcji plazmidów rekombinantowych, otrzymywania DNA plazmidów użytych w czasie realizacji badań oraz jako gospodarz w eksperymentach ekspresji genów *estS9auto* i *estS9short* w systemie arabinozowym *E. coli*
- ❖ *Pseudomonas* sp. S9 - szczep bakterii wyizolowany z próbki gleby pobranej na Spitzbergenie (Kolekcja szczepów Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej), wykorzystany jako źródło genu esterazy EstS9, podczas konstrukcji rekombinantowych szczepów *E. coli* i *P. pastoris*, producentów rekombinantowych wariantów sekwencyjnych esterazy EstS9

4.2 Szczep drożdżowy

- ❖ *Pichia pastoris* X-33 – szczep drożdży dzikiego typu stosowany jako gospodarz ekspresji genów kodujących rekombinantowe warianty sekwencyjne esterazy EstS9, w systemie konstytutywnym i systemie indukowanym obecnością metanolu w pożywce (Invitrogen)

4.3 Wektory plazmidowe

- ❖ pBAD/Myc-His A - wektor plazmidowy o wielkości 4094 pz przeznaczony do ekspresji genów w systemie arabinozowym w komórkach *E. coli* (Invitrogen)
- ❖ pBADestS9auto - plazmid ekspresyjny, otrzymany w ramach mojej pracy magisterskiej „Estero/lipaza *Pseudomonas* sp. S9 - izolacja genu, konstrukcja systemu ekspresyjnego, biosynteza i oczyszczanie białka” (obrona pracy miała miejsce na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w 2012 roku)
- ❖ pPICZαA – drożdżowy wektor ekspresyjny, przeznaczony do prowadzenia ekspresji genów w komórkach gospodarza *P. pastoris*, zawierający promotor

genu oksydazy alkoholowej 1 (AOX1) indukowany metanolem, o wielkości 3329 pz (Invitrogen)

- ❖ pGAPZ α B - drożdżowy wektor ekspresyjny, przeznaczony do prowadzenia ekspresji genów w komórkach gospodarza *P. pastoris*, zawierający promotor konstytutywny dla genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAP), o wielkości 3151 pz (Invitrogen)

4.4. Pożywki i podłoża

Pożywka użyta do hodowli *Pseudomonas* sp. S9

Pożywka płynna tzw. „syntetyczna woda morska”

- ❖ Marine Broth Difco 37,4 g (Becton Dickson)
- ❖ woda destylowana 1000 ml

Pożywki i podłoża użyte do hodowli *E. coli*

Podłoże LA (Luria-Bertani Agar)

- ❖ agar bakteriologiczny 15 g (BTL)
- ❖ chlorek sodu 10 g (POCH)
- ❖ ekstrakt drożdżowy 5 g (BTL)
- ❖ pepton K 10 g (BTL)
- ❖ woda destylowana 1000 ml

Pożywka LB (Luria-Bertani) pH 7,2

- ❖ chlorek sodu 10 g (POCH)
- ❖ ekstrakt drożdżowy 5 g (BTL)
- ❖ pepton K 10 g (BTL)
- ❖ woda destylowana 1000 ml

Podłoże LA (Luria-Bertani Agar) niskosolne pH 7,5

- ❖ agar bakteriologiczny 15 g (BTL)
- ❖ ekstrakt drożdżowy 5 g (BTL)
- ❖ pepton K 10 g (BTL)

- ❖ chlorek sodu 5 g (POCH)
- ❖ woda destylowana 1000 ml

Pożywka LB (Luria-Bertani) niskosolna pH 7,5

- ❖ ekstrakt drożdżowy 5 g (BTL)
- ❖ pepton K 10 g (BTL)
- ❖ chlorek sodu 5 g (POCH)
- ❖ woda destylowana 1000 ml

Pożywki i podłoża użyte do hodowli drożdży *P. pastoris*

Pożywka YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

- ❖ ekstrakt drożdżowy 10 g (BTL)
- ❖ pepton K 20 g (BTL)
- ❖ 20% roztwór glukozy 100 ml
- ❖ woda destylowana 1000 ml

Podłoże YPD zestalone agarem

- ❖ ekstrakt drożdżowy 10 g (BTL)
- ❖ pepton K 20 g (BTL)
- ❖ agar bakteriologiczny 20 g (BTL)
- ❖ 20% roztwór glukozy 100 ml
- ❖ woda destylowana 900 ml

Podłoże YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Medium)

- ❖ ekstrakt drożdżowy 10 g (BTL)
- ❖ pepton K 20 g (BTL)
- ❖ sorbitol 182,2 g (AppliChem)
- ❖ agar bakteriologiczny 20 g (BTL)
- ❖ 20% roztwór glukozy 100 ml
- ❖ woda destylowana 900 ml



Podłoże BMGY/BMMY (Buffered Glycerol-complex Medium/Buffered Methanol-complex Medium)

❖ ekstrakt drożdżowy	10 g (BTL)
❖ pepton K	20 g (BTL)
❖ 13,4% roztwór YNB (Yeast Nitrogen Base)	100 ml (Sigma)
❖ 0,02% roztwór biotyny	2 ml (Sigma)
❖ 10% roztwór glicerolu / 5% roztwór metanolu	100 ml
❖ woda destylowana	700 ml
❖ roztwór buforowy 1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 o pH 6,0	100 ml

Podłoże MWG

1 warstwa (warstwa spodnia):

❖ ekstrakt drożdżowy	10 g (BTL)
❖ pepton K	20 g (BTL)
❖ agar bakteriologiczny	20 g (BTL)
❖ 20% roztwór glukozy	100 ml
❖ woda destylowana	900 ml

2 warstwa (warstwa wierzchnia):

❖ ekstrakt drożdżowy	10 g (BTL)
❖ pepton K	20 g (BTL)
❖ agar bakteriologiczny	20 g (BTL)
❖ woda destylowana	1000 ml
❖ tributryna	10 ml (Fluka)

Wszystkie pożywki i podłoża po sporządzeniu ich zawiesin lub roztworów w wodzie o odpowiedniej czystości i ustaleniu właściwego pH (jeśli było to wymagane) były autoklawowane w temp 121°C, pod ciśnieniem 1,2 bara, przez 20 min. W przypadku podłoży i pozywek zawierających 20% roztwór glukozy, roztwór ten był autoklawoawany osobno i odpowiednia jego ilość dodawana była do pozostałych składników, które były osobno autoklawowane.

Podłoża zawierające agar, po autoklawowaniu i ostygnięciu do temperatury 50-60°C, były rozlewane do sterylnych plastikowych płytek Petriego. Płytki te po

zestaleniu podłoża i wysuszeniu w temperaturze 37°C były od razu wykorzystane do wykonania posiewów lub były przechowywane w lodówce w temperaturze 4-8°C.

4.5 Dodatkowe składniki użyte do przygotowania pożywek i podłoży

W przypadku części z opisanych w pracy doświadczeń (Rozdział 5. Wyniki i dyskusja), przeprowadzenie ich wymagało dodanie do w/w pożywek i podłoży następujących składników:

- roztwór ampicyliny (PolfaTarchomin) w jałowej wodzie o stężeniu 100 mg/ml,
- roztwór L-arabinozy (Sigma) w jałowej wodzie o stężeniu 20%,
- roztwór IPTG (Sigma) w jałowej wodzie o stężeniu 1M,
- roztwór zeocyny (Invitrogen) w jałowej wodzie o stężeniu 100 mg/ml.

4.6 Izolacja DNA

- ❖ ExtractMe DNA Yeast Kit (Blirt S.A.)
- ❖ ExtractMe Plasmid DNA Kit (Blirt S.A.)
- ❖ ExtractMe DNA Bacteria Kit (Blirt S.A.)

DNA plazmidowe izolowano z użyciem zestawu ExtractMePlasmid DNA-kit, DNA genomowe bakterii izolowano za pomocą ExtractMe DNA Bacteria Kit, natomiast DNA genomowe drożdży izolowano za pomocą zestawu ExtractMe DNA Yeast. Zarówno DNA plazmidowe jak i genomowe DNA bakteryjne i drożdżowe izolowano postępując zgodnie z instrukcjami opisanymi w protokołach dołączonych przez producenta tych zestawów (Blirt S.A.).

4.7 Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych

- ExtractMe DNA Clean up Kit (Blirt)

Zestaw przeznaczony jest do szybkiego i wydajnego oczyszczania fragmentów DNA po reakcjach enzymatycznych. Oczyszczanie przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta. Metodę tę stosowano do oczyszczania produktów PCR.

- Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego

W celu wyizolowania fragmentu DNA (o pożądanej długości) z żelu agarozowego, po rozdziale elektroforetycznym produktów trawienia DNA enzymem lub enzymami restrykcyjnymi, wycięty jałowym skalpelem fragment agarozy zawierający DNA przenoszono do probówki typu Eppendorf i zamrażano (20 min, -20°C). Po upływie tego czasu, zamrożony fragment agarozy szatkowano jałowym skalpelem na parafilmie. Całość poszatkowanego bloczka agarozy nanoszono na minikolumnę filtracyjną i wirowano przez 5 min, przy $9600 \times g$. Kolumnę wyrzucano, a DNA znajdujące się w przesączu poddawano precypitacji.

- Precypitacja DNA

DNA po izolacji z żelu agarozowego lub po reakcjach trawienia enzymatycznego oczyszczano i zagęszczano przez precypitację.

Do roztworu DNA o znanej objętości dodawano taką samą objętość izopropanolu, 1/10 objętości 3 M octanu sodu o pH 5,2 i 5-10 μl wzmacniacza precypitacji (A&A Biotechnology). Mieszaninę wortexowano i umieszczano na 20 h w zamrażarce (-20°C). Po upływie tego czasu próbkę wirowano przez 10 min przy $9600 \times g$. DNA, zabarwione na niebiesko od wzmacniacza precypitacji, osadzało się w postaci „kropki” na dnie probówki. Supernatant usuwano pipetą, a następnie dodawano 800 μl 80% etanolu o temperaturze -20°C . Próbkę wirowano przez 3 min przy $9600 \times g$. Supernatant ponownie usuwano, po czym probówkę wirowano przez 30 s, przy $9600 \times g$. Następnie pobierano pozostałość supernatantu, a otwartą probówkę pozostawiano na 20 min w temperaturze pokojowej w celu wysuszenia DNA. W ostatnim etapie DNA zawieszano w 5-10 μl jałowego roztworu TE lub jałowej wody dejonizowanej i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Oczyszczone DNA przechowywano w zamrażarce (-20°C) do dalszych analiz.

Odczynniki:

- ❖ Izopropanol
- ❖ 80% Etanol
- ❖ Wzmacniacz precypitacji (A&A Biotechnology)
- ❖ Jałowy 3 M octan sodu pH 5,2
- ❖ Bufor TE pH 8,0: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

4.8 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Elektroforezę prowadzono w 1% lub 2% żelu agarozowym, w zależności od długości rozdzielanych cząstek DNA, z dodatkiem bromku etydyny (stężenie końcowe 1µg/ml), w roztworze buforowym 1xTAE, przy napięciu 10 V/cm długości żelu, przez 45 min.

Odczynniki:

- ❖ Agaroza Plus (Prona)
- ❖ Bromek etydyny o stężeniu 1mg/ml (Sigma)
- ❖ Roztwór buforowy 50xTAE (pH 7,5):

Tris (Sigma)	242 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
Kwas octowy	57,1 ml
woda destylowana	do 1000 ml
- ❖ Roztwór do nanoszenia próbek DNA w studzienki żelu:

błękit bromofenolowy	0,25% (w/v)
sacharoza	40% (w/v)

4.9. Wzorzec długości fragmentów DNA

Podczas rozdzielania produktów trawienia DNA plazmidowego enzymami restrykcyjnymi, trawionych i nietrawionych produktów PCR w żelu agarozowym, w celu oceny długości uzyskanych fragmentów DNA używano jako odnośnik wzorzec długości fragmentów DNA „O’ GeneRuler 1kB DNA Ladder ”składający się z fragmentów DNA o następującej długości 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 pz (Thermo Fisher Scientific).

4.10. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Reakcje trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi prowadzono w mieszaninach o objętości 20 µl. Ilość dodawanego DNA była uzależniona od jego stężenia. Temperatura, czas reakcji i roztwory buforowe były dobierane zgodnie z zaleceniami producenta. Producentem enzymów restrykcyjnych i buforów stosowanych w reakcjach trawienia były firmy Thermo Fisher Scientific i New England Biolabs. Do reakcji

dodawano po 10 U enzymów. Stosowane w badaniach enzymy restrykcyjne przedstawia tabela 4. Wszystkie reakcje trawienia enzymatycznego prowadzone były w 37°C przez 1h.

Tabela 4. Enzymy restrykcyjne stosowane w badaniach.

Enzym restrykcyjny	Sekwencja rozpoznania	Producent
<i>NcoI</i>	5'...C [^] CATGG...3' 3'...GGTAC [^] C...5'	Thermo Fisher Scientific
<i>HindIII</i>	5'...A [^] AGCTT...3' 3'...TTCGA [^] A...5'	Thermo Fisher Scientific
<i>AsuII</i>	5'...TT [^] CGAA...3' 3'...AAGC [^] TT...5'	New England Biolabs
<i>XbaI</i>	5'...T [^] CTAGA...3' 3'...AGATC [^] T...5'	New England Biolabs
<i>XhoI</i>	5'...C [^] TCGAG...3' 3'...GAGCT [^] C...5'	New England Biolabs

4.11 Ligacja DNA

Do konstrukcji rekombinantowych plazmidów ekspresyjnych: pBADestS9short, pGAPsygestS9auto, pGAPsygestS9short, pGAPæestS9auto, pGAPæestS9short, pPICZsygestS9auto, pPICZsygestS9short, pPICZæestS9auto oraz pPICZestS9short zastosowano odczynniki firmy NEB. Reakcję ligacji prowadzono przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej oczyszczonego DNA wektora plazmidowego oraz DNA insertu trawionych wcześniej odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi, buforu dla ligazy DNA faga T4 zawierającego w swym składzie ATP oraz ligazy DNA faga T4. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 1 h w 17°C.

Skład mieszaniny ligacyjnej (objętość końcowa 20 µl):

T4 DNA Ligase Buffer (10 x stężony)	2 µl
DNA trawionego wektora plazmidowego	5 µl
DNA trawionego insertu	5 µl

T4 DNA Ligase (2U/ml)	1 μ l
Jałowa woda redestylowana	7 μ l

4.12 Przygotowanie komórek kompetentnych *Escherichia coli*

50 ml pożywki LB zaszczipiano 1 ml hodowli komórek *Escherichia coli* TOP10 prowadzonej wcześniej przez 18-20 h w pożywce LB. Hodowlę komórek odmładzano przez 2 h, wytrząsając przy 180 rpm w temperaturze 37°C (OD₆₀₀ = 0,4). Hodowlę wirowano w wirówce laboratoryjnej przez 10 min przy 1046 x g, a uzyskany osad komórkowy zawieszano w 25-30 ml jałowego zimnego 100 mM roztworu CaCl₂ (4°C) i umieszczano w lodzie na 16-18 h. Po upływie tego czasu komórki ponownie wirowano przez 10 min przy 1046 x g w 4°C. Osad komórkowy zawieszano w 800 μ l jałowego zimnego 100 mM CaCl₂ i umieszczano w lodzie. Tak przygotowane komórki kompetentne były gotowe do transformacji.

4.13 Transformacja komórek kompetentnych *Escherichia coli* plazmidowym DNA

Do 20 μ l mieszaniny ligacyjnej (lub 10 μ l plazmidowego DNA) znajdującej się w probówce typu Eppendorf (1,5 ml) dodawano 100 μ l komórek kompetentnych *E. coli* i umieszczano probówkę na 1 h w lodzie. Po upływie tego czasu wykonywano szok termiczny, umieszczając probówkę w termobloku o temperaturze 42°C na 90 s, po czym natychmiast przenoszono ją do lodu na 2 min. Następnie do komórek kompetentnych dodawano 300 μ l jałowej pożywki LB i inkubowano probówkę przez ok. 30 min w 37°C. Po inkubacji, komórki wysiewano na 4 płytki Petriego z podłożem LA zawierającym ampicylinę (stężenie końcowe 100 μ g/ml) w przypadku konstrukcji rekombinantowych szczepów *E. coli*/pBADestS9short i *E. coli*/pBADestS9auto.

Natomiast w przypadku konstrukcji rekombinantowych szczepów *E. coli* niosących DNA plazmidów: pGAPsygestS9auto, pGAPsygestS9short, pGAPaestS9auto, pGAPaestS9short, pPICZsygestS9auto, pPICZsygestS9short, pPICZaestS9auto oraz pPICZaestS9short do komórek dodawano 300 μ l jałowej pożywki LB niskosolnej i inkubowano przez ok. 30 min w 37°C. Komórki wysiewano

na 4 płytki Petriego z podłożem LA niskosolnym zawierającym zeocynę (stężenie końcowe 25 µg/ml).

4.14 Ekspresja genów *estS9auto* i *estS9short* w komórkach *Escherichia coli* TOP10

Komórkami *E. coli* TOP10/pBADestS9auto i *E. coli* TOP10/pBADestS9short zaszczepiono 20 ml pożywki LB z ampicyliną (stężenie końcowe 100 µg/ml) i inkubowano przez 14-16 h w 37°C w wytrząsarce. Następnie odmłodzono hodowlę poprzez przeniesienie inokulum do kolby ekspresyjnej zawierającej 1000 ml pożywki LB z ampicyliną (stężenie końcowe 100 µg/ml), rozdzielanie na dwie porcje po 500 ml i inkubowanie w 30°C przez 2,5 h w wytrząsarce przy 180 rpm. Ekspresję genu indukowano przez dodatek 20% L-arabinozy do końcowego stężenia w pożywce 0,02%, po czym prowadzono hodowlę przez ok. 20 h w 30°C w wytrząsarce przy 180 rpm. Ostatnim etapem było wirowanie hodowli w jałowych kubłach o pojemności 0,5l przez 15 min przy 3125 x g, a następnie oddzielenie supernatantu od osadu komórkowego.

4.15 Otrzymanie lizatów komórkowych oraz ekstraktów bezkomórkowych *E. coli* TOP10/pBADestS9auto i *Escherichia coli* TOP10/pBADestS9short

Osady komórkowe z 50 ml hodowli *E. coli* TOP10/pBADestS9auto i *E. coli* TOP10/pBADestS9short oraz *E. coli* TOP10/pBADMyc-HisA zawieszono w 5 ml buforu K (20 mM buforu K₂HPO₄/KH₂PO₄ o pH 7,0). Następnie pobrano 1 ml każdej z zawiesin i sonikowano w probówkach umieszczonych w łaźni lodowej przez 15 s (5 cykli) z 60 s przerwą, przy amplitudzie drgań 3 µm. Pobrano połowę lizatów komórkowych (500 µl), a drugą połowę próbek (500 µl) wirowano 10 minut przy 9600 x g. Otrzymane lizaty i ekstrakty bezkomórkowe analizowano metodą SDS-PAGE.

4.16 Oczyszczanie białka EstS9short i EstS9Auto metodą chromatografii metalopowinowactwa w warunkach denaturujących

Osady komórek *E. coli* TOP10/pBADestS9short i *E. coli* TOP10/pBADestS9auto zawieszono w 50 ml buforu B5M. Przeprowadzono sonikację zawiesiny komórek w 5

cyklach po 20 s przy amplitudzie drgań 5 μm . Próbki w czasie sonikacji były umieszczone w łaźni lodowej. Po sonikacji lizat komórkowy inkubowano przez 30 minut w temperaturze 4°C, w celu rozpuszczenia ciał inkluzyjnych. Kolejnym etapem było wirowanie lizatu przez 20 minut przy 14400 x g i pobranie ekstraktu bezkomórkowego. W celu kalibracji kolumny ze złożem His-Bind (Novagen), użyto buforu B5M. Następnie na kolumnę naniesiono ekstrakt bezkomórkowy zawierający białko EstS9short lub białko EstS9Auto. Wypłukiwanie niezwiązanych ze złożem białek odbywało się za pomocą 50 ml porcji roztworów buforowych o rosnącym stężeniu imidazolu 5-60 mM: B5M, W20M, W40M, W60M. Elucję białek EstS9short lub EstS9Auto przeprowadzono przy użyciu roztworu buforowego o stężeniu imidazolu równym 0,5 M (E500M).

Odczynniki do oczyszczania białek EstS9short i EstS9Auto z wykorzystaniem kolumny ze złożem Ni^{2+} -IDA (HisBindResin, Novagen), o objętości martwej 5 ml:

- ❖ Bufor B5M (pH = 7,9)
 - 20 mM Tris-HCl
 - 0,5 M NaCl
 - 6 M mocznik
 - 5 mM imidazol
- ❖ Bufor W20M (pH = 7,9)
 - 20 mM Tris-HCl
 - 0,5 M NaCl
 - 6 M mocznik
 - 20 mM imidazol
- ❖ Bufor W40M (pH = 7,9)
 - 20 mM Tris-HCl
 - 0,5 M NaCl
 - 6 M mocznik
 - 40 mM imidazol
- ❖ Bufor W60M (pH = 7,9)
 - 20 mM Tris-HCl
 - 0,5 M NaCl
 - 6 M mocznik

60 mM imidazol

❖ Bufor E500M (pH = 7,9)

20 mM Tris-HCl

0,5 M NaCl

6 M mocznik

500 mM imidazol

Dializa EstS9short i EstS9Auto

W celu przeprowadzenia dializy preparatów białek EstS9short i EstS9Auto otrzymanych po oczyszczaniu metodą chromatografii metalopowinowactwa, przygotowano trzy kolby buforu dializacyjnego DX o objętości 2 litrów. Dializę prowadzono przez nitrocelulozową błonę, w 4°C, przez 3 doby. Co 24 h woreczek dializacyjny z preparatem przenoszono do nowego buforu dializacyjnego.

➤ Bufor DX: 20 mM Tris-HCl pH 7,5 z 0,1% Triton X-100

➤ Nitrocelulozowa błona dializacyjna, 32 mm (Sigma)

4.17 Przygotowanie komórek kompetentnych *Pichia pastoris* i transformacja plazmidowym DNA

10 ml podłoża YPD znajdującego się w kolbie o objętości 100 ml zaszczerpiono pojedynczą kolonią drożdży *Pichia pastoris* X-33. Hodowlę prowadzono przez 24 h w temperaturze 30°C, wytrząsając (180 rpm) w wytrząsarce powietrznej. Po upływie tego czasu, 250 ml świeżego YPD znajdującego się w kolbie o objętości 1000 ml zaszczerpiono 20 µl 24 godzinnej hodowli *Pichia pastoris* X-33. Hodowlę prowadzono przez ok. 16 h w temperaturze 30°C, wytrząsając przy 180 rpm. W trakcie hodowli mierzono gęstość optyczną hodowli (przy długości fali 600 nm) i po osiągnięciu wartości 1,0-1,3 hodowlę zwirowano (5 min, 1500 x g, 4°C). Osad komórek drożdży z 250 ml hodowli dwukrotnie przemywano zimną sterylną dejonizowaną wodą (najpierw 250ml, a następnie 125 ml). Następnie osad zawieszono w 20 ml 1 M roztworu zimnego, jałowego sorbitolu i wirowano (5 min, 1500 x g, 4°C). Przemyty osad zawieszono w 0,5 ml 1M zimnego jałowego sorbitolu i umieszczono w lodzie. Tak

przygotowane komórki kompetentne rozporcjowano po 40 μ l do 1,5 ml jałowych probówek Eppendorfa.

Do przygotowanych komórek kompetentnych *Pichia pastoris* X-33 dodawano 5 μ l DNA plazmidowego w formie liniowej (3-5 μ g DNA) i inkubowano w lodzie przez 5 minut. Mieszaninę przenoszono do 0,2 cm kuwety do elektroporacji (Biorad) wcześniej schłodzonej w lodzie. Kuwetę umieszczano w elektroporatorze i wywoływano puls o parametrach: 1,5 kV, 5 ms. Natychmiast po wywołaniu pulsu dodawano 1 ml zimnego, sterylnego 1 M sorbitolu. Próbkę przenoszono do 15 ml jałowej probówki typu Falcon i inkubowano w temperaturze 30°C przez 2 h bez wytrząsania. Następnie dodawano 1 ml pożywki YPD i inkubowano kolejne 3 h w temperaturze 30°C wytrząsając w wytrząsarce powietrznej (180 rpm). Po okresie inkubacji komórki wysiewano na podłoże YPDS z dodatkiem zeocyny (st. końcowe 100 μ g/ml). Płytki z wysianymi transformantami inkubowano przez 5 dni w temperaturze 30°C.

DNA plazmidów ekspresyjnych pGAPsygestS9auto, pGAPsygestS9short, pGAPaestS9auto, pGAPaestS9short przed transformacją komórek kompetentnych *P. pastoris* X-33 linearyzowano enzymem restrykcyjny *AvrII* w buforze Cut Smart (New England Biolabs), a DNA plazmidów pPICZsygestS9auto, pPICZsygestS9short, pPICZaestS9auto i pPICZaestS9short linearyzowano enzymem restrykcyjnym *PmeI* również w buforze Cut Smart (New England Biolabs) po czym precypitowano.

W celu sprawdzenia czy doszło do integracji DNA plazmidowego z DNA genomowym *Pichia pastoris* X-33, izolowano DNA genomowe rekombinantów *Pichia pastoris* (rozdział 4.6), a następnie prowadzono reakcję amplifikacji genów *sygestS9auto*, *sygestS9short*, *aestS9auto* oraz *aestS9short* na tak uzyskanych matrycach DNA (rozdział 4.15).

4.18 Amplifikacja DNA techniką PCR

Amplifikacja genu *estS9short* kodującego esterazę z *Pseudomonas* sp. S9 pozbawionej domeny autotransportera. Układ zaprojektowano tak, aby białko posiadało na C-końcu domenę oligohistydynową.

Profil temperaturowo-czasowy PCR:

Denaturacja wstępna	95°C	120 s	
Denaturacja	95°C	60 s	} 30 cykli
Przyłączanie starterów	67°C	60 s	
Wydłużanie starterów	72°C	120 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	300 s	
Chłodzenie	4°C		

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Odczynnik	Objętość [μl]
MgCl ₂ (50 mM)	3
FLipS9Nco (10 μM)	1
RLipS9- shortHind-His (10 μM)	1
dNTPs (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP)	5
Bufor reakcyjny 10x Hypernova (Blirt S.A.)	5
DNA genomowe <i>Pseudomonas</i> sp. S9	0,5
Polimeraza Hypernova 2,0 U/μl (Blirt S.A.)	0,5
Woda dejonizowana	34
	50

Amplifikacja genu sygestS9auto, kodującego esterazę z *Pseudomonas* sp. S9 z peptydem sygnałnym z *Pseudomonas* sp. S9, domeną katalityczną i domeną autotransportera. Układ zaprojektowano tak, aby białko posiadało na C-końcu domenę oligohistydynową.

Profil temperaturowo-czasowy PCR:

Denaturacja wstępna	98°C	30 s	
Denaturacja	98°C	10 s	} 30 cykli
Przyłączanie starterów	63°C	30 s	
Wydłużanie starterów	72°C	60 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	300 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	300 s	
Chłodzenie	4°C		

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Odczynnik	Objętość [μl]
ForwardS ₉ EstAsuII (10 μM)	1
ReverseEstAutoXbaI (10 μM)	1
dNTPs (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP)	5
Bufor reakcyjny HF (NEB)	10
DNA genomowe <i>Pseudomonas</i> sp. S9	1
Polimeraza Phusion (NEB)	0,5
Woda dejonizowana	<u>31,5</u>
	50

Amplifikacja genu *αestS₉auto*, kodującego esterazę składającą się z domeny katalitycznej i domeny autotransportera. Układ zaprojektowano tak, aby białko na N końcu miało peptyd sygnałny α -faktora *Sacharomyces cerevisiae*, na C-końcu domenę oligohistydynową.

Profil temperaturowo-czasowy PCR:

Denaturacja wstępna	98°C	30 s	
Denaturacja	98°C	10 s	} 30 cykli
Przyłączanie starterów	63°C	30 s	
Wydłużanie starterów	72°C	60 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	300 s	
Wydłużanie końcowe	72°C	300 s	
Chłodzenie	4°C		

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Odczynnik	Objętość [μl]
Forward α EstAutoXhoI (10 μM)	1
ReverseEstAutoXbaI (10 μM)	1
dNTPs (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP)	5
Bufor reakcyjny HF (Thermo Fisher Scientific)	10
DNA genomowe <i>Pseudomonas</i> sp. S9	1
Polimeraza Phusion (Thermo Fisher Scientific)	0,5
Woda dejonizowana	<u>31,5</u>
	50

Amplifikacja genu *αestS₉short*, kodującego esterazę z *Pseudomonas* sp. S9 pozbawioną peptydu sygnałnego z *Pseudomonas* sp. S9 i domeny autotransportera. Układ zaprojektowano tak, aby białko na N końcu miało peptyd sygnałny α -faktora *Sacharomyces cerevisiae*, na C-końcu domenę oligohistydynową.

Profil temperaturowo-czasowy:

Denaturacja wstępna	98°C	30 s	}	30 cykli
Denaturacja	98°C	10 s		
Przyłączanie starterów	64°C	30 s		
Wydłużanie starterów	72°C	60 s		
Wydłużanie końcowe	72°C	300 s		
Wydłużanie końcowe	72°C	300 s		
Chłodzenie	4°C			

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Odczynnik	Objętość [μl]
ForwardαEstAutoXhoI (10 μM)	1
ReverseEstXbaI (10 μM)	1
dNTPs (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP)	5
Bufor reakcyjny HF (Thermo Fisher Scientific)	10
DNA genomowe <i>Pseudomonas</i> sp. S9	1
Polimeraza Phusion (Thermo Fisher Scientific)	0,5
Woda dejonizowana	<u>31,5</u>
	50

Odczynniki:

- ❖ Trifosforany deoksyrybonukleozydów tj. dNTPs (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2mM dGTP, 2mM dTTP)
- ❖ Polimeraza 10x Hypernova 2 U/μl (Blirt S.A.)
- ❖ Bufor reakcyjny 10x Hypernova (Blirt S.A.)
- ❖ 50 mM MgCl₂
- ❖ Polimeraza Phusion (Thermo Fisher Scientific)
- ❖ Buforreakcyjny HF (Thermo Fisher Scientific)
- ❖ 10 μM startery oligonukleotydowe stosowane w reakcjach PCR (Tabela 5)
- ❖ Jałowa woda dejonizowana

Tabela 5. Sekwencje i nazwy oligonukleotydów stosowanych w reakcjach PCR. Sekwencje rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych podkreślono. Fragmenty komplementarne do matrycy pogrubiono.

Nazwa	Sekwencja
FEstS9Nco	5'CAGT <u>CCATGGCGCCTAATCCTTACACCCATTTCGTCG</u> 3'
REstS9-shortHind-His	5'GATCA <u>AAGCTTGCGTTGCCCTGCTTCGGTCGG</u> 3'
ForwardSygEstAsuII	5'GCGCGT <u>TCGAAACGATGATCAAACAGACGTTGTTTGTACC</u> GCTC 3'
ReverseEstAutoXbaI	5'GAGCT <u>TCTAGATAGAAGTCCAGCGCAACGCCTACATTA</u> A3'
ForwardαEstAutoXhoI	5'ATGC <u>CTCGAGAAAAGAGCGCCTAATCCTTACACCCATTTC</u> GTC 3'
ReverseEstXbaI	5'CATG <u>TCTAGAAGGCGTTGCCCTGCTTCGGTC</u> 3'
ReverseEstXbaI	5'CATG <u>TCTAGAAGGCGTTGCCCTGCTTCGGTC</u> 3'

4.19 Badanie aktywności esterolitycznej rekombinantowych komórek *Pichia pastoris* X-33/sygestS9auto, *Pichia pastoris* X-33/sygestS9short, *Pichia pastoris* X-33/ α estS9auto i *Pichia pastoris* X-33/ α estS9short

Dla uzyskanych po transformacji (punkt 4.14) kolonii rekombinantowych drożdży wykonano posiewy „na kreskę” na płytce Petriego z podłożem dwuwarstwowym MWG z zeocyną (100 μ g/ml) (punkt 4.4). Płytki inkubowano przez 3 doby w 30°C. Po upływie tego czasu poszukiwano stref przejaśnienia podłoża MWG (zawierającego tributyrinę) wokół posiewów drożdży, świadczących o ich aktywności lipolitycznej.

4.20 Konstytutywna ekspresja genów sygestS9auto, sygestS9short, α estS9auto oraz α estS9short w komórkach *Pichia pastoris* X-33

Dla uzyskanych po transformacji (punkt 4.14) rekombinantowych kolonii drożdży wykonano posiewy „na kreskę” na płytce Petriego z podłożem YPD z dodatkiem zeocyny (stężenie końcowe 100 μ g/ml). Płytki inkubowano przez 3 doby w 30°C. Następnie komórkami (*Pichia pastoris* X-33 transformowanymi plazmidowym DNA pGAPsygestS9auto, pGAPsygestS9short, pGAP α estS9auto oraz

pGAP α estS9short) pobranymi z wybranych posiewów zaszczepiano 10 ml porcje pożywki YPD w 100 ml kolbkach. Hodowle prowadzono w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C z wytrząsaniem 180 rpm przez 72 h. Co 24 h pobierano 1,5 ml próbki hodowli i wirowano je przez 10 min przy 9600 x g. Płyn pohodowlany oddzielano od osadu komórek drożdży i używano do dalszych analiz.

4.21 Indukowana metanolem ekspresja genów sygestS9auto, sygestS9short, α estS9auto oraz α estS9short w komórkach *Pichia pastoris* X-33

Dla uzyskanych po transformacji (punkt 4.14) kolonii drożdży wykonano posiewy „na kreskę” na płytce Petriego z podłożem YPD z dodatkiem zeocyny (100 μ g/ml). Płytki inkubowano przez 3 doby w 30°C. Następnie komórkami (*Pichia pastoris* X-33 transformowanymi plazmidowym DNA pPICZsygestS9auto, pPICZsygestS9short, pPICZ α estS9auto oraz pPICZ α estS9short) pobranymi z wybranych posiewów zaszczepiono 25 ml porcje pożywki BMGY w 250 ml kolbkach i prowadzono hodowle w wytrząsarce powietrznej przez 18 h w 30°C, z wytrząsaniem 180 rpm. Po zwirowaniu hodowli drożdży osad komórkowy zawieszono w 50 ml pożywki BMMY w 500 ml kolbach. Następnie prowadzono hodowle w wytrząsarce powietrznej przez 96 h w 25°C z wytrząsaniem 180 rpm. Ponadto, co 24 h dodawano do hodowli 100% metanolu do jego końcowego stężenia wynoszącego 0,5% oraz pobierano po 1,5 ml próbki z każdej hodowli do dalszych analiz.

4.22 Badanie płynów pohodowlanych oraz płynów po dezintegracji komórek rekombinantowych *Pichia pastoris* X-33

Pobierano 1 ml hodowli rekombinantowych drożdży *Pichia pastoris* X-33 (punkt 4.16 i 4.17) i wirowano w wirówce przez 5 min przy 3500 x g. Oddzielono supernatant od osadu komórkowego i badano go stosując maślanu *p*-nitrofenylu jako substrat esterazy (Materiały i metody 4.28). Osad komórkowy ważono, a następnie zawieszano w 1 ml roztworu buforowego 20 mM Tris-HCl (Sigma) pH 7,5. W celu dezintegracji komórek użyto kulek szklanych (212-300 μ m, Sigma), o masie równej masie osadu komórkowego. Mieszaninę worteksowano przez 10 s, a następnie inkubowano 30 s w lodzie (czynność tą powtarzano 10 krotnie). Następnie lizat komórkowy wirowano przez 5 minut przy 3500 x g. Aktywność lipolityczną

uzyskanego lizatu komórkowego i ekstraktu bezkomórkowego badano wobec maślanu *p*-nitrofenylu (Materiały i metody 4.28).

Do 100 μ l 20 mM Tris-HCl (Sigma) pH 7,5 dodano 10 μ l maślanu *p*-nitrofenylu (Sigma) oraz 30 μ l płynu pohodowlanego, lizatu komórkowego lub ekstraktu bezkomórkowego. Mieszaninę inkubowano 30 min w 35°C. Reakcję hydrolizy substratu zatrzymano przez dodanie 140 μ l izopropanolu. Następnie absorbancję badanych próbek po reakcji enzymatycznej mierzono przy długości fali 405 nm. Kontrolę stanowiły płyny pohodowlane, lizaty komórkowe i ekstrakty bezkomórkowe nierekombinantowych drożdży *Pichia pastoris* X-33.

4.23 Oczyszczanie białka EstS9short wyprodukowanego w indukowanym systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris*

Komórkami *P. pastoris* X-33/pPICZaestS9short zaszczerpiono 150 ml pożywki BMGY (Materiały i metody 4.4) w 1000 ml kolbach. Prowadzono 6 takich hodowli przez 18 h w 30°C, z wytrząsaniem 200 rpm. Po zwirowaniu hodowli (10 min, 3125 x g) osady komórkowe zawieszono w 300 ml porcjach pożywki BMMY w 2000 ml kolbach. Następnie prowadzono hodowle w wytrząsarce powietrznej przez 96 h w 25°C z wytrząsaniem 200 rpm. Ponadto, co 24 h do wszystkich hodowli dodawano 100% metanol do końcowego stężenia wynoszącego 0,5%. Uzyskane hodowle zwirowano w jałowych kubkach o pojemności 0,5 l przez 10 min przy 3125 x g. Płyn pohodowlany ze wszystkich hodowli *P. pastoris* X-33/pPICZaestS9short (o łącznej objętość 1,8 l) poddano zateżeniu z wykorzystaniem kasety ultrafiltracyjnej o przepływie „cross-flow” o granicznej masie molowej wynoszącej 30 kDa (VIVA FLOW 50R, Sartorius), a następnie przeprowadzono wymianę pożywki hodowlanej na bufor B5. Tak przygotowany roztwór białkowy zawierający α EstS9short naniesiono na skalibrowaną buforem B5 kolumnę ze złożem His-Bind (Novagen), a następnie przeprowadzono procedurę oczyszczania. Wyplukiwanie niezwiązanych ze złożem białek odbywało się za pomocą 50 ml porcji roztworów buforowych o rosnącym stężeniu imidazolu 5-60 mM: B5, W20, W40, W60. Elucję białka α EstS9short przeprowadzono przy użyciu roztworu buforowego o stężeniu imidazolu równym 0,5 M (E500). Otrzymany preparat białkowy poddano odsalaniu za pomocą kasety ultrafiltracyjnej o przepływie „cross-flow” o granicznej masie molowej wynoszącej 30 kDa (VIVA FLOW 50R, Sartorius) stosując roztwór buforowy 20 mM Tris-HCl o pH 7,5.

Odczynniki do oczyszczania z wykorzystaniem kolumny ze złożem Ni²⁺-IDA (HisBindResin, Novagen), o objętości martwej 5 ml:

- ❖ 20% (w/v) NiCl₂
- ❖ Bufory do oczyszczania:

Bufor B5 (pH = 7,9)

- 20 mM Tris-HCl
- 0,5 M NaCl
- 5 mM imidazol

Bufor W20 (pH = 7,9)

- 20 mM Tris-HCl
- 0,5 M NaCl
- 20 mM imidazol

Bufor W40 (pH = 7,9)

- 20 mM Tris-HCl
- 0,5 M NaCl
- 40 mM imidazol

Bufor W60 (pH = 7,9)

- 20 mM Tris-HCl
- 0,5 M NaCl
- 60 mM imidazol

Bufor E500 (pH = 7,9)

- 20 mM Tris-HCl
- 0,5 M NaCl
- 500 mM imidazol

4.24 Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka w preparatach po oczyszczaniu z użyciem chromatografii metalopowinowactwa na kolumnie ze złożem Ni²⁺-IDA oznaczano spektrofotometrycznie z użyciem metody Bradford (Walker, 1996), wykorzystując

komercyjnie dostępny zestaw Quick Start Bradford Protein Assay (BioRad) i postępując zgodnie z instrukcją producenta dołączoną do zestawu.

4.25 Wzorce masy cząsteczkowej białek użyte podczas elektroforezy białek metodą SDS-PAGE

- Unstained Protein Molecular Weight Marker (116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4 i 14,4 kDa) (Thermo Fisher Scientific)
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (170; 130; 100; 70; 55; 40; 35; 25; 15; 10 kDa) (Thermo Fisher Scientific)

4.26 Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (metoda SDS-PAGE)

Do 20 µl próbki białkowej lub 10 µl markera masy cząsteczkowej białek dodawano 5 µl buforu Laemmli i denaturowano próbki termicznie w termobloku przez 10 min w 100°C. Następnie nanoszono próbki i marker do studzienek żelu poliakryloamidowego, po czym prowadzono rozdział elektroforetyczny w roztworze 1x Tris-Glicyna, w 5% żelu zagęszczającym i 15% żelu rozdzielającym, przy napięciu 25 V/cm długości żelu zagęszczającego i 20 V/cm długości żelu rozdzielającego przez 2,5 h. Żel poliakryloamidowy został przygotowany w oparciu o przepis w Sambrook i Russel, 2001, z użyciem odczynników wyszczególnionych w poniższym spisie.

Odczynniki:

- ❖ 30% roztwór akryloamidów
 - Akryloamid (Sigma) 29 g
 - N,N'-metylenobisakryloamid (Sigma) 1 g
 - woda destylowana do 100 ml
- ❖ 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
- ❖ 1 M Tris-HCl pH 6,8
- ❖ 10% SDS (sól sodowa siarczanu dodecyłu)
- ❖ 10% nadsiarczan amonu
- ❖ TEMED (N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina)

- ❖ Bufor Laemmli
 - Tris-HCl (Sigma) 0,3 M, pH 6,8
 - SDS (Sigma) 10% (w/v)
 - DTT (Sigma) 0,5 M
 - Glicerol 50% (v/v)
 - Błękit bromofenolowy 0,05% (w/v)
- ❖ Bufor 5 x Tris-glicyna (pH 8,3)
 - Tris-HCl (Sigma) 15,1 g
 - 10% SDS (Sigma) 50 ml
 - Glicyna 94 g
 - Woda destylowana 900 ml
- ❖ Roztwór barwiący
 - Brilliant Blue R (Sigma) 0,25 g
 - Metanol 50 ml
 - Kwas octowy 10 ml
 - Woda destylowana 40 ml

Stosowane żele poliakrylamidowe:

- ❖ 12% żel rozdzielający 5 ml
 - 30% roztwór akryloamidów 2 ml
 - woda destylowana 1,6 ml
 - 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 1,3 ml
 - 10% SDS 0,05 ml
 - 10% nadsiarazan amonu 0,05 ml
 - TEMED 0,002 ml
- ❖ 5% żel zagęszczający 2 ml
 - 30% roztwór akryloamidów 0,33 ml
 - woda destylowana 1,4 ml
 - 1,0 M Tris-HCl pH 6,8 0,25 ml
 - 10% SDS 0,02 ml
 - 10% nadsiarazan amonu 0,02 ml
 - TEMED 0,002 ml



Po zakończonym rozdziale elektroforetycznym białek, żel umieszczano w pojemniku z roztworem barwiącym na 15 min. Zabarwiony żel płukano wodą destylowaną, a następnie zanurzono w wodzie i gotowano do odbarwienia tła.

4.27 Detekcja białek za pomocą immunoblottingu

❖ Western blotting

Uzyskane próbki białkowe poddawano elektroforezie SDS-PAGE w żelu poliakrylamidowym. Następnie pomiędzy dwiema warstwami bibuły Whatmana nasączonymi uprzednio buforem do elektrotransferu umieszczano błonę nitrocelulozową i żel poliakrylamidowy. Prowadzono transfer pólśuchy przez 1 h przy $0,8 \text{ mA/cm}^2$ żelu. Po zakończeniu transferu błonę płukano trzykrotnie w buforze TBST, a następnie przez 1 h inkubowano, wytrząsając w roztworze 5% mleka odtłuszczonego w buforze TBST z dodatkiem przeciwciał anty-polihistydynowych (rozcieńczenie przeciwciał wynosiło 1:5000), w temperaturze pokojowej. Po inkubacji błonę nitrocelulozową płukano trzykrotnie buforem TBST. Reakcję immunoenzymatyczną wywoływano roztworem DAB, do pojawienia się na błonie ciemnobrązowych prążków świadczących o pozytywnym wyniku reakcji.

❖ Dotblotting

Na błonę nitrocelulozową punktowo nanoszono płyny pochodzące z kultur komórkowych i ekstrakty bezkomórkowe rekombinantowych szczepów *Pichia pastoris* X-33 (jednorazowo maksymalnie 1 μl), powtarzając tę czynność dziesięciokrotnie. Następnie błonę nitrocelulozową inkubowano, wytrząsając w buforze blokującym przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po inkubacji błonę nitrocelulozową płukano trzykrotnie buforem TBST, a następnie przez 1 h inkubowano, wytrząsając w roztworze 5% mleka odtłuszczonego w buforze TBST z dodatkiem przeciwciał anty-polihistydynowych (rozcieńczenie przeciwciał wynosiło 1:5000), w temperaturze pokojowej. Po inkubacji błonę nitrocelulozową płukano trzykrotnie buforem TBST. Reakcję immunoenzymatyczną wywoływano roztworem DAB, do pojawienia się na błonie ciemnobrązowych kropek świadczących o pozytywnym wyniku reakcji.

Odczynniki:

- ❖ Bibuła Whatmana 3MM (Sigma)
- ❖ Błona nitrocelulozowa, wielkość porów 0,45 μm (Sigma)

- ❖ Przeciwciała monoklonalne anty-polihistydynowe, wyznakowane peroksydazą chrzanową (Sigma)
- ❖ Odczynnik do detekcji: 6mg DAB (3,3'-diaminobenzzydina, Sigma); 10 ml 0,05 M Tris- HCl o pH 7,6; 0,5 ml 30% H_2O_2
- ❖ 30% H_2O_2 (Sigma); dodawano 0,1 ml na 9 ml roztworu odczynnika do detekcji DAB rozpuszczonego w 0,05 M Tris-HCl pH 7,6
- ❖ Granulowane mleko odtłuszczone
- ❖ Bufor TBST (pH 7,5): 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Triton X-100
- ❖ Bufor blokujący: Bufor TBST zawierający 5% odtłuszczone mleko granulowane
- ❖ Bufor do elektrotransferu (pH 7,5): 12,5 mM Tris-HCl, 96 mM glicyna, 10% metanol

4.28 Oznaczanie aktywności enzymatycznej rekombinowanych białek EstS9auto, EstS9short i α EstS9short

Oznaczanie aktywności enzymatycznej białek EstS9auto i EstS9short wyprodukowanych w systemie ekspresyjnym *E. coli*

Do 100 μl 20 mM Tris-HCl pH 7,5 dodano 10 μl maślanu *p*-nitrofenylu oraz 30 μl preparatu badanego enzymu rekombinantowego. Mieszaninę inkubowano 9 min w 35°C. Reakcję zatrzymano przez dodanie 140 μl izopropanolu. Mierzono absorbancję próbki przy długości fali 405 nm. Jako jednostkę aktywności (U) badanych enzymów przyjęto ilość enzymu hydrolizującą w ciągu jednej minuty 1 mmol maślanu *p*-nitrofenylu w optymalnej temperaturze i pH, tj. w 35°C w 20 mM Tris-HCl o pH 9,0. Do oznaczania specyficzności substratowej stosowano pochodne estrowe *p*-nitrofenylu o różnej długości łańcucha węglowodorowego.

Wyznaczanie parametrów kinetycznych enzymu EstS9auto wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli*

W celu zbadania kinetyki hydrolizy maślanu *p*-nitrofenylu sporządzono roztwory maślanu *p*-nitrofenylu w acetonitrylu o stężeniu 1-3 mM. Reakcje hydrolizy prowadzono w temperaturach odpowiednio 35, 25 i 15°C. Do próbek zawierających 100 µl buforu 20 mM Tris-HCl pH 7,5 i 10 µl maślanu *p*-nitrofenylu o odpowiednim stężeniu, dodawano 30 µl roztworu preparatu badanego enzymu rekombinantowego i prowadzono reakcje przez 9 min. Reakcje zatrzymano przez dodanie 140 µl izopropanolu. Każde oznaczenie powtarzano trzykrotnie. Kontrole ujemne zostały przygotowane w ten sam sposób, jednak zamiast roztworu enzymu dodano taką samą ilość buforu, w którym enzym był zawieszony. Po zakończeniu reakcji, 100 µl próbek przenoszono do 96-dołkowej mikroplastyki i mierzono absorbancję przy długości fali 405 nm.

W celu wykonania krzywej wzrocowej, sporządzono roztwory *p*-nitrofenolu o stężeniach 0,2-2 mM w acetonitrylu. Mieszaniny przygotowano w taki sam sposób jak kontrolę ujemną, tylko zamiast substratu dodawano 10 µl *p*-nitrofenolu o odpowiednim stężeniu, a następnie 100 µl próbki przenoszono do 96 dołkowej mikroplastyki i mierzono absorbancję przy długości fali 405 nm.

Parametry kinetyczne obliczono przy użyciu programu GraphPadprism.

Oznaczenie aktywności enzymatycznej białka α EstS9short wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *P. pastoris*

Do 30 µl 20 mM Tris-HCl o pH 9,0 dodano 10 µl maślanu *p*-nitrofenylu oraz 30 µl roztworu enzymu. Mieszaninę inkubowano 40 min w 60°C. Reakcję zatrzymano przez dodanie 70 µl izopropanolu. Mierzono absorbancję przy długości fali 405 nm. Jako jednostkę aktywności (U) przyjęto ilość enzymu hydrolizującą w ciągu jednej minuty 1 mmol maślanu *p*-nitrofenylu w optymalnej temperaturze i pH, tj. w 60°C w 20 mM Tris-HCl o pH 9,0.

Do oznaczania specyficzności substratowej stosowano pochodne estrowe *p*-nitrofenylu o różnej długości łańcucha węglowodorowego.

Wyznaczanie parametrów kinetycznych enzymu α EstS9short wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *P. pastoris*

W celu zbadania kinetyki hydrolizy maślanu *p*-nitrofenylu i octanu *p*-nitrofenylu, sporządzono roztwory związków w acetonitrylu o stężeniu 10-75 mM. Reakcje hydrolizy prowadzono w temperaturach 35°C i 60°C. Do próbek zawierających 30 μ l 20 mM Tris-HCl o pH 9,0 i 10 μ l maślanu *p*-nitrofenylu bądź octanu *p*-nitrofenylu o odpowiednim stężeniu, dodawano 30 μ l preparatu badanego enzymu rekombinantowego i prowadzono reakcje przez 40 min. Reakcje zatrzymano przez dodanie 70 μ l izopropanolu. Każdą z nich prowadzono 3 razy. Kontrole ujemne zostały przygotowane w ten sam sposób, jednak zamiast roztworu białka dodano tą samą ilość buforu, w którym białko było zawieszone. Po zakończeniu reakcji 100 μ l próbek przenoszono do 96-dołkowej mikro płytki i mierzono absorbancję przy długości fali 405 nm.

W celu wykonania krzywej wzrocowej, sporządzono roztwory *p*-nitrofenolu w acetonitrylu o stężeniach 0,2- 3 mM. Mieszaniny przygotowano w taki sam sposób jak kontrolę ujemną, tylko zamiast substratu dodawano 10 μ l *p*-nitrofenolu o odpowiednim stężeniu, a następnie 100 μ l próbki przenoszono do 96 dołkowej mikro płytki i mierzono absorbancję przy długości fali 405 nm.

Parametry kinetyczne obliczono przy użyciu programu GraphPadprism.

Odczynniki:

- ❖ 50 mM octan *p*-nitrofenylu (C2) (Sigma) w acetonitrylu
- ❖ 50 mM maślan *p*-nitrofenylu (C4) (Sigma) w acetonitrylu
- ❖ 50 mM kaprylan *p*-nitrofenylu (C8) (Sigma) w acetonitrylu
- ❖ 50 mM kaprynian *p*-nitrofenylu (C10) (Sigma) w acetonitrylu
- ❖ 50 mM palmitynian *p*-nitrofenylu (C16) (Sigma) w heksanie
- ❖ 50 mM stearynian *p*-nitrofenylu (C18) (Sigma) w heksanie
- ❖ *p*-nitrofenol (Sigma)
- ❖ 20 mM Tris-HCl pH 7,5 (Sigma)
- ❖ bufor Brittona-Robinsona pH 2,0-12,0 (co 0,5): mieszanina 1:1:1 40 mM H₃BO₃, 40 mM H₂PO₄, 40 mM CH₃COOH; pH ustalano za pomocą NaOH
- ❖ 50 mM: CaCl₂, CdCl₂, CuCl₂, MgCl₂, NiCl₂, ZnCl₂
- ❖ 50 mM: β -merkaptoetanol (Sigma), DTT (Sigma), EDTA, glutation w formie utlenionej i zredukowanej (Sigma)

4.29 Analiza poprawności skonstruowanych plazmidów rekombinantowych

Poprawność konstrukcji plazmidów rekombinantowych sprawdzano poprzez:

- ❖ Analizę wielkości DNA plazmidów rekombinantowych

Wyizolowane DNA plazmidów rekombinantowych pBADestS9short, pGAPestS9auto, pGAPestS9short, pGAPaestS9auto, pGAPaestS9short, pPICZestS9auto, pPICZestS9short, pPICZaestS9auto oraz pPICZaestS9short. poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym w celu sprawdzenia opóźnienia migracji w stosunku do odpowiednich wektorów plazmidowych, tj. pBADMycHisA, pGAPZαB, pPICZαA. DNA plazmidowe wykazujące mniejszą ruchliwość elektroforetyczną w stosunku do DNA wektorów plazmidowych wybierano do dalszych analiz.

- ❖ Analizę obecności wklonowania właściwego insertu DNA w plazmidzie rekombinantowym za pomocą techniki PCR

Przeprowadzano reakcję PCR na matrycy DNA plazmidów rekombinantowych. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji były identyczne jak dla amplifikacji insertów DNA (Materiały i metody 4.18). Wyniki reakcji PCR analizowano za pomocą elektroforezy agarozowej (1-2% żele agarozowe) (Materiały i metody 4.8).

- ❖ Analizę restrykcyjną

DNA plazmidów rekombinantowych trawiono wybranymi enzymami restrykcyjnymi (Tabela 6). Wyniki analizowano za pomocą elektroforezy agarozowej (1-2% żele agarozowe) (Materiały i metody 4.8) i uzyskane wzory restrykcyjne porównywano z symulacją trawienia poszczególnych plazmidów rekombinantowych wykonaną z użyciem programu Clone v. 1.04.

- ❖ Sekwencjonowanie

W celu jednoznacznego potwierdzenia poprawności skonstruowania plazmidów rekombinantowych, przeprowadzono sekwencjonowanie w firmie Genomed, przy użyciu zmodyfikowanej metody Sangera bazującej na wykorzystaniu elektroforezy kapilarnej (ABI PRISM Genetic Analyzer 3130xl), z wykorzystaniem starterów standardowych pBADForward i pBADReverse dla plazmidu pBADestS9short, pGAPForward i 3AOX' dla plazmidów pGAPsygestS9auto, pGAPsygestS9short, pGAPaestS9auto, pGAPaestS9short

bądź specjalnie w tym celu zaprojektowanych starterów zamawianych w firmie GENOMED. Wyniki sekwencjonowania analizowano z użyciem narzędzia blast2sequences porównując je z sekwencją DNA insertów wprowadzonych do wybranych wektorów plazmidowych na drodze klonowania molekularnego.

Tabela 6. Enzymy restrykcyjne wykorzystane do analizy uzyskanych plazmidów rekombinantowych.

Nazwa plazmidu	Enzymy restrykcyjne
pBADestS9short	<i>NcoI</i> i <i>HindIII</i> <i>PstI</i> i <i>HindIII</i>
pGAPaestS9auto pGAPaestS9short pGAPsygestS9auto pGAPsygestS9short	<i>NcoI</i>
pPICZaestS9auto pPICZaestS9short pPICZsygestS9auto pPICZsygestS9short	<i>NcoI</i>

4.30 Aparatura

- Aparat do elektroforezy agarozowej (BioComdirect)
- Aparat do elektroforezy poliakryloamidowej (DNA Gdańsk)
- Autoklaw (PrestigeMedical)
- Czytnik mikroplitek Plate Reader AF2200 (Eppendorf)
- Dezintegrator ultradźwiękowy SoniPrep 150 MSE (SANYO)
- Elektroporator Gene PulserXcell (BioRAD)
- Komora laminarna MSC-Advantage (Thermo Fisher Scientific)
- Lampa UV
- Mikrowirówka Legend Micro 17R (Thermo Scientific)
- pH-metr (Mettler Toledo)
- Spektrofotometr – BioSpectrometer kinetic (Eppendorf)

- Termoblok – ThermoStat C (Eppendorf)
- Termomikser – ThermoMixer C (Eppendorf)
- Termocykler Veriti (Applied Biosystem)
- Waga (Ohaus)
- Worteks (VelpScientifica)
- Wirówka Sigma 6 K15 (Sigma)
- Wirówka Legend X1R (Thermo Fisher Scientific)
- Wyrząsarka Model 4360 (Thermo Fisher Scientific)
- Wyrząsarka powietrzna MAXQ 6000 (Thermo Fisher Scientific)
- Wyrząsarka Unitron (Infors)
- Zasilacz stabilizowany prądu stałego CS-300V (BioComdirect)

5. WYNIKI I DYSKUSJA

Wstęp

Niniejsza rozprawa doktorska jest kontynuacją badań rozpoczętych w trakcie realizacji mojej pracy magisterskiej. Otrzymane wyniki i pytania jakie pojawiły się w czasie ich analizy stały się inspiracją do dalszej pracy.

Streszczenie wyników badań wykonanych w czasie realizacji pracy magisterskiej oraz przedstawienie najważniejszych wniosków płynących z ich analizy

W ramach mojej pracy dyplomowej pracowałam z izolatem psychrotolerancyjnej bakterii oznaczonym jako S9, znajdującym się w kolekcji mikroorganizmów Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej. Izolat S9 został wyizolowany z próbki gleby ze Spitzbergenu i charakteryzował się aktywnością lipolityczną.

W trakcie realizacji pracy magisterskiej:

- Ustalono, na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej fragmentu genu 16S rDNA izolatu S9, że izolat ten jest szczepem bakterii z rodzaju *Pseudomonas*;
- zidentyfikowano i wyizolowano gen *estS9* odpowiedzialny za właściwości lipolityczne *Pseudomonas* sp. S9;
- na podstawie sekwencji nukleotydowej genu *estS9* uzyskano *in silico* domniemaną sekwencję aminokwasową enzymu lipolitycznego EstS9 z *Pseudomonas* sp. S9 (Rys. 6) oraz na podstawie tej sekwencji wyznaczono dla enzymu EstS9 teoretyczny punkt izoelektryczny ($pI = 4,77$) i przewidywaną masę cząsteczkową ($M_w = 68\ 739,6$ Da);
- przeprowadzono analizę sekwencji aminokwasowej EstS9, która wykazała, że enzym ten składa się z dwóch domniemanych domen białkowych: domeny o aktywności esterazy/lipazy należącej do rodziny hydrolaz SGNH (reszty aminokwasowe ~29-320) i β -domeny autotransportera (reszty aminokwasowe ~360-626) oraz potencjalnego peptydu sygnałowego (reszt aminokwasowe 1-19) mogącego mieć znaczenie w transporcie tego enzymu

do przestrzeni periplazmatycznej komórki bakterii *Pseudomonas* sp. S9 (Rys. 5);

- wykonano analizę sekwencji aminokwasowej N-końcowej domeny esterazy/lipazy EstS9 i stwierdzono obecność zakonserwowanej triady katalitycznej Ser38, Asp162 i His303 oraz zakonserwowanego motywu GDSL w otoczeniu katalitycznej reszty seryny, który jest typowy dla enzymów lipolitycznych należących do rodziny GDSL tj. II rodziny enzymów lipolitycznych (Tabela 2),
- skonstruowano rekombinantowy szczep bakterii *Escherichia coli* TOP10/pBADestS9auto, producenta rekombinantowego białka EstS9Auto, tj. białka EstS9 z dołączoną na C-końcu domeną oligohistydynową, umożliwiającą jego efektywne oczyszczanie za pomocą chromatografii metalopowinowactwa;
- opracowano wydajną metodę oczyszczania białka EstS9Auto, produkowanego w postaci ciałek inkluzyjnych w komórkach *E. coli*, w warunkach denaturujących z użyciem chromatografii metalopowinowactwa;
- przeprowadzono renaturację białka poprzez dializę, a także potwierdzono aktywność lipolityczną otrzymanego preparatu oczyszczonego białka EstS9Auto.

Niestety w ramach pracy magisterskiej nie udało się wykonać pełnej charakterystyki właściwości enzymatycznych EstS9Auto, stąd pierwszym etapem badań w ramach mojej pracy doktorskiej było wykonanie tej analizy (Wyniki i dyskusja 5.1).

Ponadto, kierunek i zakres badań prowadzonych w ramach poniższej pracy został określony w oparciu o następującą analizę.

Zgodnie z wiedzą jaką posiadałam po zakończeniu pracy magisterskiej w 2012 r., w tym czasie były znane i scharakteryzowane tylko dwie esterazy należące do rodziny GDSL, tj. EstA (~ 23 kDa) z *Pseudomonas* sp. 643A (Cieśliński i in. 2007) oraz PsEst1 (~70 kDa) z *Pseudomonas* sp. B11-1 (Suzuki i in. 2003). Badany enzym z *Pseudomonas* sp. S9 wykazał wysokie podobieństwo budowy do esterazy PsEst1 z *Pseudomonas* sp. B11-1 (Suzuki i in. 2003) także składającej się z N-terminalnej domeny katalitycznej należącej do rodziny hydrolaz SGNH i C-terminalnej domeny autotransporterera. Obecność domen autotransporterowych w obu enzymach sugeruje, że oba białka wydzielane są za pomocą systemu sekrecji typu Va (Henderson i in. 2004).

Jednakże wśród dostępnej literatury nie ma pracy, która potwierdzałaby tą hipotezę dla enzymu PsEst1. Dodatkowo, w pracy Suzuki i in. 2003 obecność domeny autotransporterera w enzymie PsEst1 nie została odnotowana.

Ponadto, przeprowadzona przeze mnie analiza danych literaturowych wykazała, że w przypadku białek zbudowanych z N-terminalnej domeny katalitycznej oraz C-terminalnej domeny autotransporterera i transportowanych za pomocą V_a systemu sekrecji, możliwe są trzy różne efekty końcowe sekrecji białka a) białko w postaci dwudomenowej kotwiczy się w błonie zewnętrznej bakterii, domena katalityczna zwrócona jest na zewnątrz komórki, b) po przetransportowaniu domeny katalitycznej na zewnątrz komórki jest ona odcinana przez autoprotolizę od domeny transporterera i uwalniana do środowiska i c) po przetransportowaniu na zewnątrz komórki domena katalityczna uwalniana jest do środowiska na skutek jej odcięcia od domeny autotransporterera przez inną proteazę (Henderson i in. 1998). W związku z tym wysunięto dwie hipotezy. Według pierwszej, natywna forma enzymu lipolitycznego z *Pseudomonas* sp. S9 składa się tylko z jednej domeny, tj. domeny katalitycznej, która jest wydzielana na zewnątrz komórki bakteryjnej. Według drugiej, natywny enzym lipolityczny z *Pseudomonas* sp. S9 składa się z dwóch domen, katalitycznej i domeny autotransporterera, która kotwiczy białko w błonie zewnętrznej bakterii, zaś domena katalityczna prezentowana jest na zewnątrz komórki. Udowodnienie, która z hipotez jest prawdziwa może stanowić temat badań podstawowych. Jednakże, ponieważ nadrzędnym celem zespołu naukowego, do którego dołączyłam w czasie moich studiów doktoranckich jest poszukiwanie biotechnologicznie użytecznych enzymów aktywnych w niskiej temperaturze (badania stosowane), głównym i pierwszym celem pracy doktorskiej było porównanie właściwości biochemicznych dwóch białek rekombinantowych tj. wariantu dwudomenowego (EstS9Auto) i jednodomenowego (EstS9short) badanej esterazy (Rys. 5) produkowanych w systemie ekspresyjnym *E. coli*. Dodatkowo, oba badane warianty sekwencyjne esterazy EstS9 są białkami fuzyjnymi zawierającymi C-terminalną domenę oligohistydynową (tzw. His-tag). Domena ta została wprowadzona w celu umożliwienia efektywnego oczyszczania rekombinantowych białek z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa. Ponadto, w obu przypadkach usunięto natywną sekwencję sygnałną esterazy S9 (Rys. 5). Pomimo faktu, że *E. coli* posiada system Sec (transport białek do periplazmy), gatunek ten nie jest uznawany jako zdolny do wydajnej sekrecji białek na zewnątrz

komórki. Dzięki wspomnianemu rozwiązaniu oba białka mogą być wydajnie produkowane i gromadzone wewnątrz komórki *E. coli*.



Rys. 5. Schemat topologiczny białek: A) natywne białko EstS9 B) białko EstS9Auto, C) białko EstS9short. Kolor szary - peptyd sygnałowy, pomarańczowy - domena katalityczna, zielony - domena autotransporterowa, niebieski - domena oligohistydynowa.

Kolejnym celem pracy było porównanie właściwości enzymatycznych obu rekombinantowych wariantów esterazy z właściwościami innych znanych esteraz aktywnych w niskiej temperaturze (Tabela 2), a w szczególności z właściwościami esterazy PsEstI (Suzuki i inni. 2003). Co ważne, enzym PsEstI, tak jak enzym EstS9Auto, był także produkowany w *E. coli* w postaci ciałek inkluzyjnych po czym, izolowany i oczyszczany w warunkach denaturujących z zastosowaniem chromatografii metalopowinowactwa. Stąd, dodatkowym ważnym powodem konstrukcji rekombinantowego szczepu *E. coli* umożliwiającego wydajną produkcję białka EstS9short pozbawionego domeny autotransporterowa, poza faktem, że dojrzałe białko natywne EstS9 może być zbudowane tylko z domeny katalitycznej (Henderson i in., 1998), była chęć sprawdzenia czy ten wariant sekwencyjny enzymu EstS9 będzie wydajnie produkowany w postaci „rozpuszczalnej” w cytoplazmie *E. coli*. Skonstruowanie, dzięki połączeniu inżynierii genetycznej i inżynierii białkowej, aktywnej enzymatycznie rekombinantowej esterazy, wydajnie produkowanej w dobrze poznanym gospodarzu bakteryjnym byłoby dużym krokiem w kierunku otrzymania atrakcyjnego ekonomicznie i biotechnologicznie biokatalizatora aktywnego w niskiej temperaturze.

```

1 MIKQTLFVPL AGCLLAMACA QAIAAPNPYTHFVVFGDSLLN DAGTFADTGG
PAGSTERFTN

61 RTGPVYLDGS GEVRSLNSTQ ILGGKLGFS A DQTASSSSAV RANNGQPDGN
NWA VGGYRTD

121 QILDSITSTS ATGDRTRAGY LPSNNFRADP NALYYLSGGG NFLQGRVTS
LPQASAAADR

181 LVSSVQTLQQ AGARYIMVWL LPDIGFTPAF NGTPLQAFTS QLSAQFNTL
VSQ LQNVNAN

241 VIPLNIPVLL KETFANPGQF GLATDQNL SA TCFSGDSC TE NARYGINSAT
PDPTKLIYND

301 AVPTEAGQR LIADYAYSLL SAPWEATLLP QMAQGTLSH QDELRNQWLA
DWENWQGVGQ

361 WRAIVAGGGQ HQDFDSQRS G ASADGNGANL NIGGSYRLND AWRVGLAAGF
YNQKLEAGDH

421 DSDYKLNTYM GTAFAQYQQN RWWGDAAVTA GHLDYDSLKR KFQLGVNERG
EKGD TDGYLV

481 AVSGRLGYDI APEASSPWHL SPFVSADFAK VEVDGYSEDG ADSTALTFDD
QSRISRRLGL

541 GIQGYQITS QTQVFGELAH EREYNDTQD VTMNLNSLPN NRYTLAGYTP
QTNLNRLNLG

601 VSHNLTKDLA LRASYDIRKD DDFTQQGINV GVALDF

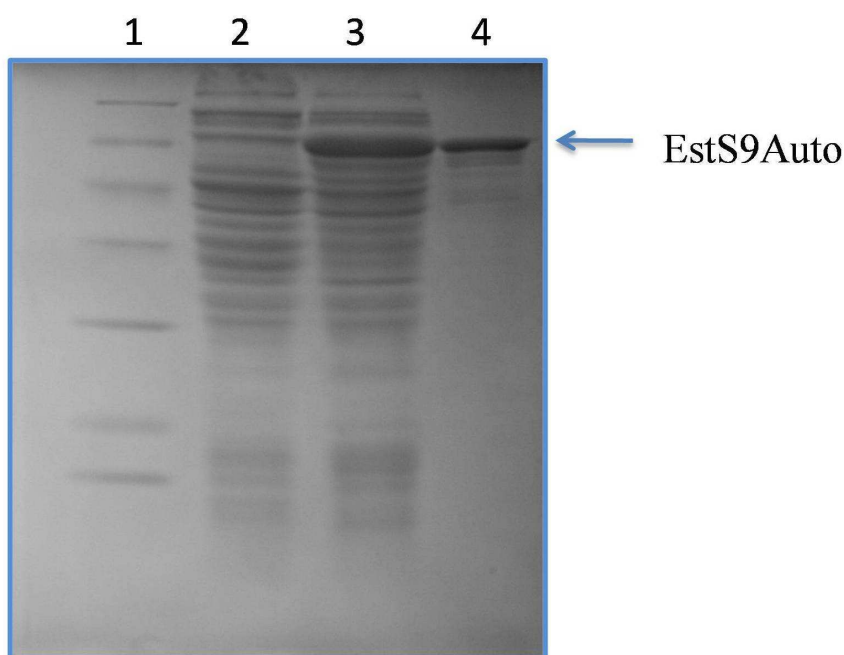
```

Rys. 6. Sekwencja aminokwasowa enzymu lipolitycznego EstS9 z *Pseudomonas* sp. S9 wraz z sekwencją sygnałną zaznaczoną kolorem fioletowym, sekwencją domeny katalitycznej oznaczoną granatową czcionką i sekwencją autotransportera oznaczoną pomarańczową czcionką. Triadę katalityczną SDH zaznaczono na zielono, a motyw GDSL na żółto.

5.1 Charakterystyka właściwości biochemicznych esterazy EstS9Auto produkowanej w komórkach *Escherichia coli*

Moje badania w ramach pracy doktorskiej rozpoczęłam od przeprowadzenia charakterystyki właściwości biochemicznych esterazy EstS9Auto produkowanej w komórkach *E. coli*.

Wszystkie pomiary aktywności prowadzono z wykorzystaniem preparatu białka EstS9Auto (0,58 mg/ml) z C-końcową domeną oligohistydynową, oczyszczonego przy użyciu chromatografii metalopowinowactwa na złożu ze związanymi jonami Ni^{2+} w warunkach denaturujących i następnie poddanego dializie wobec buforu DX (Rys. 7) (Materiały i metody 4.16).



Rys. 7 Wyniki analizy SDS-PAGE. 1 – Wzorzec masy cząsteczkowej białek (Unstained Protein Molecular Weight Marker 116-14,4 kDa, Thermo Fisher Scientific); 2 - Ekstrakt bezkomórkowy *E. coli* TOP10/ pBADestS9auto; 3 - Ekstrakt bezkomórkowy *E. coli* TOP10/pBADestS9auto po rozpuszczaniu ciał inkluzyjnych; 4 - Oczyszczony preparat enzymatyczny EstS9Auto po renaturacji.

5.1.2 Analiza specyficzności substratowej EstS9Auto

Pierwszym wykonanym badaniem było wyznaczenie specyficzności substratowej preparatu białka EstS9Auto (Materiały i metody 4.28), w celu określenia

długości łańcucha węglowodorowego (reszta kwasu monokarboksylowego) preferowanego substratu. Badania potwierdziły wynik analizy bioinformatycznej sugerujący, że enzym EstS9 jest prawdopodobnie esterazą. Enzym rekombinantowy EstS9Auto wykazał typową dla esteraz preferencję do hydrolizy estrów *p*-nitrofenylu krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, przy czym największą aktywność wykazywał wobec maślanu *p*-nitrofenylu (Tabela 7). Esteraza PsEst1 z *Pseudomonas* sp. B11-1, podobnie jak badany enzym EstS9Auto, charakteryzuje się najwyższą aktywnością wobec maślanu *p*-nitrofenylu (Suzuki i in. 2003). Wykonane poniżej porównanie właściwości enzymatycznych obu esteraz uwzględnia wyniki analogicznych pomiarów wykonane dla tego substratu.

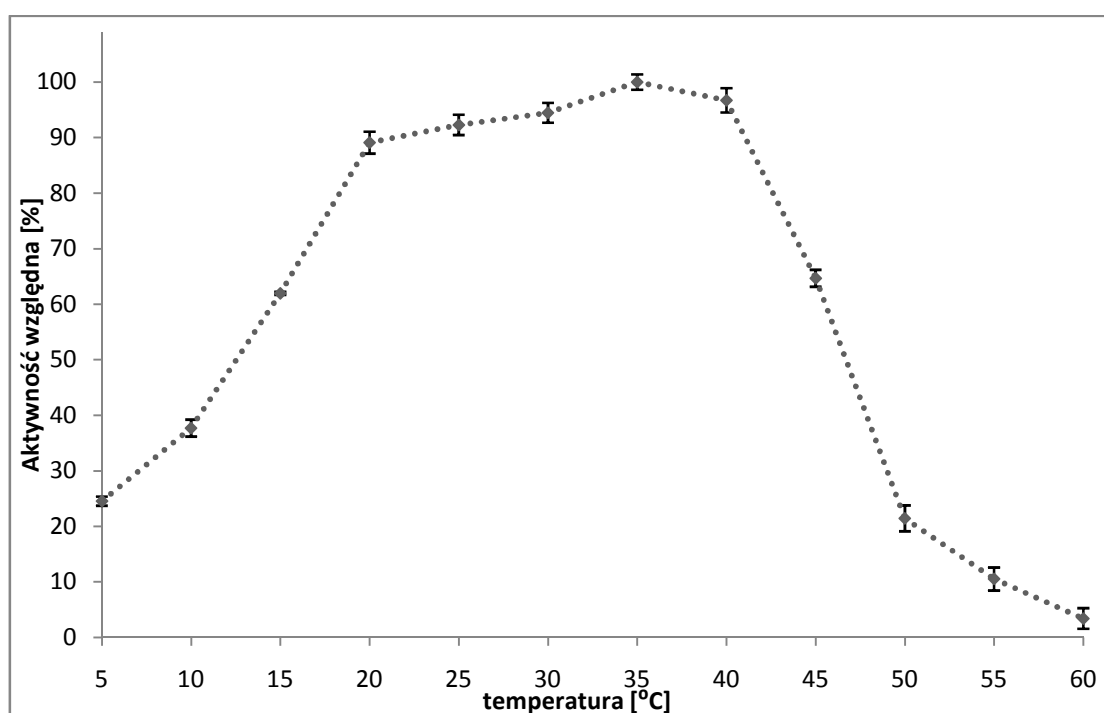
Tabela 7. Wyniki analizy specyficzności substratowej EstS9Auto wyprodukowanej w systemie ekspresyjnym *E. coli*

Substrat	Aktywność względna [%]
octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	53 ± 5,1
maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	100 ± 2,5
kaprylan <i>p</i> -nitrofenylu (C8)	15,5 ± 1,9
kaprynian <i>p</i> -nitrofenylu (C10)	6,9 ± 0,8
palmitynian <i>p</i> -nitrofenylu (C16)	< 0,01
stearynian <i>p</i> -nitrofenylu (C18)	< 0,01

5.1.3 Wpływ temperatury na aktywność esterazy EstS9Auto

W celu określenia wpływu temperatury na aktywność esterazy EstS9Auto, oznaczano aktywność enzymu wobec maślanu *p*-nitrofenylu w różnych temperaturach, w zakresie 5-60°C, w roztworze buforowym 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Materiały i metody 4.28). Wyniki zestawiono na rysunku 8. Optymalna temperatura dla działania enzymu EstS9Auto z *Pseudomonas* sp. S9 produkowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli* wynosi 35°C. Białko EstS9Auto jest wysoce aktywne w zakresie temperatury 20-40°C (powyżej 90% aktywności). Uzyskany wynik porównano z analogicznymi wynikami badań dla esterazy PsEstI z *Pseudomonas* sp. B11-1 produkowanej także w systemie ekspresyjnym *E. coli*. Enzym PstEstI wykazywał maksymalną aktywność w temperaturze 45°C (Suzuki i in. 2003).

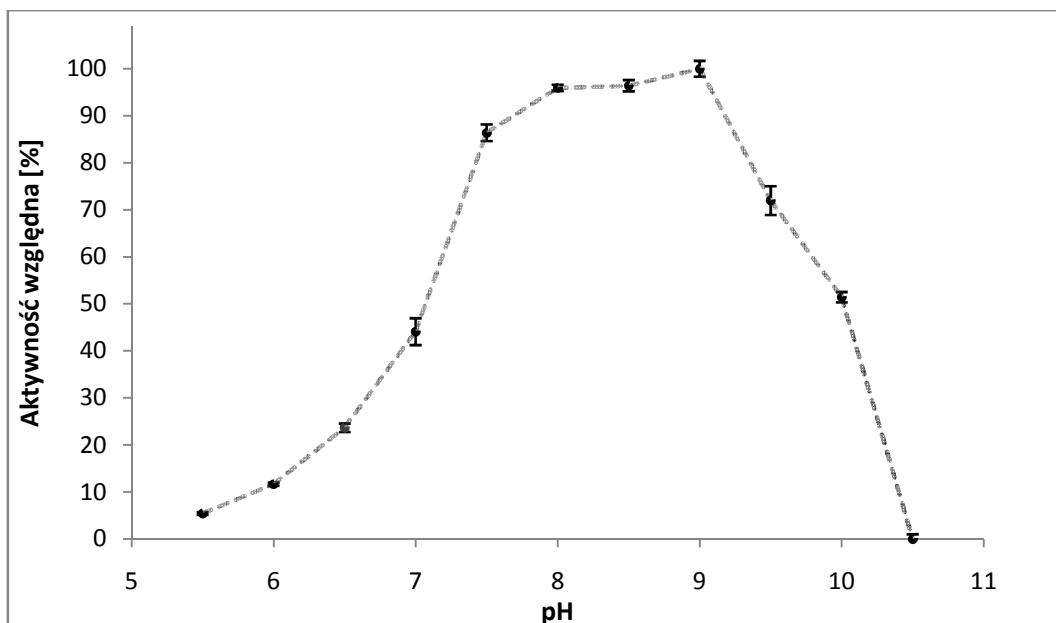
Dla porównania, scharakteryzowane bakteryjne esterazy aktywne w niskich temperaturach esterazy wykazują maksymalną aktywność w zakresie temperatur 20-45°C (Tabela 2). Wyjątkiem jest esteraza EstS (Jiang i in. 2016) oraz Lp_3505 (Esteban-Torres i in. 2014), których optymalne temperatury działania wynoszą odpowiednio 10°C i 5°C. Podsumowując, temperaturowe optimum aktywności badanej rekombinantowej esterazy nie odbiega od wartości tego parametru dla większości znanych i scharakteryzowanych esteraz aktywnych w niskiej temperaturze (Tabela 2). Co warto podkreślić, badany enzym zachowuje 90% swojej maksymalnej aktywności w temperaturze 20°C.



Rys. 8. Wpływ temperatury na aktywność enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli*.

5.1.4 Wpływ pH na aktywność EstS9Auto

W celu określenia wpływu pH na aktywność esterazy EstS9Auto, oznaczano aktywność enzymu wobec maślanu *p*-nitrofenyłu w temperaturze 25°C, w buforach Brittona-Robinsona w zakresie pH 2,0-12,0 (Materiały i metody 4.28). Wyniki zestawiono na rysunku 9. W buforach o pH w zakresie 2,0-5,0 oraz 11,0-12,0 enzym nie wykazywał aktywności.



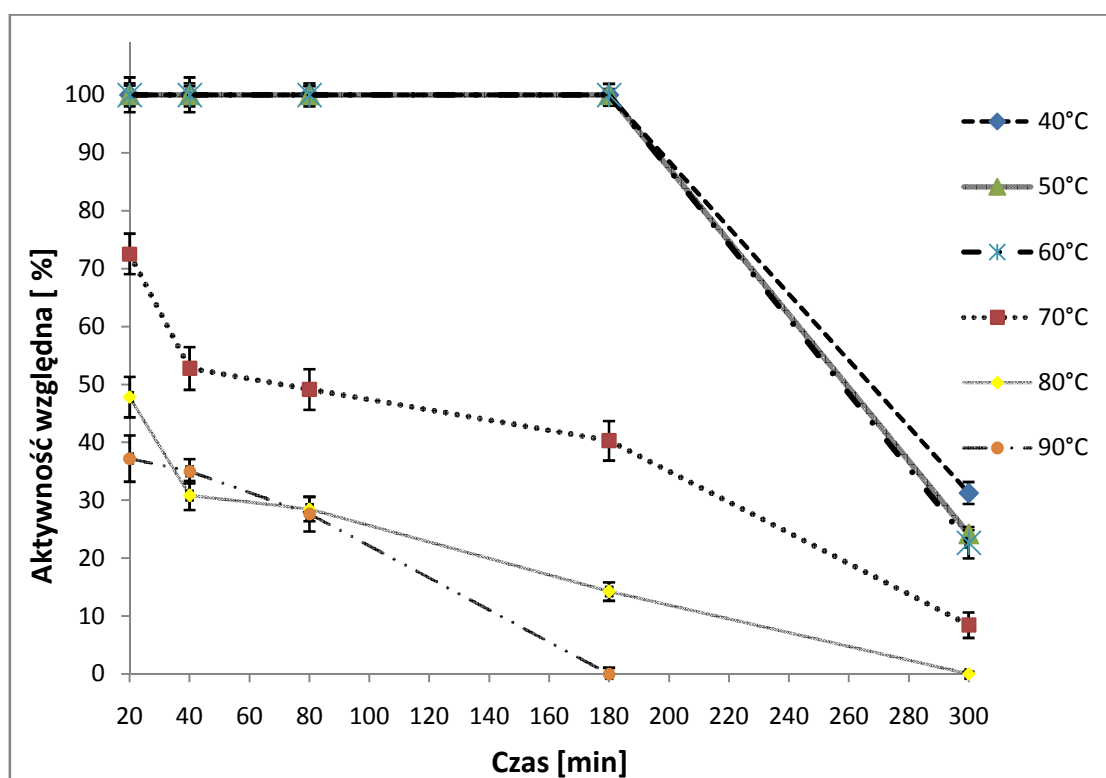
Rys. 9. Wpływ pH na aktywność enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli*.

Badana esteraza wykazuje powyżej 50% aktywność w zakresie pH 7,5-10,0 z maksymalną aktywnością w pH równym 9,0. Powyżej pH 10 enzym bardzo szybko traci zdolność do hydrolizy maślanu *p*-nitrofenyłu. Dla porównania, esteraza PsEst1 z *Pseudomonas* sp. B11-1 wykazuje najwyższą aktywność wobec tego samego substratu w pH równym 8,0 (Suzuki i in. 2003). Inne scharakteryzowane aktywne w niskiej temperaturze bakteryjne enzymy esterolityczne również wykazują maksymalną aktywność w środowisku o odczynie zasadowym, w zakresie pH 7,5 do 11,0 (Tabela 2). Wyjątkiem są esterazy Lp_3505 i Lp_2631 z *Lactobacillus plantarum* WCFS1, które najwyższą aktywność wykazują odpowiednio w pH równym 6,0 i 6,5 (Esteban-Torres i in. 2014).

5.1.5. Wpływ temperatury na stabilność EstS9Auto

W celu określenia wpływu temperatury na stabilność esterazy EstS9Auto, preparat enzymu inkubowano 5 h w różnych temperaturach (w zakresie 40-90°C) w optymalnym pH równym 9,0, a następnie mierzono aktywność enzymu wobec maślanu *p*-nitrofenyłu w 25°C (Materiały i metody 4.28). Wyniki pokazano na rysunku 10. Esteraza EstS9Auto pozostaje stabilna w 60°C przez 3 h. Enzym wykazuje 37%

aktywności po 20 minutowej inkubacji w 90°C. Dla porównania, esteraza PsEst1 całkowicie traci aktywność po 30 minutowej inkubacji w temperaturze równej 50°C. Natomiast, esteraza EstO wykazuje 50% swojej aktywności po 2,5 h inkubacji enzymu w 90°C, a esteraza EstPc po 60 min w 80°C pozostaje znacząco aktywna (powyżej 60% aktywności). Jednak większość esteraz traci swoją aktywność w zakresie temperatury 50-70°C (30 minutowa bądź krótsza inkubacja inaktywuje enzym) (Tabela 2). Podsumowując, w porównaniu do znacznej części esteraz (Tabela 2), EstS9Auto wykazuje wysoką odporność na wpływ temperatury wyższej od temperatury optymalnej dla jej aktywności. Enzym ten charakteryzuje wyższa termostabilność w porównaniu do większości esteraz przedstawionych w tabeli 2. Badany enzym wykazuje ~50% aktywności po 3 godzinnej inkubacji w temperaturze 70°C.

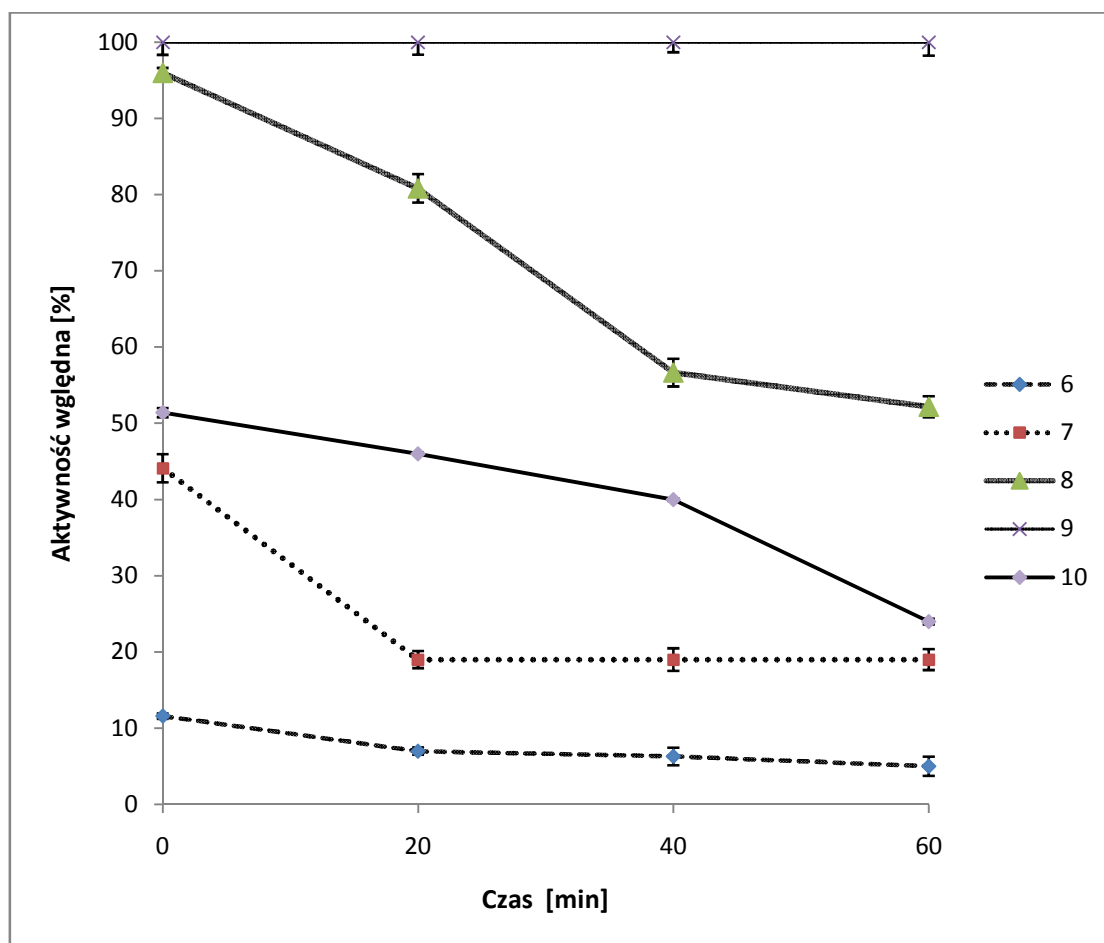


Rys 10. Wpływ temperatury na stabilność enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli*.

5.1.6 Wpływ pH na stabilność EstS9Auto

W celu określenia wpływu pH na stabilność enzymu, preparat esterazy EstS9Auto inkubowano 1 h w 25°C, w buforach Brittona-Robinsona o pH w zakresie 2,0-12,0, a następnie mierzono aktywność wobec maślanu *p*-nitrofenylu w temperaturze

25⁰C (Materiały i metody 4.28). Wyniki zestawiono na rysunku 11. W buforach o pH w zakresie 2,0-5,0 oraz 11,0-12,0 enzym nie wykazywał aktywności.

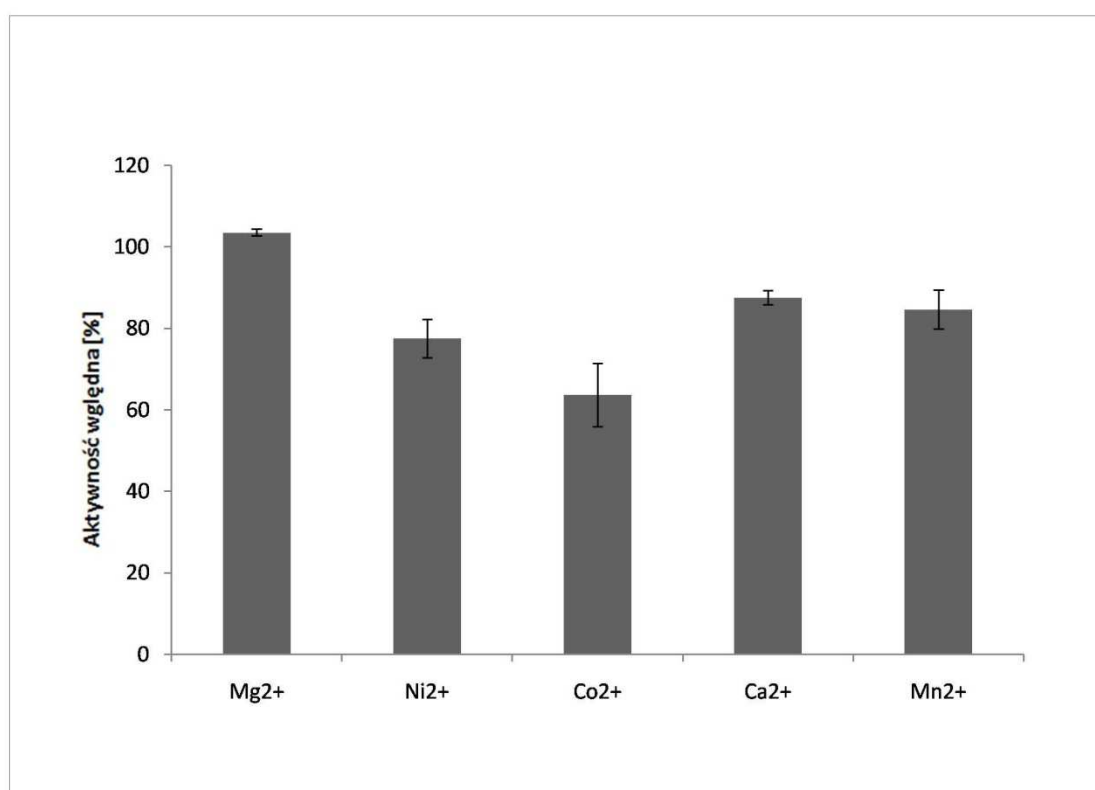


Rys 11. Wpływ pH na stabilność enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli*.

Esteraza EstS9Auto zachowuje stabilność w roztworach buforowych o pH w zakresie 8,0-10,0. Największą stabilność enzym wykazuje w pH 9,0 i jest to również wartość pH, w którym EstS9Auto wykazuje optimum aktywności enzymatycznej (Rozdział 5.1.4). Dla porównania, esteraza PsEst1 jest stabilna w dużo szerszym zakresie pH 2,2-11,9. Jednakże wiele znanych esteraz, podobnie jak badany enzym, wykazuje dość wąski zakres „pH-stabilności”, np. enzymy EstIM1, LipA i LipP są stabilne w pH 6-9, zaś EstO i Est12 w pH 6-10 (Tabela 2).

5.1.7 Wpływ wybranych jonów metali na aktywność esterazy EstS9Auto

W celu określenia wpływu wybranych jonów metali na aktywność esterazy EstS9Auto, preparat enzymu inkubowano 1 h w temperaturze 25°C, w roztworze buforowym 20 mM Tris-HCl o pH 9,0, zawierającym wybrane chlorki metali (Materiały i metody 4.28) o końcowym stężeniu 5 mM. Kontrolę stanowił preparat esterazy EstS9 inkubowany 1 h w 25°C, w 20 mM Tris-HCl o pH 9,0. Po okresie inkubacji mierzono aktywność enzymu wobec maślanu *p*-nitrofenylu w 25°C. Wyniki zestawiono na rysunku 12.



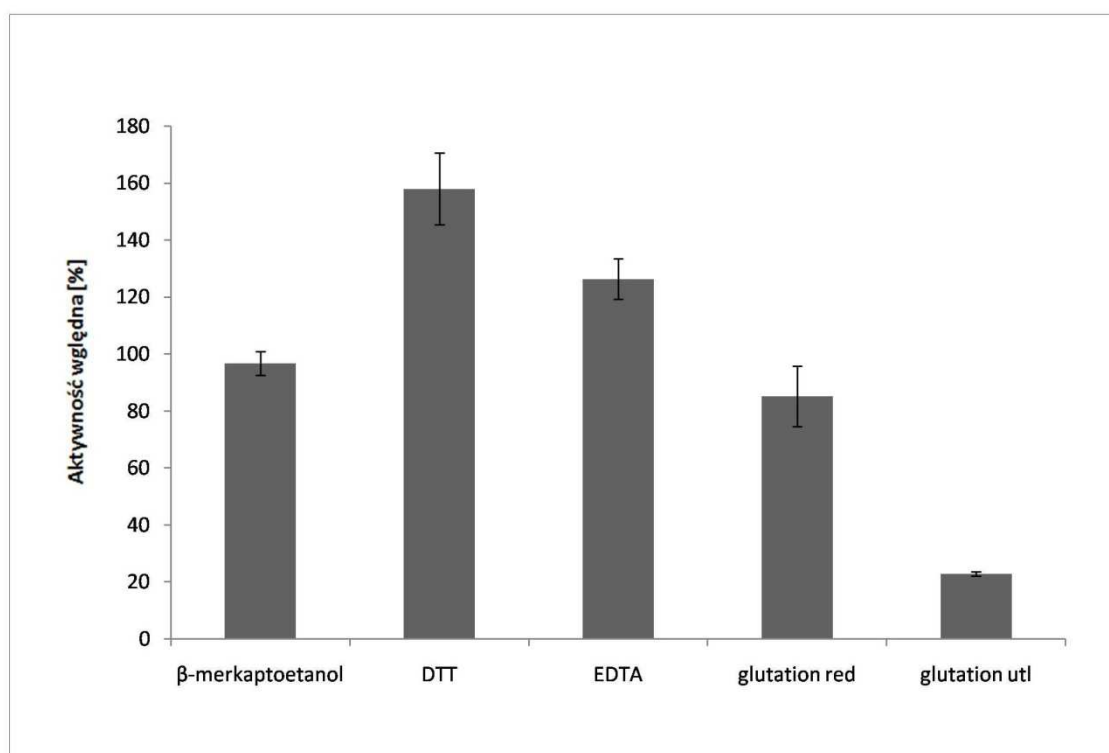
Rys 12. Wpływ wybranych jonów metali na aktywność enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli*.

Aktywność enzymu EstS9Auto hamowana jest w obecności jonów kobaltu, a także nieznacznie przez jony niklu, wapnia i manganu. Inhibitorami enzymów lipolitycznych z reguły są jony metali ciężkich (Saxena i in., 1999) (Tabela 2), co potwierdziło się także w przypadku esterazy EstS9Auto. Jony magnezu w niewielkim stopniu aktywują badaną esterazę. Dla porównania, na aktywność esterazy PsEst1

również nie miały znaczącego wpływu jony wapnia, magnezu, manganu i kobaltu (powyżej 70% aktywności) (Tabela 2).

5.1.8 Wpływ wybranych związków chemicznych na aktywność esterazy EstS9Auto

W celu określenia wpływu wybranych związków chemicznych na aktywność esterazy EstS9Auto, preparat enzymu inkubowano 1 h w temperaturze 25°C, w buforze 20 mM Tris-HCl o pH 9,0, zawierającym roztwory wybranych związków chemicznych (Materiały i metody 4.28) o końcowym stężeniu 5mM. Kontrolę stanowił preparat esterazy EstS9Auto inkubowany 1 h w 25°C, w 20 mM Tris-HCl o pH 9,0. Po inkubacji mierzono aktywność enzymu wobec maślanu *p*-nitrofenylu w 25°C. Wyniki zestawiono na rysunku 13.



Rys. 13. Wpływ niektórych związków chemicznych na aktywność enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli*.

Aktywność białka EstS9Auto jest hamowana w obecności zredukowanego i utlenionego glutationu. Niewielki negatywny wpływ na aktywność esterazy ma obecność związku tiolowego: β-merkaptoetanolu. Co ciekawe, inny związek tiolowy:

DTT był silnym aktywatorem badanego enzymu. Obecność EDTA zwiększa aktywność badanej esterazy. Z wcześniejszych badań wynika, że jony niklu są inhibitorem tego białka (Rozdział 5.1.7). Istnieje możliwość, że obserwowany pozytywny wpływ EDTA na aktywność badanego enzymu był wynikiem chelatowania przez EDTA jonów niklu, które mogły przedostać się do preparatu białka w czasie oczyszczania przy użyciu chromatografii metalopowinowactwa (Wicka i in. 2016). Dla porównania, obecność EDTA nie miała znaczącego wpływu na aktywność PsEst1 z *Pseudomonas* sp. B11-1 (Tabela 2).

5.1.9 Określenie parametrów kinetycznych EstS9Auto

Właściwości kinetyczne enzymu analizowano wobec maślanu *p*-nitrofenylu jako substratu (Materiały i metody 4.28) w trzech różnych temperaturach, tj. 35, 25, 15°C.

Najwyższe powinowactwo do substratu (maślan *p*-nitrofenylu) enzym EstS9Auto wykazuje w temperaturze 25°C (niska wartość K_m). W 25°C substrat jest szybko i efektywnie zamieniany w produkt. W tej temperaturze enzym EstS9Auto charakteryzuje się najwyższą sprawnością katalityczną (wysoka wartość k_{cat}/K_m) (Tabela 8). Co warto zaznaczyć, wynik ten może mieć swoje uzasadnienie. Optymalna temperatura wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. S9 będącego źródłem esterazy EstS9 wynosi 20°C, natomiast szczep ten słabo rośnie w temperaturze 30°C. Enzym jest prawdopodobnie przystosowany ewolucyjnie do wydajnej katalizy reakcji w temperaturze bliskiej optymalnej temperaturze wzrostu mikroorganizmu, który go produkuje.

Tabela 8. Parametry kinetyczne esterazy EstS9Auto

Temperatura [°C]	K_m [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}mM^{-1}$]
35	0,0368	1,45	39,50
25	0,0095	2,39	252,22
15	0,1617	3,31	20,48

5.2 Produkcja esterazy EstS9short w komórkach *Escherichia coli*

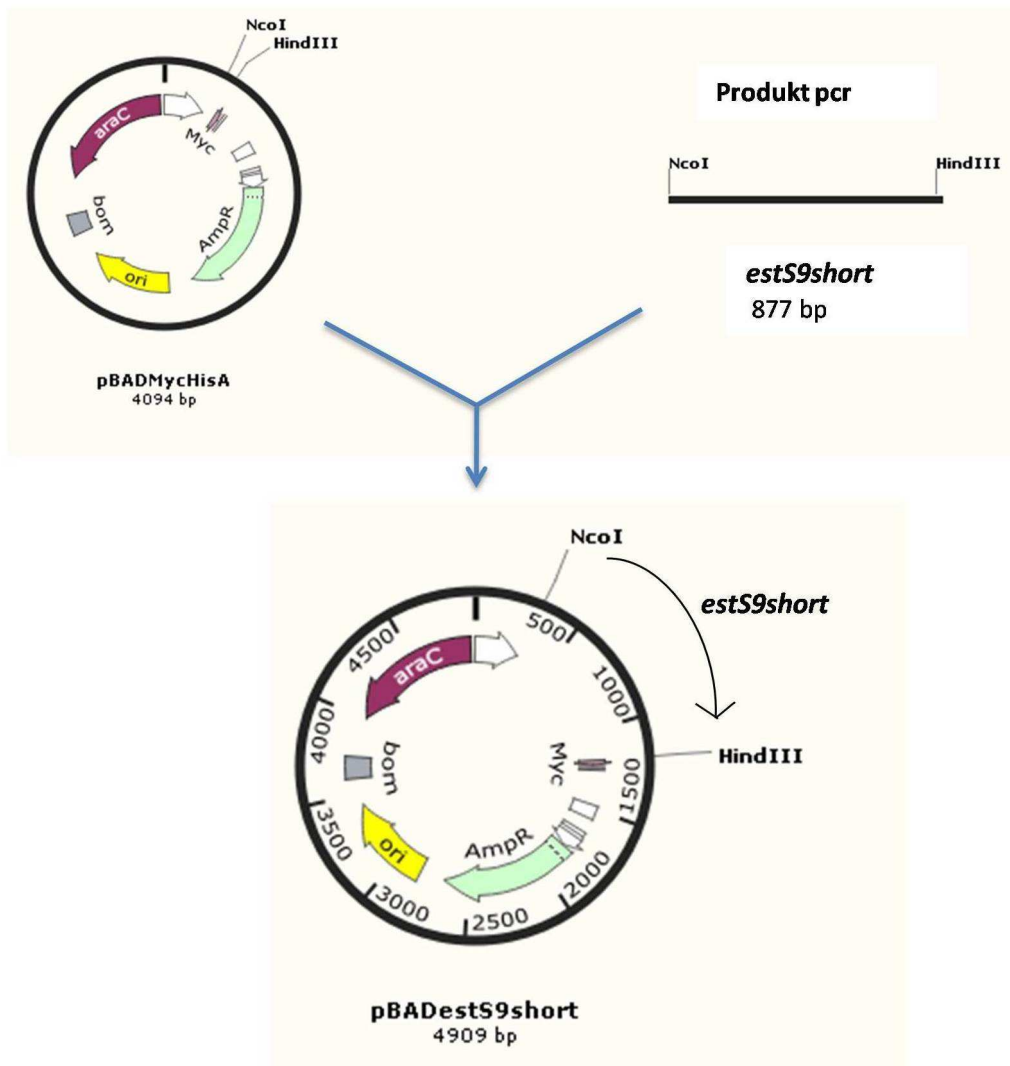
W celu sprawdzenia jaki wpływ na aktywność badanego enzymu będzie miało usunięcie domeny autotransportera, zaprojektowano doświadczenie i skonstruowano

rekombinantowy szczep *E. coli* TOP10/pBADestS9short, producenta esterazy EstS9short zbudowanej z N-końcowej domeny katalitycznej esterazy EstS9 z *Pseudomonas* sp. S9 oraz C-końcowej domeny oligohistydynowej (Rys. 5).

5.2.1 Konstrukcja plazmidu ekspresyjnego pBADestS9short

W celu skonstruowania plazmidu ekspresyjnego pBADestS9short, zawierającego gen *estS9short*, kodujący rekombinantową esterazę EstS9short, wykorzystano technikę PCR oraz enzymy restrykcyjne *NcoI* i *HindIII*, umożliwiające wklonowanie tego genu w odpowiedniej orientacji do wektora plazmidowego pBADMycHisA (Materiały i metody 4.3). Matrycą do reakcji amplifikacji było DNA genomowe *Pseudomonas* sp. S9 (Materiały i metody 4.1, 4.4, 4.6). Startery do reakcji PCR: FEstS9Nco i REstS9-shortHind-His zaprojektowano dodając, na ich 5'końcach, niekomplementarnych do matrycy, sekwencje rozpoznania dla restryktaz *NcoI* (FEstS9Nco) i *HindIII* (REstS9-shortHind-His). Umożliwiło to efektywne klonowanie genu *estS9short* do wybranego wektora plazmidowego z zachowaniem właściwej ramki odczytu. Produkt PCR (Materiały i metody 4.18) oczyszczono (Materiały i metody 4.7), a następnie potrawiono enzymami *NcoI* i *HindIII*. Równolegle przeprowadzono reakcję trawienia DNA wektora pBADMycHisA tymi samymi enzymami restrykcyjnymi (Materiały i metody 4.10). Produkty trawienia oczyszczono (Materiały i metody 4.7) i tak przygotowane fragmenty DNA wektora i insertu poddano reakcji ligacji (Materiały i metody 4.11). Mieszaninę ligacyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP 10 (Materiały i metody 4.13), po czym wysiewano na podłoże LA zawierające 100 µg/ml ampicyliny (Materiały i metody 4.12 i 4.13). Płytki Petriego z wysianymi transformantami inkubowano 24 h w 37°C. Uzyskane kolonie rekombinantowych bakterii przesiewano na podłoże LA i pożywkę LB z ampicyliną (Materiały i metody 4.4). Z komórek szczepu *E. coli* TOP10/pBADEstS9short pobranych z hodowli w pożywce LB izolowano DNA plazmidów rekombinantowych (Materiały i metody 4.6). Uzyskanie właściwego plazmidu rekombinantowego pBADestS9short potwierdzano poprzez analizę opóźnienia migracji elektroforetycznej wyizolowanego DNA plazmidów w żelu agarozowym (wybrano plazmidy wykazujące opóźnienie w migracji w żelu agarozowym względem DNA plazmidu pBADMycHisA), analizę restrykcyjną DNA wybranych plazmidów oraz sekwencjonowanie DNA wklonowanych insertów

(Materiały i metody 4.29). Schemat przedstawiający etapy konstrukcji tego plazmidu przedstawiono na rysunku 14.



Rys. 14. Schemat konstrukcji plazmidu ekspresyjnego pBADestS9short. Mapy plazmidów wykonano za pomocą SnapGene Viewer.

5.2.2 Biosynteza esteraży EstS9short w komórkach *Escherichia coli* TOP10

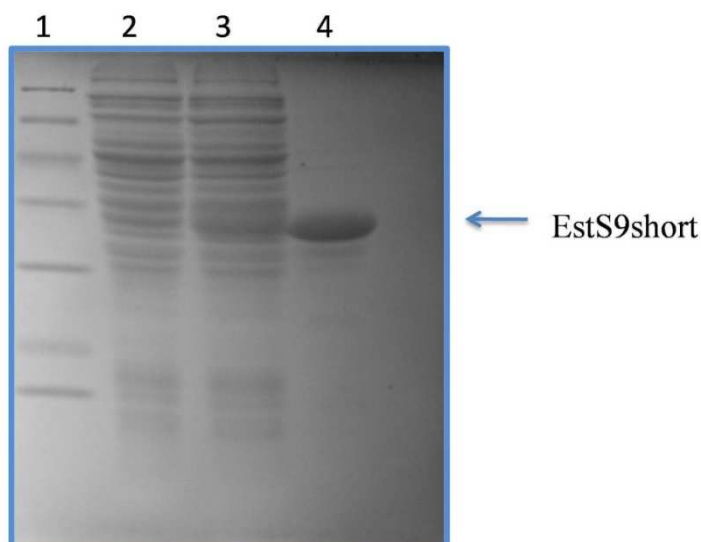
Szczep bakterii *E. coli* TOP 10 (Materiały i metody 4.1) transformowano DNA plazmidu pBADestS9short (Wyniki i wnioski 5.2.1). Hodowlę o objętości 1000 ml prowadzono według procedury opisanej w punkcie Materiały i metody 4.14. Po

zakończeniu biosyntezy hodowlę *E. coli* TOP 10/pBADestS9short wirowano (Materiały i metody 4.14), a uzyskany osad komórkowy wykorzystano do dalszych badań.

5.2.3 Oczyszczanie białka EstS9short metodą chromatografii metalopowinowactwa w warunkach denaturujących

Komórki osadu z hodowli *E. coli* TOP10/pBADestS9short (Wyniki i wnioski 5.2.2) poddano dezintegracji poprzez sonikację. Uzyskany lizat komórek w buforze K. wirowano (Materiały i metody 4.15), a następnie uzyskany po wirowaniu osad (nierozpuszczalne fragmenty komórek *E. coli*) i ekstrakt bezkomórkowy poddano analizie SDS-PAGE (Materiały i metody 4.26), w celu sprawdzenia czy enzym jest produkowany w postaci rozpuszczalnej (Rys. 15). Stwierdzono, że jednodomenowy wariant esterazy EstS9short, tak samo jak białko EstS9Auto, obecne jest w komórkach *E. coli* prawdopodobnie w postaci ciałek inkluzyjnych.

W wyniku zastosowania procedury oczyszczania esterazy EstS9short w warunkach denaturujących (Materiały i metody 4.16), a następnie dializy wobec 20 mM buforu Tris-HCl o pH 7,5 zawierającego 0,1% Triton X-100 (Materiały i metody 4.16), otrzymano 18,75 mg preparatu białka EstS9short z 1 litra hodowli (Materiały i metody 4.24) (Rys. 15, ścieżka 4).



Rys. 15. Wyniki analizy SDS-PAGE. 1 – Wzorzec masy cząsteczkowej białek (Unstained Protein Molecular Weight Marker 116-14,4 kDa, Thermo Fisher Scientific); 2 – ekstrakt bezkomórkowy *E. coli* TOP10/ pBADestS9short; 3 – ekstrakt bezkomórkowy *E. coli* TOP10/pBADestS9short po rozpuszczaniu ciał inkluzyjnych; 4 – oczyszczony preparat białka EstS9short po renaturacji na drodze dializy wobec 20 mM Tris-HCl pH 7,5 zawierającego 0,1% Triton X-100.

5.2.4 Oznaczanie aktywności oczyszczonego preparatu esterazy EstS9short

Aktywność oczyszczonego preparatu esterazy EstS9short oznaczana była względem maślanu *p*-nitrofenylu jako substratu (Materiały i metody 4.28). Oczyszczony preparat charakteryzował się bardzo niską specyficzną aktywnością esterolityczną, około 0,0025 U/mg oraz niestabilnością podczas przechowywania, co niestety w praktyce uniemożliwiło wykorzystanie go do przeprowadzenia charakterystyki biochemicznej enzymu.

Co więcej, pomimo, że uzyskane stężenie białka EstS9short (1,25 mg/ml) było dwukrotnie wyższe od stężenia białka EstS9Auto (0,58 mg/ml), to białko EstS9short wykazywało tylko 3% aktywności specyficznej i 6% całkowitej aktywności enzymatycznej białka EstS9Auto (Tabela 9).

Tabela 9. Porównanie otrzymanych preparatów białkowych (EstS9Auto, EstS9short).

Białko	Ilość całkowita [mg]	Całkowita aktywność enzymatyczna [U]	Aktywność specyficzna [U/mg białka]	Aktywność [U/ml]
EstS9Auto	8,7	0,77	0,088	51,06
EstS9short	18,75	0,046	0,0025	3,06

[U] = 1 μ mol/min (Materiały i metody 4.28)

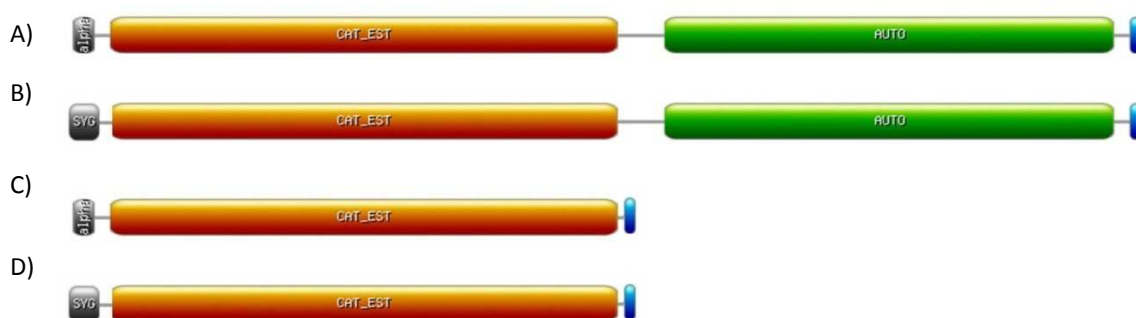
5.3 Produkcja esterazy z *Pseudomonas* sp. S9 w systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris*

Oba warianty esterazy z *Pseudomonas* sp. S9 tj. EstS9Auto i EstS9short produkowane były w systemie *E. coli* w postaci nieaktywnej tj. w ciałkach inkluzyjnych. W związku z powyższym, otrzymanie preparatów obu białek umożliwiających oznaczenie ich właściwości enzymatycznych wymagało: a) przeprowadzenia oczyszczania tychże białek w warunkach denaturujących z zastosowaniem chromatografii metalopowinowactwa, b) przeprowadzenia procesu renaturacji obu białek. Podczas renaturacji nie ma gwarancji prawidłowego przebiegu procesu fałdowania badanego białka. Stąd, mogło to być przyczyną niskiej aktywności enzymu EstS9short, pomimo jego większej produkcji w komórkach *E. coli* niż białka EstS9Auto. Dlatego też, dążąc do osiągnięcia głównego celu, moją pracę rozszerzyłam o przetestowanie innego układu ekspresyjnego, tym razem opartego o zastosowanie

komórek mezofilnych drożdży *Pichia pastoris* jako gospodarza ekspresji heterologicznych genów. Wybór takiego gospodarza podyktowany był tym, że umożliwia on produkcję rekombinantowych białek połączoną z ich sekrecją do pożywki, w której prowadzi się hodowlę drożdży, co w teorii powinno ułatwiać otrzymanie dużych ilości obu rekombinantowych form esterazy *Pseudomonas* sp. S9 i rozwiązać problemy wynikające z produkcji rekombinantowych białek w postaci ciałek inkluzyjnych.

W związku z powyższym zaprojektowano doświadczenia umożliwiające uzyskanie w komórkach *P. pastoris* rekombinantowych białek zawierających na N-końcu sekwencję sygnałną alfa-faktora z *Saccharomyces cerevisiae* umożliwiającą transport rekombinowanych białek α EstS9Auto (domena katalityczna, domena autotransportera i domena oligohistydynowa) i α EstS9short (domena katalityczna i domena oligohistydynowa) na zewnątrz komórki (Rys. 16).

Ponadto, postanowiono sprawdzić czy własna sekwencja sygnałna obecna w esterazie EstS9 może być wykorzystana do sekrecji rekombinantowych białek SygEstS9Auto (domena katalityczna, domena autotransportera i domena oligohistydynowa) i SygEstS9 (domena katalityczna i domena oligohistydynowa) przez komórki drożdży *P. pastoris*. Wykorzystanie bakteryjnej natywnej sekwencji sygnałnej do udanej sekrecji proteazy z *Thermus aquaticus* YT-1 produkowanej w *P. pastoris* zostało opisane przez Olędzką i współpracowników (Olędzka i in. 2003). Identyfikacja nowej „działającej w komórkach *P. pastoris*” sekwencji sygnałnej nadałoby dodatkową wartość nowości naukowej realizowanej przeze mnie pracy badawczej.



Rys. 16. Schemat topologiczny białek: A) α EstS9Auto, B) SygEstS9Auto, C) α EstS9short, D) SygEstS9short. Kolor szary - SYG (własny peptyd sygnałny z EstS9), alpha (peptyd sygnałny α -faktora z *S. cerevisiae*), kolor pomarańczowy - domena katalityczna, kolor zielony - domena autotransportera, kolor niebieski - domena oligohistydynowa.

5.3.1 Produkcja esteraży z *Pseudomonas* sp. S9 w konstytutywnym systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris*

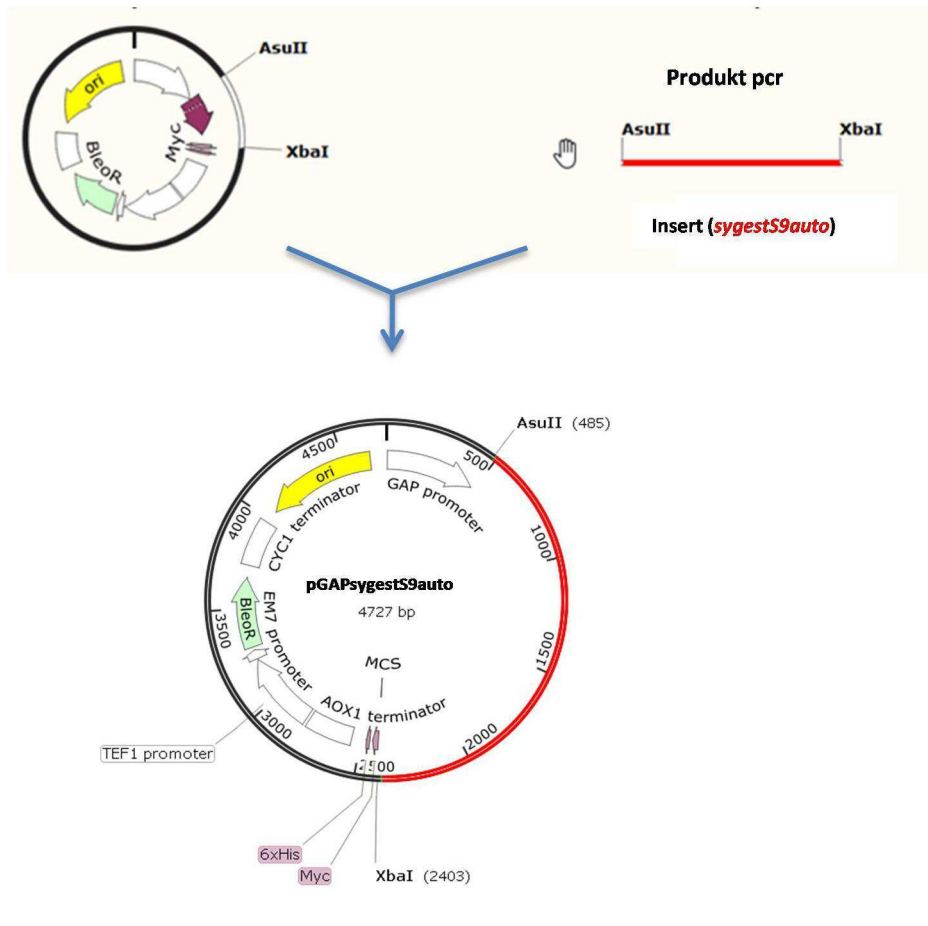
Zaprojektowano układy ekspresyjne do produkcji czterech rekombinantowych wariantów sekwencyjnych adaptowanej do zimna esteraży z *Pseudomonas* sp. S9 w komórkach *Pichia pastoris* X-33 (Materiały i metody 4.2). Jako wektor ekspresyjny wybrano plazmid pGAPZαB, w którym obce geny klonowane są pod kontrolę promotora transkrypcji genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerolowego (P_{GAP}) zapewniającego konstytutywną ekspresję klonowanego genu w komórkach *P. pastoris* rosnących na podłożu YPD z glukozą stanowiącą źródło węgla (Materiały i metody 4.3).

W celu skonstruowania rekombinantowych plazmidów ekspresyjnych pGAPsygestS9auto, pGAPaestS9auto, pGAPsygestS9short oraz pGAPaestS9short (Rys. 17-20) wykorzystano technikę PCR oraz odpowiednio dobrane enzymy restrykcyjne. Eksperymenty klonowania insertów DNA do wektora pGAPZαB zaprojektowano tak aby wyprodukowane białka rekombinantowe posiadały dodatkowo domenę oligohistydynową na C-końcu.

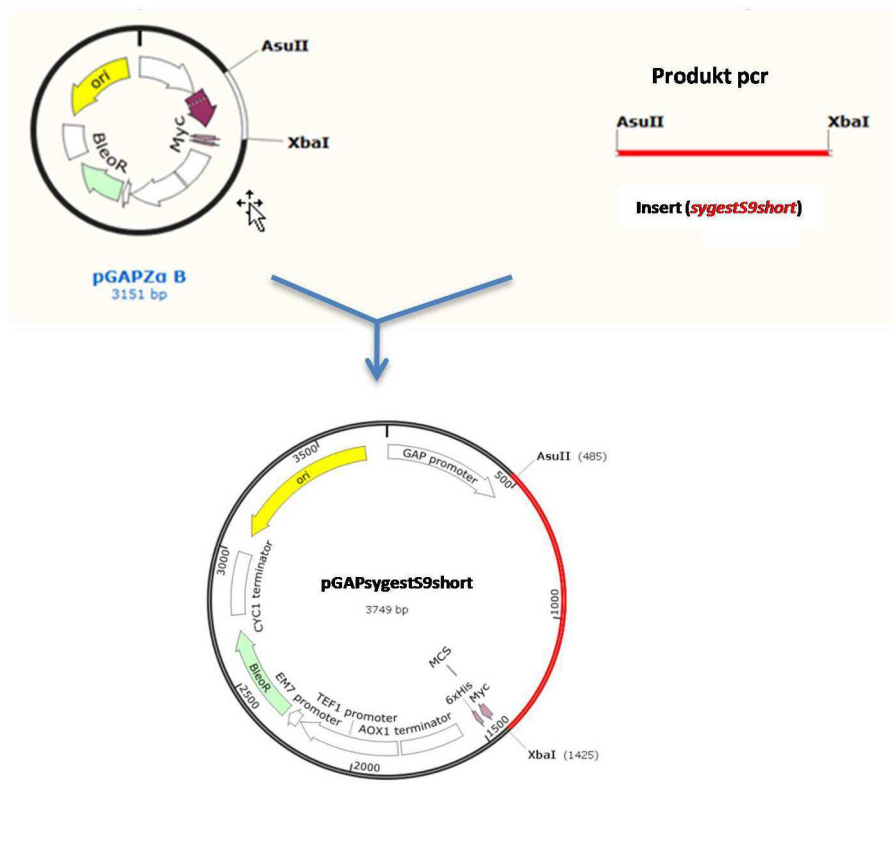
5.3.1.1 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych *pGAPsygestautoS9* i *pGAPsygestS9short*

W celu skonstruowania plazmidów ekspresyjnych (Rys. 17 i 18), zawierających gen *sygestS9auto*, kodujący esterazę z *Pseudomonas* sp. S9 z jej własną sekwencją sygnałną i C-końcową domeną oligohistydynową (Rys. 16) oraz gen *sygestS9short* kodujący esterazę EstS9 z własną sekwencją sygnałną, domeną katalityczną i C-końcową domeną oligohistydynową, lecz pozbawioną sekwencji autotransportera (Rys. 16), wykorzystano technikę PCR oraz enzymy restrykcyjne *AsuII* i *XbaI*, umożliwiające wklonowanie genów w odpowiedniej orientacji do wektora pGAPZαB (Materiały i metody 4.3). Matrycą do reakcji amplifikacji było DNA genomowe *Pseudomonas* sp. S9. Startery do reakcji PCR: ForwardSygEstAsuII, ReverseEstAutoXbaI, ReverseEstXba zaprojektowano dodając na ich 5'końcach, niekomplementarnych do matrycy, sekwencje rozpoznania dla restryktaz *AsuII* (ForwardSygEstAsuII,) i *XbaI* (ReverseEstAutoXbaI, ReverseEstXba) (Materiały i metody 4.18). Umożliwiło to efektywne klonowanie genów *sygestS9auto* oraz *sygestS9short* do wybranego wektora plazmidowego, z zachowaniem ramki odczytu.

Produkty PCR o wielkości 1934 pz (*sygestS9auto*) i 956 pz (*sygestS9short*) oczyszczono (Materiały i metody 4.7), a następnie potrawiono enzymami *AsuII* i *XbaI*. Równolegle przeprowadzono reakcję trawienia DNA wektora pGAPZ α B tymi samymi enzymami restrykcyjnymi (Materiały i metody 4.10). Produkty trawienia oczyszczono (Materiały i metody 4.7) i tak przygotowane fragmenty DNA wektora i insertu poddano reakcji ligacji (Materiały i metody 4.11). Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP 10 (Materiały i metody 4.12-4.13) i wysiewano na podłoże LA niskosolne zawierające 25 μ g/ml zeocyny (Materiały i metody 4.4). Płytki Petriego z wysianymi transformantami inkubowano 24 h w 37°C. Uzyskane kolonie rekombinantowych bakterii przesiewano na podłoże LA niskosolne i pożywkę LB niskosolną z dodatkiem zeocyny (Materiały i metody 4.4). Z komórek *E. coli* TOP10/pGAPsygestS9auto i *E. coli* TOP10/pGAPsygestS9short hodowanych w pożywce LB niskosolnej, izolowano DNA plazmidów rekombinantowych (Materiały i metody 4.6). Uzyskanie właściwych plazmidów rekombinantowych potwierdzano poprzez analizę opóźnienia migracji elektroforetycznej DNA wyizolowanych plazmidów w żelu agarozowym (wybrano plazmidy opóźnione w migracji w żelu agarozowym względem DNA plazmidu pGAPZ α B), analizę restrykcyjną wybranych plazmidów oraz sekwencjonowanie DNA wklonowanych insertów (Materiały i metody 4.29). Schematy konstrukcji plazmidów ekspresyjnych pGAPsygestS9auto i pGAPsygestS9short przedstawiono na rysunkach 17 i 18.



Rysunek 17. Schemat konstrukcji plazmidu ekspresyjnego pGAPsygestS9auto. Mapy plazmidów wykonano za pomocą programu SnapGene Viewer.



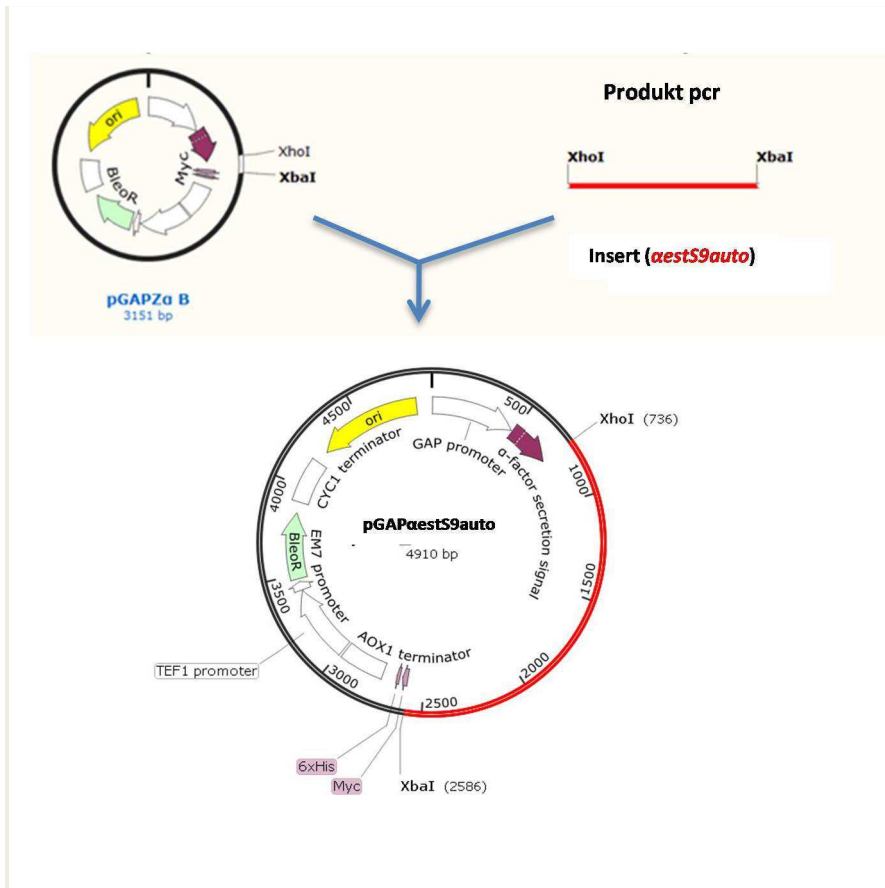
Rysunek 18. Schemat konstrukcji plazmidu ekspresyjnego pGAPsygestS9short. Mapyplazmidów wykonano za pomocą programu SnapeGene Viewer.

5.3.1.2 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych pGAPæestS9auto i pGAPæestS9short

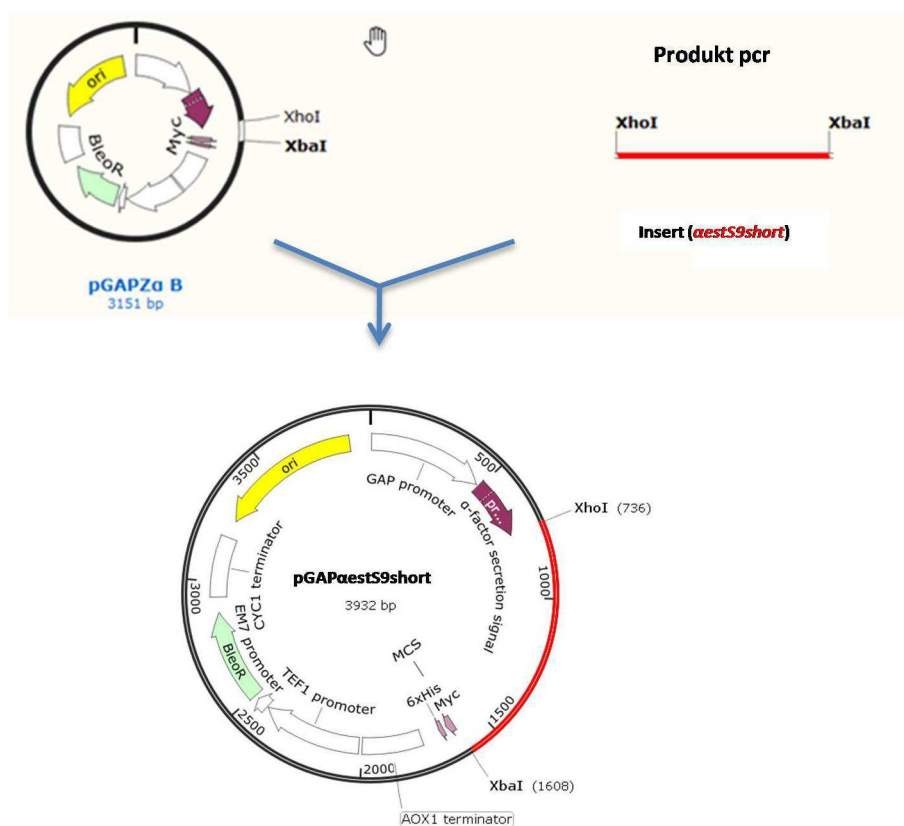
W celu skonstruowania plazmidów ekspresyjnych pGAPæestS9auto oraz pGAPæestS9short (Rys. 19 i 20), zawierających gen *æestS9auto* kodujący rekombinowaną dwudomenową esterazę z *Pseudomonas* sp. S9 dodatkowo z sekwencją sygnałną α -faktora z *Sacharomyces cerevisiae* na N-końcu białka i C-końcową domeną oligohistydynową (Rys. 16) oraz gen *æestS9short* kodujący wyłącznie domenę katalityczną esterazy EstS9 z sekwencją sygnałną α -faktora z *S. cerevisiae* na N-końcu białka i C-końcową domeną oligohistydynową (Rys. 16), wykorzystano technikę PCR oraz enzymy restrykcyjne *Xho*I i *Xba*I, umożliwiające wklonowanie obu genów w odpowiedniej orientacji do wektora pGAPZ α B. Matrycą do reakcji amplifikacji było DNA genomowe *Pseudomonas* sp. S9. Startery do reakcji PCR: Forward α EstAutoXhoI,

ReverseEstAutoXbaI i ReverseEstXba zaprojektowano dodając na ich 5'końcach, niekomplementarnych do matrycy, sekwencje rozpoznania dla restryktazą *XhoI* (ForwardEstAutoXhoI) i *XbaI* (ReverseEstAutoXbaI, ReverseEstXba) (Materiały i metody 4.18). Umożliwiło to efektywne klonowanie genów *aestS9auto* oraz *aestS9short* do wybranego wektora plazmidowego, z zachowaniem ramki odczytu.

Produkty PCR o wielkości 1864 pz (*aestS9auto*) i 885 pz (*aestS9short*) oczyszczono (Materiały i metody 4.7), a następnie potrawiono enzymami *XhoI* i *XbaI* (Materiały i metody 4.10). Równolegle przeprowadzono reakcję trawienia DNA wektora pGAPZαB tymi samymi enzymami restrykcyjnymi (Materiały i metody 4.10). Produkty trawienia oczyszczono (Materiały i metody 4.7) i tak przygotowane fragmenty DNA wektora i insertu poddano reakcji ligacji (Materiały i metody 4.11). Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP 10 (Materiały i metody 4.12-4.13) i wysiewano na podłoże LA niskosolne zawierające 25 µg/ml zeocyny (Materiały i metody 4.4). Płytki Petriego z wysianymi transformantami inkubowano 24 h w 37°C. Uzyskane kolonie rekombinantowych bakterii przesiewano na podłoże LA niskosolne i pożywkę LB niskosolną z dodatkiem zeocyny (Materiały i metody 4.4). Z osadu komórek *E. coli* TOP10/pGAPaestautoS9 i *E. coli* TOP10/pGAPaestS9short hodowanych na pożywce LB niskosolnej izolowano DNA plazmidów rekombinantowych (Materiały i metody 4.6). Uzyskanie właściwych plazmidów rekombinantowych potwierdzano poprzez analizę opóźnienia migracji elektroforetycznej DNA wyizolowanych plazmidów w żelu agarozowym (wybrano plazmidy opóźnione w migracji w żelu agarozowym względem DNA plazmidu pGAPZαB), analizę restrykcyjną wybranych plazmidów oraz sekwencjonowanie DNA wklonowanych insertów (Materiały i metody 4.29). Schematy konstrukcji plazmidów ekspresyjnych pGAPaestautoS9 i pGAPaestS9short przedstawiono na rysunkach 19 i 20.



Rys. 19. Schemat konstrukcji plazmidu ekspresyjnego pGAPαestS9auto. Mapy plazmidów wykonano za pomocą programu SnapGene Viewer.

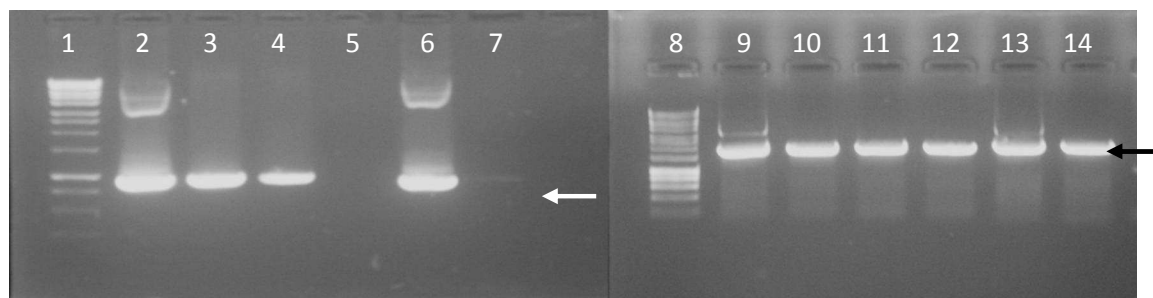


Rys. 20. Schemat konstrukcji wektora ekspresyjnego pGAP α estS9short. Mapy plazmidów wykonano za pomocą programu SnapGene Viewer.

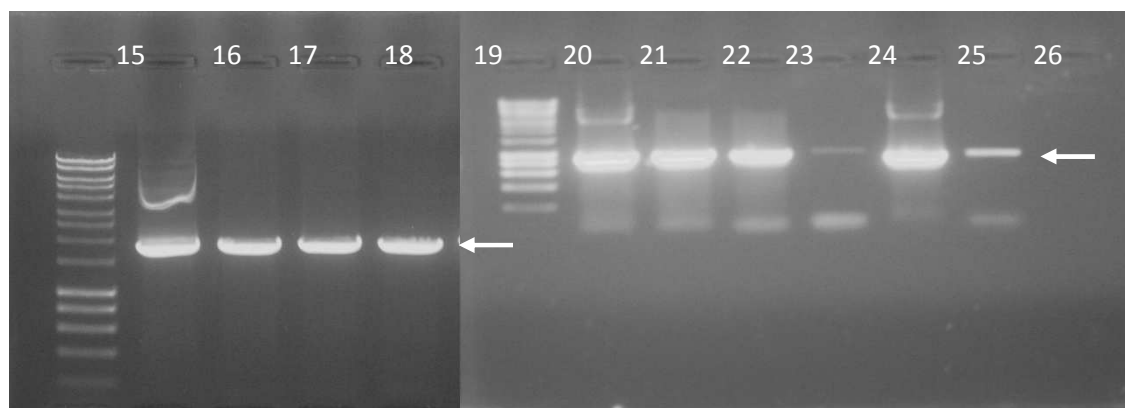
5.3.1.3 Biosynteza białek α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto w komórkach *Pichia pastoris*

Rekombinantowe szczepy *Pichia pastoris* uzyskano transformując komórki kompetentne *Pichia pastoris* X-33 liniową formą DNA plazmidów pGAPsygestS9auto/*AvrII*, pGAPsygestS9short/*AvrII*, pGAP α estS9auto/*AvrII* i pGAP α estS9short/*AvrII*. Transformację komórek *P. pastoris* X-33 przeprowadzono wykorzystując metodę elektroporacji (Materiały i metody 4.17). Uzyskane kolonie rekombinantowych drożdży przesiewano na podłoże YPD stałe oraz podłoże YPD płynne z dodatkiem 100 $\mu\text{g/ml}$ zeocyny (Materiały i metody 4.4). Z hodowli płynnej uzyskanych rekombinantów wyizolowano DNA genomowe (Materiały i metody 4.6). W celu potwierdzenia integracji DNA plazmidów ekspresyjnych z DNA genomowym komórek *Pichia pastoris* X-33, przeprowadzono reakcję amplifikacji genu esterazy

(Materiały i metody 4.18) na matrycy DNA genomowego otrzymanych rekombinantów. We wszystkich przypadkach potwierdzono integrację DNA rekombinantowych plazmidów pGAPsygestS9auto, pGAPsygestS9short, pGAPaestS9auto i pGAPaestS9short z DNA genomowym *Pichia pastoris* X-33 (Rys. 21). Na Rysunku 21 przedstawiono wyniki amplifikacji genów *sygestS9auto*, *sygestS9short*, *aestS9short* oraz *aestS9auto* na matrycach genomowego DNA wyizolowanych z wybranych szczepów rekombinantowych *Pichia pastoris* X-33.



1. Marker wielkości DNA Hypper leader 1kb (Bioline), 2. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pGAPsygestS9short nr 1, 3. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris* X-33/pGAPsygestS9short nr 2; 4. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pGAPsygestS9short nr 3; 5. Kontrola ujemna (reakcja amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*) 6. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pGAPaestS9short nr 1; 7. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris* X-33/pGAPaestS9 short nr 2.; 8. Marker wielkości DNA Hypper leader 1kb (Bioline); 9. Produkt amplifikacji genu *aestautoS9* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pGAPaestautoS9 nr 1; 10. Produkt amplifikacji genu *aestautoS9* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris* pGAPaestautoS9 nr 2; 11. Produkt amplifikacji genu *aestautoS9* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris* pGAPaestautoS9 nr 3; 12. Produkt amplifikacji genu *aestautoS9* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris* pGAPaestautoS9 nr 4; 13. Produkt amplifikacji genu *sygestautoS9* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pGAPsygestautoS9 nr 1, 14. Produkt amplifikacji genu *sygestautoS9* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pGAPsygestautoS9 nr 2.



15. Marker wielkości DNA Hypper leader 1kb (Bioline), 17. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA plazmidowego pGAPsygestS9auto nr 3, 18. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris* X-33/pGAPsygestS9auto nr 4; 19. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA plazmidowego pGAPsygestS9auto nr 5; 20. Marker wielkości DNA Hypper leader 1kb (Bioline), 21. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pGAPaestS9short nr 3; 21. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pGAPsygestS9short nr 2; 22. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pGAPsygestS9short nr 5; 23. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris* pGAPsygestS9short nr 6; 24. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris* pGAPsygestS9short nr 7; 25. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pGAPaestS9short; 26. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pGAPaestautoS9 nr 2.

Rys. 21. Wynik rozdzielania elektroforetycznego w żelu agarozowym produktów amplifikacji genów: *sygestS9short*, *sygestS9auto*, *aestS9short*, *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego rekombinantowych szczepów *P. pastoris* X-33/pGAPsygestS9auto, *P. pastoris* X-33/pGAPsygestS9short, *P. pastoris* X-33/pGAPaestS9auto i *P. pastoris* X-33/pGAPaestS9short. Strzałka wskazuje właściwy produkt PCR.

Aktywność enzymatyczną rekombinantowych szczepów *P. pastoris* badano na płytkach z podłożem dwuwarstwowym MWG zawierającym tributyrinę (Materiały i metody 4.4; 4.19). Uzyskane szczepy rekombinantowe nie wykazywały zewnątrzkomórkowej aktywności esterolitycznej.

Szczepy rekombinantowe hodowano w pożywce YPD (Materiały i metody 4.20). Następnie, badano płyny pochodowlane lizaty komórkowe i ekstrakty bezkomórkowe uzyskane po dezintegracji komórek rekombinantowych drożdży za pomocą kulek szklanych (Materiały i metody 4.22) wobec maślanu *p*-nitrofenylu jako substratu (Materiały i metody 4.27). Zarówno płyny pochodowlane jak i lizaty oraz ekstrakty bezkomórkowe nie wykazywały aktywności enzymatycznej esterazy. Równoległe metodą dotblot (Materiały i metody 4.27) sprawdzano, czy białka rekombinantowe α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto są obecne w badanych frakcjach. Przeprowadzona analiza dotblot nie wykazała obecności rekombinantowych wariantów sekwencyjnych esterazy *Pseudomonas* sp. S9 w płynach pochodowlanych, lizatach i ekstraktach bezkomórkowych rekombinantowych komórek *P. pastoris*. Na podstawie przedstawionych wyników stwierdzono, że system ekspresyjny oparty o konstytutywną ekspresję heterologicznych genów wykorzystujący promotor genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerolowego (P_{GAP}) w komórkach *Pichia pastoris* X-33 nie pozwolił na otrzymanie rekombinantowych białek α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto. Wynik ten był zaskakujący, w świetle informacji, że enzymy lipolityczne z powodzeniem były produkowane w systemie konstytutywnym *P. pastoris* (Jallouli i in. 2017; Wongwatanapaiboon i in. 2016; Wang i in. 2012). Niepowodzenie tego eksperymentu zmusiło mnie do zastanowienia nad możliwą przyczyną braku produkcji jakiegokolwiek ze wspomnianych białek. Wynik sugerował, że pomimo różnic w sekwencji aminokwasowej rekombinantowych białek, przyczyna musi być wspólna i może wynikać np. z ich możliwej funkcji biologicznej. Z informacji zebranych w czasie przeglądu literaturowego wynika, że esterazy i lipazy uznawane są za czynniki wirulencji wielu bakterii, m.in. z rodzaju *Pseudomonas* (Hausmann i in., 2010). Przykładem może być esteraza EstA z *P. aeruginosa* (Wilhelm i in., 2011). Opisane we wstępie przykłady (Rozdział 3.10) dają podstawę do wysnucia hipotezy, że białko EstS9 z *Pseudomonas* sp. S9 może być także czynnikiem wirulentnym, który dla *Pichia pastoris* jest „toksycznym” białkiem. W takim przypadku wyjściem umożliwiającym produkcję białek „toksycznych” dla komórek gospodarza jest wykorzystanie systemu ekspresji, gdzie produkcja obcego białka następuje dopiero

po uzyskaniu dużej biomasy komórek, na skutek indukcji ekspresji kodującego je genu pod wpływem czynnika dodanego do hodowli. Stąd, postanowiłam przeprowadzić próbę biosyntezy wymienionych białek w indukowanym metanolem systemie ekspresji *P. pastoris* bazującym na wykorzystaniu promotora transkrypcji genu kodującego oksydazę alkoholową (P_{AOXI}). System ten z powodzeniem posłużył do produkcji enzymów lipolitycznych w *P. pastoris* (Eom i in. 2013; Ferrer i in. 2009; Huang i in. 2013; Yu i in. 2007; Jiang i in. 2007; Minning i in. 1998; Yu i in. 2009; Wang i in. 2008; Choi i in. 2004; Sriyapai i in. 2015).

5.3.2 Produkcja esterazy z *Pseudomonas* sp. S9 w indukowanym systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris*

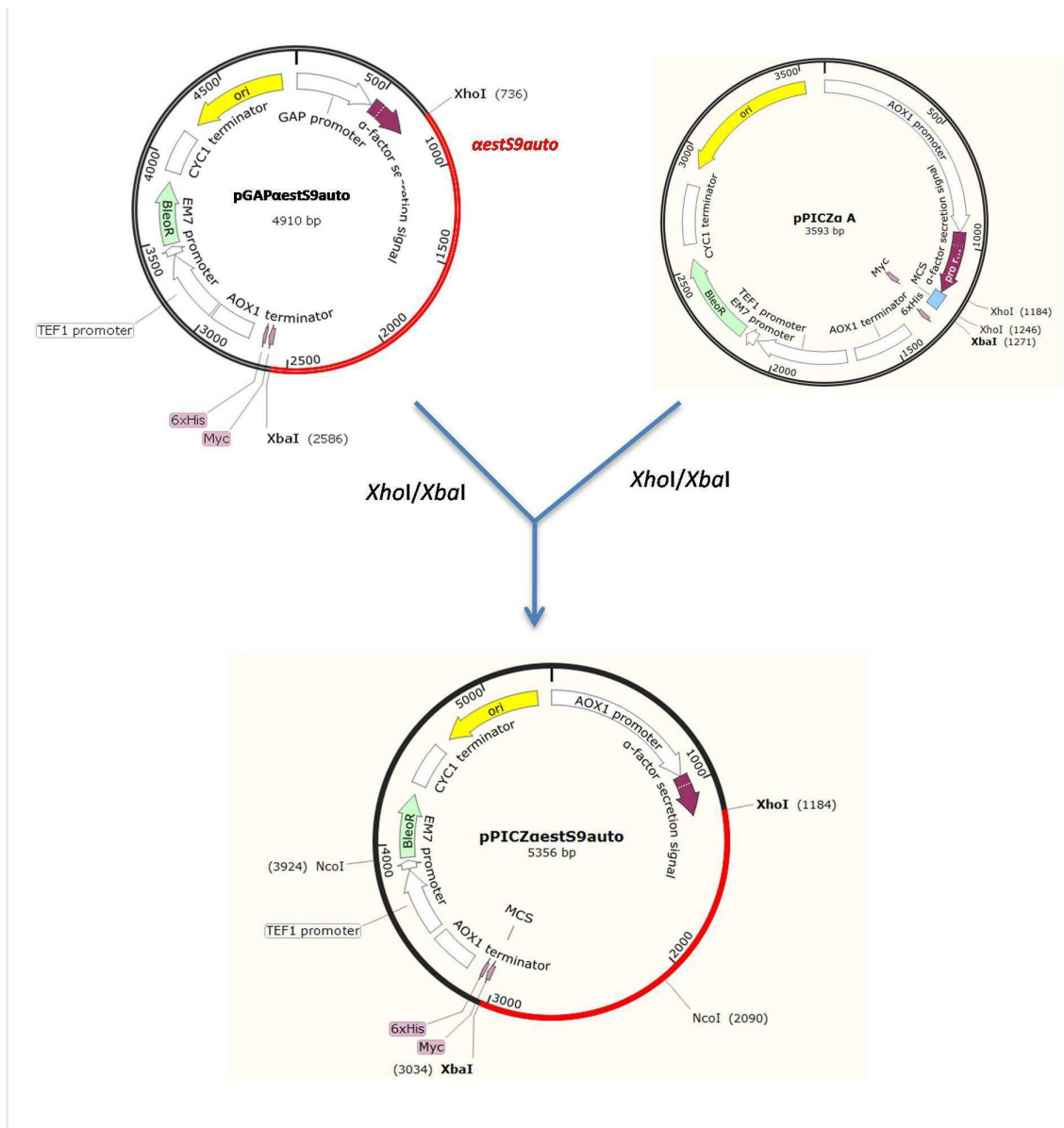
Zaprojektowano układy ekspresyjne do produkcji czterech wariantów sekwencyjnych adaptowanej do zimna esterazy z *Pseudomonas* sp. S9 w komórkach *Pichia pastoris* X-33 (Materiały i metody 4.2). Jako wektor ekspresyjny wybrano plazmid pPICZ α A, w którym obce geny klonowane są pod kontrolę promotora genu kodującego oksydazę alkoholową I (P_{AOXI}) zapewniającego indukowaną metanolem ekspresję klonowanego genu w komórkach *P. pastoris* (Materiały i metody 4.3). W celu skonstruowania rekombinantowych plazmidów ekspresyjnych pPICZsygestS9auto, pPICZaestS9auto, pPICZsygestS9short oraz pPICZaestS9short (Rys. 22-25) wykorzystano technikę PCR oraz odpowiednio dobrane enzymy restrykcyjne. Eksperymenty klonowania insertów DNA do wektora pPICZ α A zaprojektowano tak, aby wyprodukowane białka rekombinantowe posiadały dodatkowo domenę oligohistydynową na C-końcu (Rys. 16).

5.3.2.1 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych pPICZaestS9auto i pPICZaestS9short

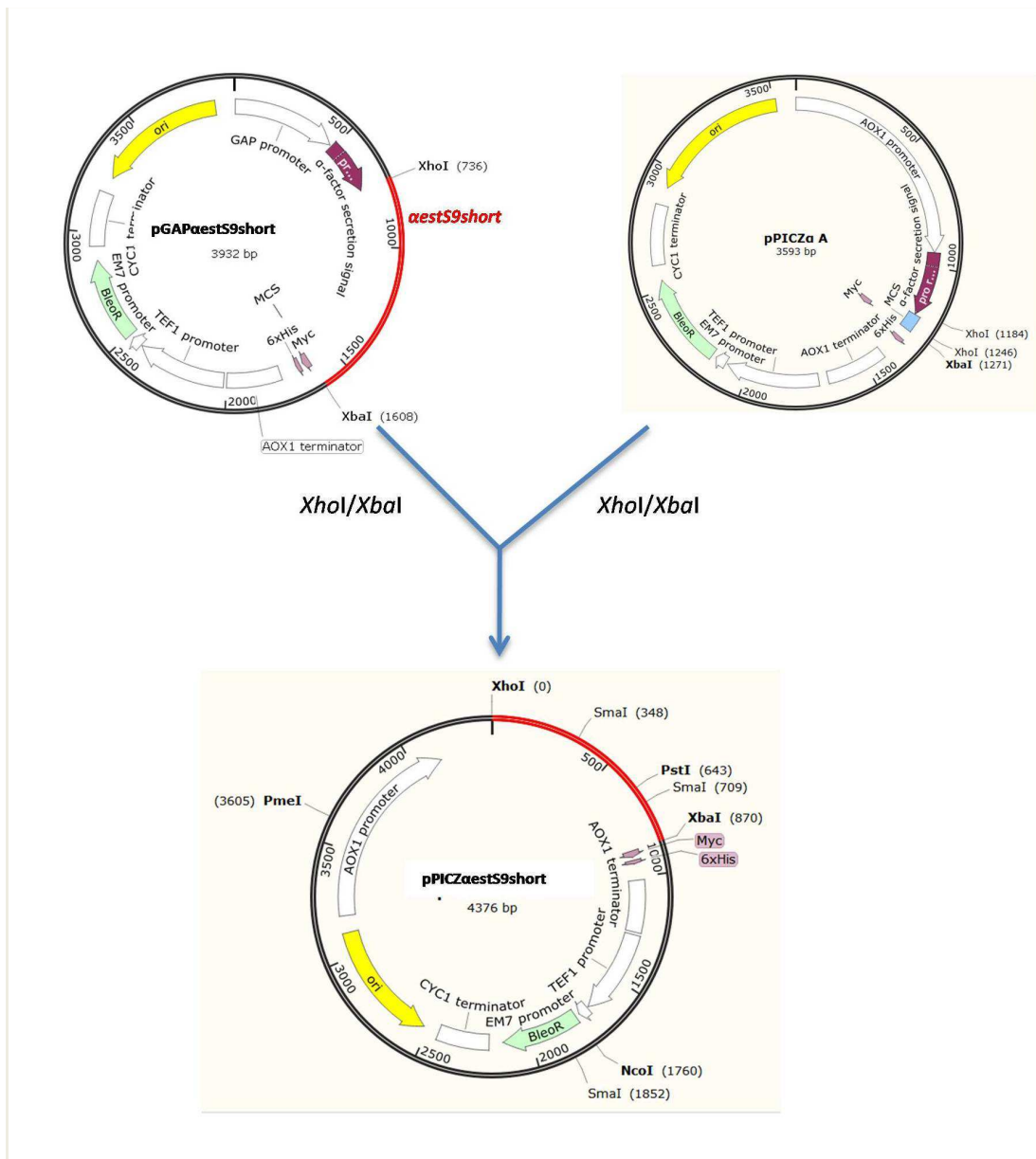
W celu skonstruowania plazmidów ekspresyjnych pPICZaestS9auto i pPICZaestS9short (Rys. 22 i 23), zawierających gen *aestS9auto* kodujący rekombinowaną dwudomenową esterazę z *Pseudomonas* sp. S9 z sekwencją sygnałną α -faktora *S. cerevisiae* na N-końcu białka i C-końcową domeną oligohistydynową (Rys. 16) oraz *aestS9short* kodujący wyłącznie domenę katalityczną esterazy EstS9 z sekwencją sygnałną α -faktora *S. cerevisiae* na N-końcu białko i C-końcową domenę

oligohistydynową (Rys. 16), wykorzystano enzymy restrykcyjne *XhoI* i *XbaI*, umożliwiające przeklonowanie genów *aestS9auto* i *aestS9short* z plazmidów ekspresyjnych pGAPaestS9auto i pGAPaestS9short do wektora pPICZαA.

DNA plazmidów ekspresyjnych pGAPZaestS9auto i pGAPZaestS9short (Wyniki i dyskusja 5.3.1.2) potrawiono enzymami *XhoI* i *XbaI* (Materiały i metody 4.10). Równolegle przeprowadzono reakcję trawienia DNA wektora pPICZαA tymi samymi enzymami restrykcyjnymi (Materiały i metody 4.10). Produkty trawienia DNA wszystkich plazmidów rozdzielono elektroforetycznie w żelu agarozowym (Materiały i metody 4.8), po czym izolowano z żelu właściwej wielkości fragmenty DNA i oczyszczono (Materiały i metody 4.7). Tak przygotowane fragmenty DNA insertu i wektora poddano reakcji ligacji (Materiały i metody 4.11). Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP 10 (Materiały i metody 4.12-4.13) i wysiewano je na podłoże LA niskosolne zawierające 25 µg/ml zeocyny (Materiały i metody 4.4). Płytki Petriego z wysianymi transformantami inkubowano 24 h w 37°C. Uzyskane kolonie rekombinantowych bakterii przesiewano na podłoże LA niskosolne i pożywkę LB niskosolną z dodatkiem zeocyny (Materiały i metody 4.4). Z komórek *E. coli*/pPICZaestS9auto i *E. coli*/pPICZaestS9short hodowanych w pożywce LB niskosolnej izolowano DNA plazmidów rekombinantowych (Materiały i metody 4.6). Uzyskanie właściwych plazmidów rekombinantowych potwierdzano poprzez analizę opóźnienia migracji elektroforetycznej DNA wyizolowanych plazmidów w żelu agarozowym (wybrano plazmidy opóźnione w migracji w żelu agarozowym względem DNA plazmidu pPICZαA), analizę restrykcyjną tak wybranych plazmidów rekombinantowych oraz sekwencjonowanie DNA wklonowanych insertów (Materiały i metody 4.28). Schematy konstrukcji plazmidów ekspresyjnych pPICZaestS9auto i pPICZaestS9short przedstawiono na rysunkach 22 i 23.



Rys. 22. Schemat konstrukcji plazmidu ekspresyjnego pPICZ α estS9auto. Mapy plazmidów wykonano za pomocą programu SnapGene Viewer.



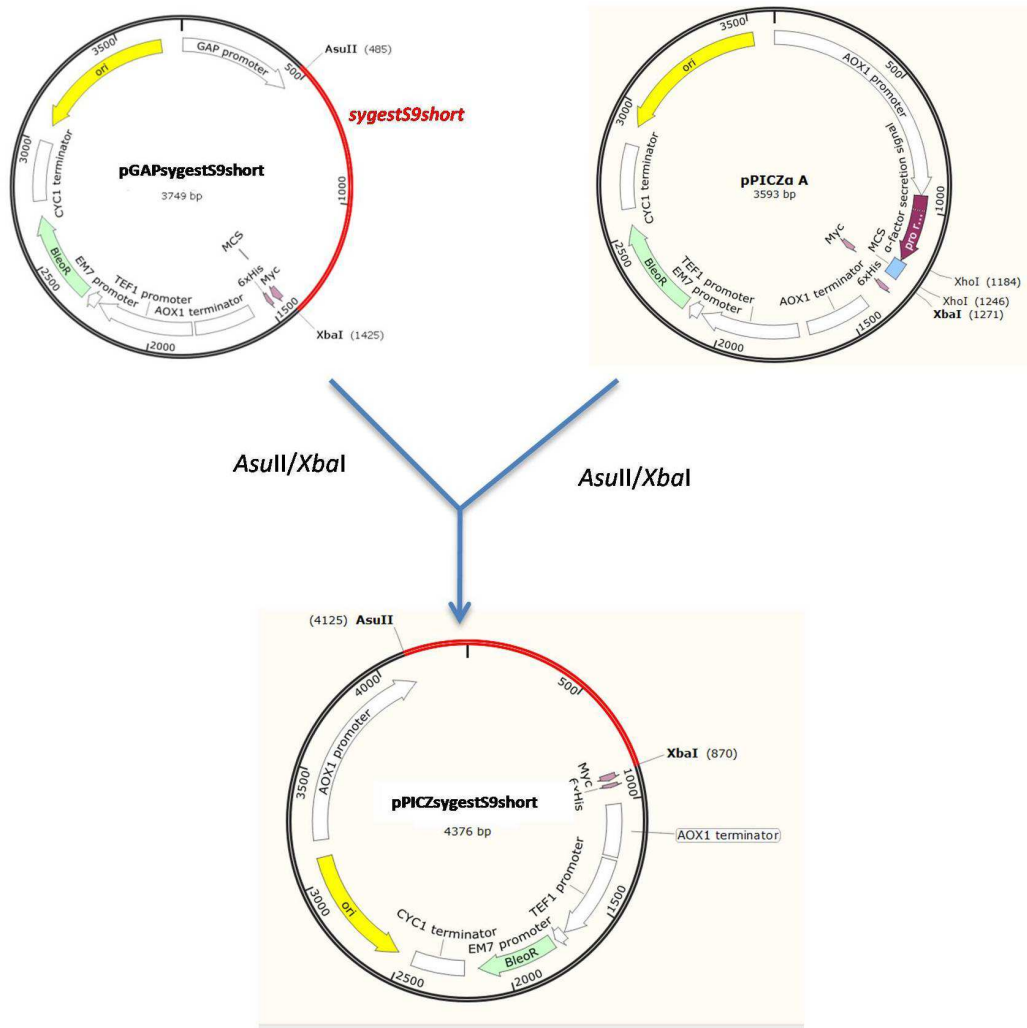
Rys. 23. Schemat konstrukcji plazmidu ekspresyjnego pPICZaestS9short. Mapy plazmidów wykonano za pomocą programu SnapGene Viewer.

5.3.2.2 Konstrukcja plazmidów ekspresyjnych pPICZsygestS9auto i pPICZsygestS9short

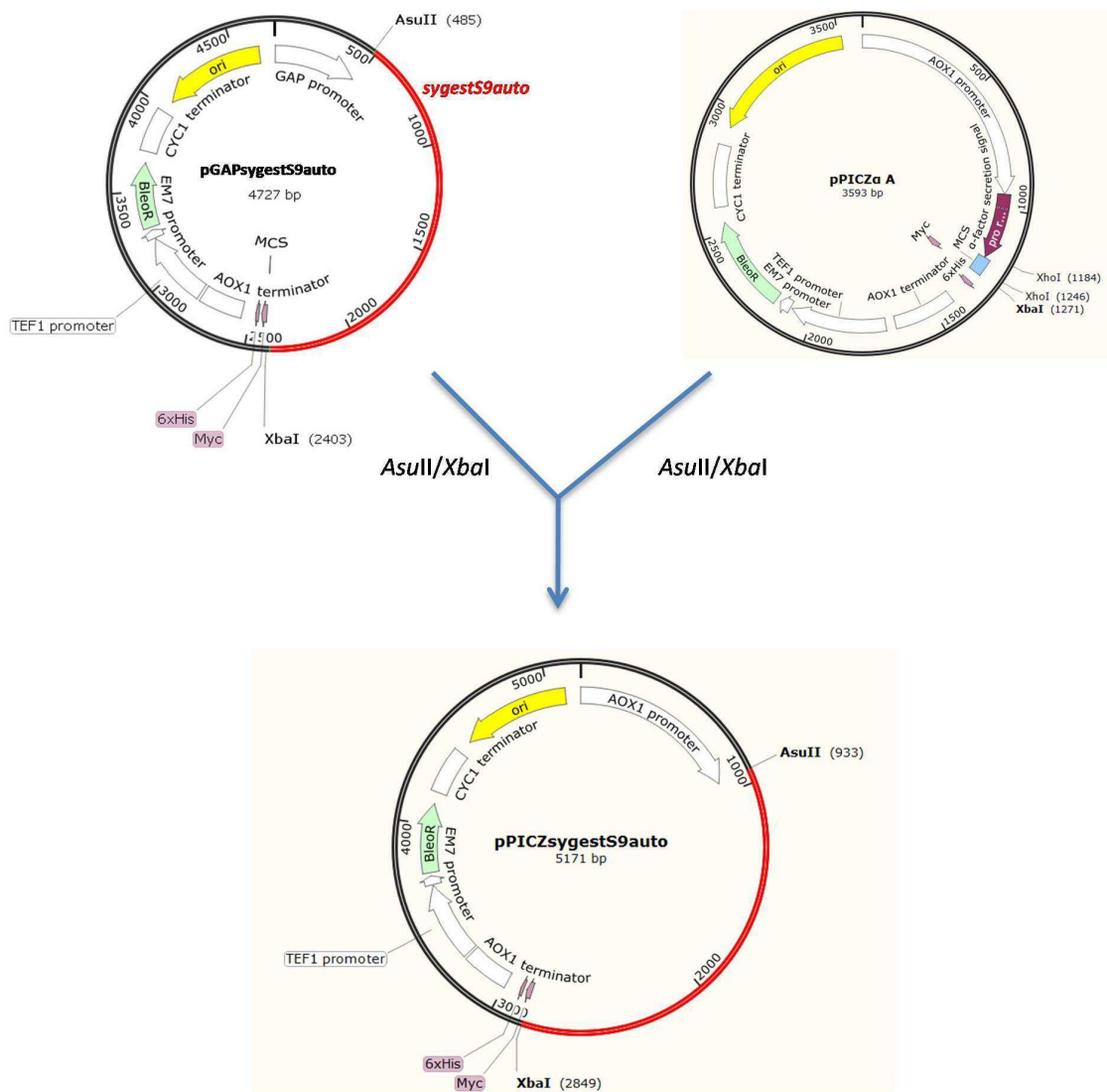
W celu skonstruowania plazmidów ekspresyjnych pPICZsygestS9auto i pPICZsygestS9short (Rys 24-25), zawierających gen *sygestS9auto*, kodujący dwudomenową esterazę z *Pseudomonas* sp. S9 z jej własną sekwencją sygnałną na N-końcu białka i C-końcową domeną oligohistydynową (Rys. 16) oraz *sygestS9short*,

kodujący esterażę *sygEstS9short* z własną sekwencją sygnałną na N-końcu białka, domeną katalityczną, C-końcową domeną oligohistydynową, lecz pozbawioną sekwencji domeny autotransportera (Rys. 16) wykorzystano enzymy restrykcyjne *AsuII* i *XbaI*, umożliwiające przeklonowanie genów *sygestS9auto* (1918 pz) i *sygestS9short* (940 pz) z plazmidów ekspresyjnych pGAPZsygestS9auto i pGAPZsygestS9short do wektora pPICZαA.

DNA plazmidów ekspresyjnych pGAPZsygestS9auto i pGAPZsygestS9short (Wyniki i dyskusja 5.3.2.2) potrawiono enzymami *AsuII* i *XbaI* (Materiały i metody 4.10). Równolegle przeprowadzono reakcję trawienia DNA wektora pPICZαA tymi samymi enzymami restrykcyjnymi (Materiały i metody 4.10). Produkty trawienia DNA wszystkich plazmidów poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w żelu agarozowym (Materiały i metody 4.8), po czym izolowano z żelu właściwej wielkości fragmenty DNA i oczyszczono (Materiały i metody 4.7). Tak przygotowane fragmenty DNA insertu i wektora poddano reakcji ligacji (Materiały i metody 4.11). Mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP 10 (Materiały i metody 4.12-4.13) i wysiewano je na podłoże LA niskosolne zawierające 25 µg/ml zeocyny (Materiały i metody 4.4). Płytki Petriego z wysianymi transformantami inkubowano 24 h w 37°C. Uzyskane kolonie rekombinantowych bakterii przesiewano na podłoże LA niskosolne i pożywkę LB niskosolne z dodatkiem zeocyny (Materiały i metody 4.4). Z komórek *E. coli*/pPICZsygestS9auto i *E. coli*/pPICZsygestS9short hodowanych w pożywce LB niskosolnej izolowano DNA plazmidów rekombinantowych (Materiały i metody 4.6). Uzyskanie właściwych plazmidów rekombinantowych potwierdzano poprzez analizę opóźnienia migracji elektroforetycznej DNA wyizolowanych plazmidów w żelu agarozowym (wybrano plazmidy opóźnione w migracji w żelu względem DNA plazmidu pPICZαA), analizę restrykcyjną wybranych plazmidów rekombinantowych oraz sekwencjonowanie DNA wprowadzonych insertów (Materiały i metody 4.29). Schematy konstrukcji obu plazmidów ekspresyjnych pPICZsygestS9auto i pPICZsygestS9short przedstawiono na rysunkach 24 i 25



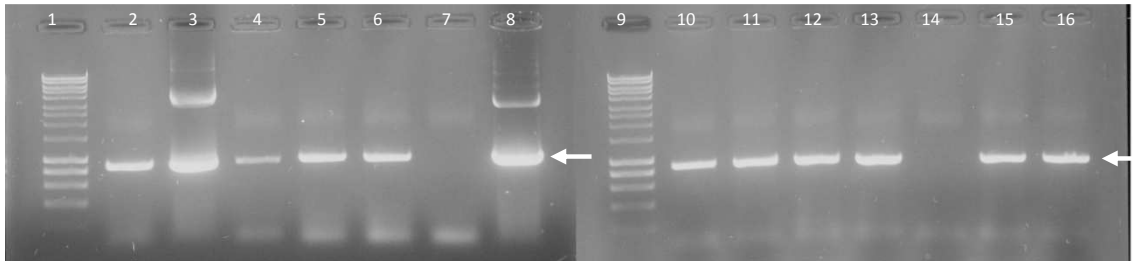
Rys. 24. Schemat konstrukcji plazmidu ekspresyjnego pPICZsygestS9short. Mapy plazmidów wykonano zapomocą programu SnapGene Viewer.



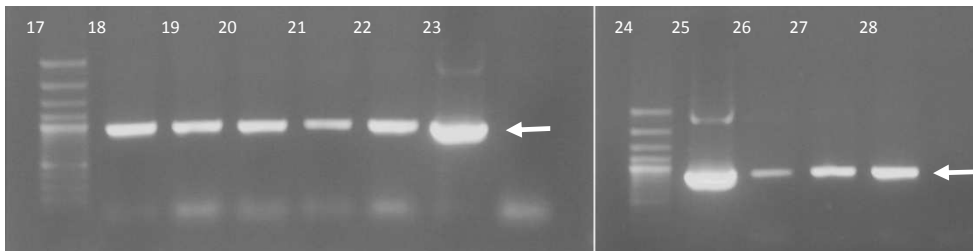
Rys. 25. Schemat konstrukcji plazmidu ekspresyjnego pPICZsygestS9auto. Mapy plazmidów wykonano za pomocą programu SnapGene Viewer.

5.3.3 Biosynteza białek α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto w indukowanym metanolem systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris*

Rekombinantowe szczepy *P. pastoris*, potencjalnych producentów białek α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto , uzyskano transformując komórki kompetentne *P. pastoris* X-33 liniową formą DNA plazmidów pPICZsygestS9auto/*PmeI*, pPICZsygestS9short/*PmeI*, pPICZaestS9auto/*PmeI* oraz pPICZaestS9short/*PmeI*. Transformację komórek *P. pastoris* X-33 przeprowadzono wykorzystując metodę elektroporacji (Materiały i metody 4.17). Uzyskane kolonie rekombinantowych drożdży przesiewano na podłoże YPD stałe oraz podłoże YPD płynne z dodatkiem zeocyny (100 $\mu\text{g/ml}$). Z komórek drożdżowych z hodowli płynnej izolowano DNA genomowe (Materiały i metody 4.6). W celu potwierdzenia integracji DNA plazmidowego z DNA genomowym komórek *P. pastoris* X-33, przeprowadzono reakcję amplifikacji genu esterazy (Materiały i metody 4.18) na matrycy DNA genomowego otrzymanych rekombinantów. We wszystkich przypadkach doszło do integracji DNA plazmidów (pPICZsygestautoS9, pPICZsygestS9short, pPICZaestautoS9 oraz pPICZaestS9short) z DNA genomowym *P. pastoris* X-33 (Rys. 26 i 27).

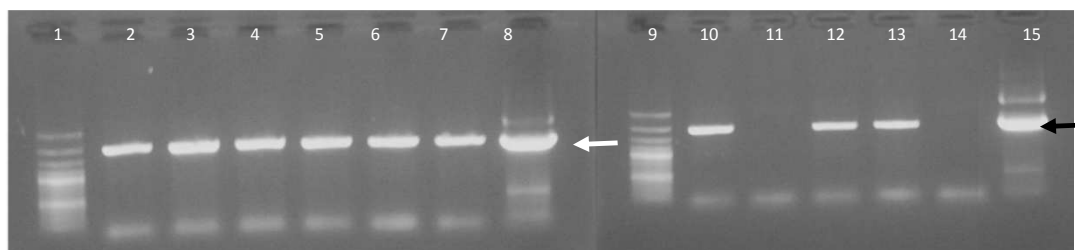


1. Marker wielkości DNA Hypper leader 1kb (Bioline); 2. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 1; 3. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pPICZaestS9short (kontrola dodatnia); 4. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9short nr 1; 5. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9short nr 2; 6. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9short nr 3; 7. kontrola ujemna (reakcja amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*); 8. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pPICZsygestS9short (kontrola dodatnia); 9. Marker wielkości DNA Hypper leader 1kb (Bioline); 10. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 2; 11. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 3; 12. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 4; 13. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 5; 14. kontrola ujemna (reakcja amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*); 15. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 6; 16. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 7.

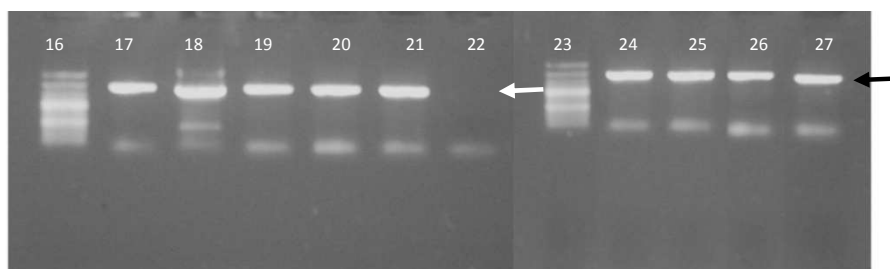


17. Marker wielkości DNA Hypper leader 1kb (Bioline); 18. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9short nr 4; 19. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9short nr 5; 20. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9short nr 6; 21. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9short nr 7; 22. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9short nr 8; 23. Produkt amplifikacji genu *sygestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pPICZsygestS9short (kontrola dodatnia); 24. Marker wielkości DNA Hypper leader 1kb (Bioline); 25. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA plazmidowego pPICZaestS9short; 26. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 8; 27. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 9; 28. Produkt amplifikacji genu *aestS9short* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9short nr 10.

Rys. 26. Wyniki rozdziatu elektroforetycznego w żelu agarozowym produktów amplifikacji genów *sygestS9short* oraz *aestS9short* na matrycach genomowego DNA rekombinantowych szczepów, *P. pastoris* X-33/pPICZsygestS9short oraz *P. pastoris* X-33/pPICZaestS9short. Strzałka wskazuje właściwy produkt PCR.



1. Marker wielkości DNA Hyper leader 1kb (Bioline); 2. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9auto nr 6A; 3. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9auto nr 41; 4. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9auto nr 34; 5. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9auto nr 20; 6. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9auto nr 45; 7. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9auto nr 37 8. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA plazmidowego pPICZaestS9auto (kontrola dodatnia); 9. Marker wielkości DNA Hyper leader 1kb (Bioline); 10. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9auto nr 24; 11. Kontrola ujemna (reakcja amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*); 12. Produkt amplifikacji genu *aestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZaestS9auto nr 27; 13. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 1; 13. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 2; 14. kontrola ujemna (reakcja amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*); 15. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA plazmidowego pPICZsygestS9auto (kontrola dodatnia).



16. Marker wielkości DNA Hyper leader 1kb (Bioline); 17. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 1; 18. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA plazmidowego pPICZaestS9auto(kontrola dodatnia); 19. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 2; 20. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 3; 21. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 4; 22. Kontrola ujemna (reakcja amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*); 23. Marker wielkości DNA Hyper leader 1kb (Bioline); 24. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 5; 25. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 6; 26. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 7; 27. Produkt amplifikacji genu *sygestS9auto* na matrycy DNA genomowego *P. pastoris*/pPICZsygestS9auto nr 8.

Rys. 27. Wyniki rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym produktów amplifikacji genów *sygestS9auto* oraz *aestS9auto* na matrycach genomowego DNA rekombinantowych szczepów *P. pastoris* X-33/ pPICZsygestautoS9, *P. pastoris* X-33/ pPICZsygestautoS9. Strzałka wskazuje właściwy produkt PCR.

W celu selekcji komórek rekombinantowych szczepów *P. pastoris* X-33 o wysokiej aktywności esterolitycznej wykonano kilka badań.

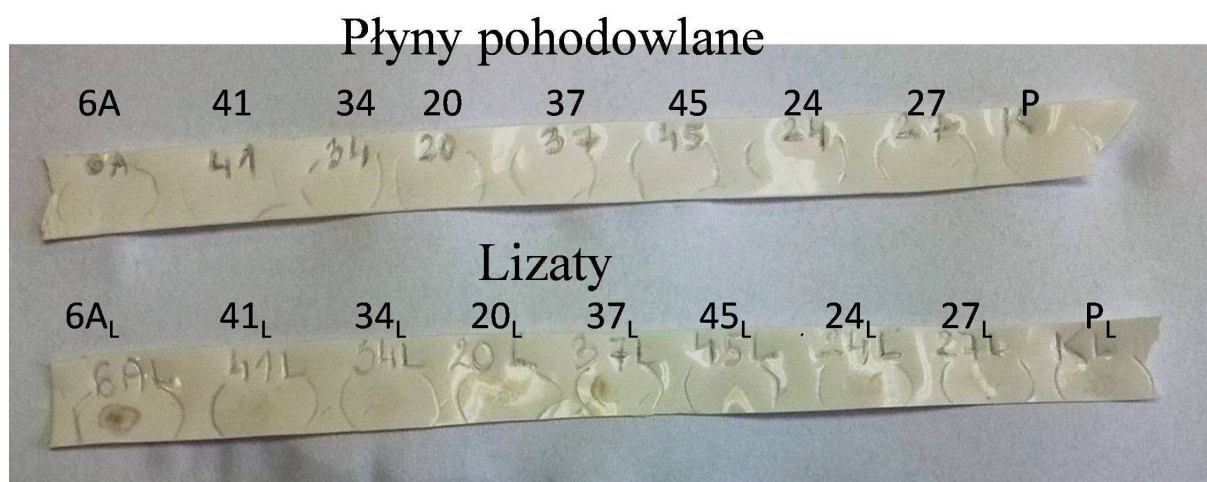
Po pierwsze, w oparciu o metodę przesiewową przedstawioną przez Pichapak S. i wsp. (2015) polegającą na porównaniu wzrostu uzyskanych rekombinantowych komórek *P. pastoris* X-33 na podłożach zawierających zeocynę w stężeniach końcowych: 100, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g/ml}$ wyselekcjonowano rekombinanty, w których prawdopodobnie doszło do kilkukrotnej integracji DNA plazmidowego z DNA genomowym drożdży. Spośród wszystkich uzyskanych rekombinantowych szczepów *P. pastoris* X-33, około 60% było wysoce opornych na zeocynę (1000 $\mu\text{g/ml}$). Szczepy te hodowano w pożywce z metanolem (Materiały i metody 4.4). Następnie, badano aktywność esterolityczną płynów pochodzących, lizatów komórkowych i ekstraktów

bezkomórkowych uzyskanych po dezintegracji komórek rekombinantowych szczepów drożdży za pomocą kulek szklanych (Materiały i metody 4.22) wobec maślanu *p*-nitrofenylu jako substratu (Materiały i metody 4.28). Badania te nie pozwoliły na jednoznaczne potwierdzenie aktywności esterolitycznej w badanych próbkach, gdyż uzyskane wartości absorbancji dla tych próbek były tylko nieznacznie wyższe w stosunku do wartości absorbancji kontroli, które stanowiły płyny pohodowlane, lizaty komórkowe i ekstrakty bezkomórkowe nierekombinantowego szczepu *P. pastoris* X-33. Dlatego też, metodą dotblot (Materiały i metody 4.27) równolegle sprawdzano, czy białka rekombinantowe α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto są obecne w badanych próbkach. Podsumowując, wykonane badania (dotblot) pozwoliły stwierdzić, że indukowany system ekspresyjny oparty o komórki *P. pastoris* umożliwił produkcję dwóch rekombinantowych białek: α EstS9Auto (Rys. 28) i α EstS9short (Rys. 31), natomiast nie potwierdzono, że doszło do produkcji białek rekombinantowych SygEstS9Auto i SygEstS9short . Co ważne wynik dotblot (Rys. 31) wskazuje na obecność białka α EstS9short w płynie pohodowlanym rekombinantowego szczepu *P. pastoris*. Natomiast białko α EstS9Auto obecne jest w lizacie komórkowym rekombinantowego szczepu *P. pastoris* (Rys. 28). Ponadto, nie potwierdzono obecności białka α EstS9Auto w ekstrakcie bezkomórkowym (Rys. 29). Na podstawie tego wyniku można wysnuć przypuszczenie, że białko α EstS9Auto nie jest transportowane na zewnątrz komórki. Analizując ten wynik w oparciu o zebrane dane literaturowe można wysunąć hipotezę, że enzym ten prawdopodobnie zakotwiczony jest w błonie bądź w ścianie komórkowej drożdży (Wilhelm i in. 2011; Rutherford 2006). Stąd, podjęto próbę uwolnienia białka α EstS9Auto. Wykorzystano w tym celu szereg technik, tj. zastosowano szok osmotyczny (1M chlorek sodu), lizę enzymatyczną (litykaza), detergent mający wpływ na rozpuszczalność białek membranowych (Triton X-100), czynnik chaotropowy wpływający na rozpuszczalność białek hydrofobowych (6 M mocznik i 20 mM imidazol), łącząc je z powtarzającym się zabiegiem zamrażania i rozmrażania komórek w celu naruszenia ściany komórkowej i metodą dezintegracji komórek drożdżowych za pomocą kulek szklanych. Wspomniane eksperymenty zostały zaprojektowane w oparciu o analizę informacji o metodach dezintegracji komórek, a także metodach mających na celu zwiększenie rozpuszczalności białek membranowych umieszczonych w następujących źródłach internetowych:

- a) (https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extracts_on_clarification/solubility_studies/index.html#salt),

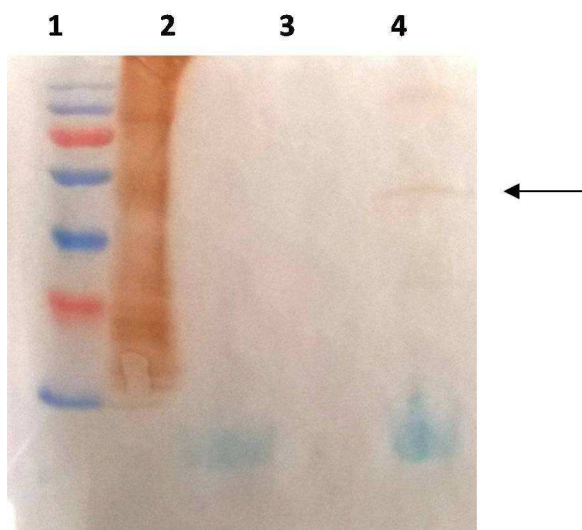
- b) https://www.mcdb.ucla.edu/Research/Jacobsen/LabWebSite/PDFOthers/GE_Seminar.pdf,
- c) <http://www.bio-rad.com/en-pl/applications-technologies/protein-electrophoresis-sample-preparation/protein-solubilization>)

Uzyskane w ten sposób lizaty komórkowe i ekstrakty bezkomórkowe *P. pastoris*/pPICZ α EstS9auto analizowano za pomocą techniki Western blotting (Materiały i metody 4.27) (Rys 30). Pomimo zastosowania różnych metod nie wykryto białka α EstS9auto w ekstraktach bezkomórkowych. Dalsze badania, z powodu ograniczeń czasowych wynikających z priorytetu kontynuowania badań nad drugim białkiem α EstS9short, po konsultacji z promotorem zostały zawieszono. Pytanie o obecność tego białka w ścianie komórkowej pozostaje otwarte. W przyszłości odpowiedź ta ma zostać uzyskana w czasie badań nad możliwością wykorzystania odkrytej domeny autotransportera enzymu EstS9 do kotwiczenia enzymów w ścianach komórkowych bakterii *E. coli*. W literaturze znaleźć można wiele przykładów celowego kotwiczenia enzymów lipolitycznych na powierzchni komórki. Wymienić można m.in. wykorzystanie nieaktywnej formy esterazy EstA z *Pseudomonas aeruginosa* do immobilizacji na powierzchni komórki lipaz z *B. subtilis* i *S. marcescens* (Rutherford i in., 2006; Wilhelm i in., 2011; Bielen i in., 2014). Takie rozwiązanie pozwala traktować całą komórkę jako „biokatalizator” w procesie biosyntezy wybranych bioproduktów.

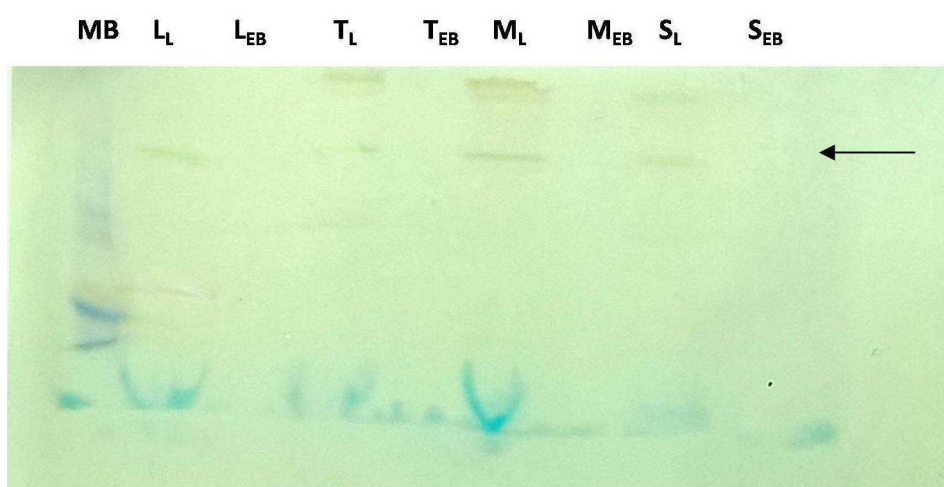


Rys. 28. Detekcja obecności białka rekombinowanego α EstS9Auto w płynach pochodowlanych (górny rząd) rekombinowanych drożdży *P. pastoris* X-33/ pPICZ α estS9auto oznaczonych numerami 6A, 41, 34, 20, 37, 45, 24, 27 oraz lizatach komórkowych (dolny rząd) rekombinowanych drożdży *P. pastoris* X-33/ pPICZ α estS9auto oznaczonych numerami 6A_L, 41_L, 34_L, 20_L, 37_L, 45_L, 24_L, 27_L. P- płyn pochodowlany *P. pastoris* X-33 (górny rząd), P_L- lizat komórkowy *P. pastoris* X-33 (dolny rząd).

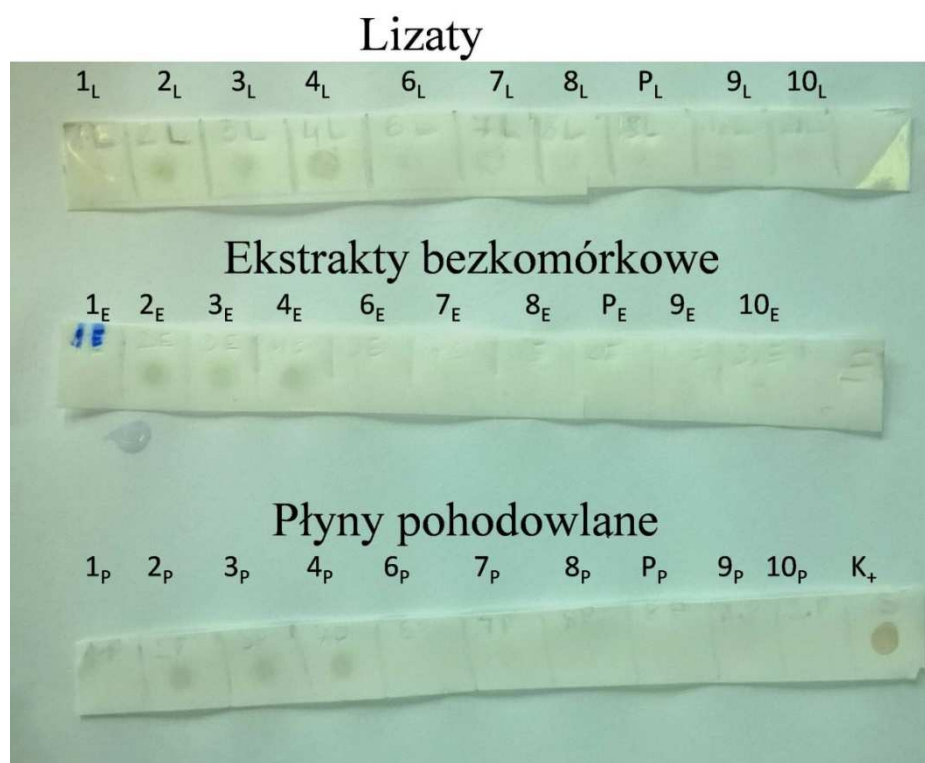




Rys. 29. Wynik analizy Western blotting lizatu i ekstraktu bezkomórkowego *P. pastoris* X-33/ pPICZaestS9auto. 1 - Marker wielkości białek Page Ruler TMP restained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific): 10 - 170 kDa; 2 - białko wzorcowe z domeną oligohistydynową; 3 - ekstrakt bezkomórkowy *P. pastoris* X-33/ pPICZaestS9auto; 4 - lizat *P. pastoris* X-33/ pPICZaestS9auto. Strzałka wskazuje właściwy prążek odpowiadający białku α EstS9auto.



Rys. 30. Wynik analizy Western blotting lizatów komórkowych i ekstraktów bezkomórkowych *P. pastoris* X-33/ pPICZaestS9auto traktowanych kolejno: L - litykaza, T - 2% Triton X-100, M - 6M mocznik z 20mM imidazolem, S - 1M NaCl. MB - marker białkowy Page Ruler TMP restained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific): 10 - 170 kDa; Indeks dolny L- lizat; indeks dolny EB - ekstrakt bezkomórkowy. Strzałka wskazuje właściwy prążek odpowiadający białka α EstS9auto.



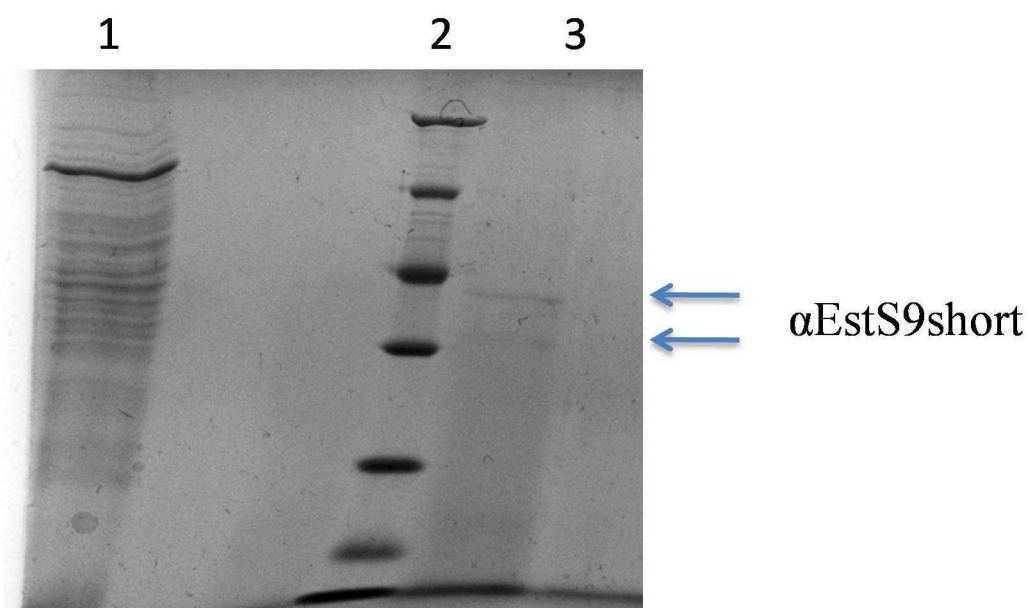
Rys. 31 Detekcja obecności białka rekombinantowego α EstS9short w lizatach komórkowych (górnny rząd-indeks dolny L), ekstraktach bezkomórkowych (środkowy rząd - indeks dolny E) i płynach pohodowlanych (dolny rząd - indeks dolny P) rekombinantowych drożdży *P. pastoris* X-33/pPICZaestS9short oznaczonych numerami, kolejno 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10. Górny rząd: P_L – liza typ *P. pastoris* X-33, środkowy rząd: P_E - ekstrakt bezkomórkowy *P. pastoris* X-33, dolny rząd: P_p - płyny pohodowlane *P. pastoris* X-33; K₊ - białko z domeną oligohistydynową (kontrola pozytywna).

Obecność białka α EstS9short w płynie pohodowlanym rekombinantowych komórek *P. pastoris* umożliwiła podjęcie dalszych badań mających na celu jego charakterystykę właściwości enzymatycznych. Hodowlę komórek *P. pastoris* X-33/pPICZaestS9short o objętości 1800 ml prowadzono według procedury opisanej w punkcie Materiały i metody 4.23. Po zakończeniu biosyntezy hodowlę *P. pastoris* X-33/pPICZaestS9short wirowano, a uzyskany płyn pohodowlany wykorzystano do dalszych badań.

5.3.3.2 Oczyszczanie białka α EstS9short metodą chromatografii metalopowinowactwa

Płyn pohodowlany komórek *P. pastoris* X-33/pPICZaestS9short poddano zateżeniu przy użyciu kasety ultrafiltracyjnej o przepływie „cross-flow” o granicznej

masie molowej wynoszącej 30 kDa (Materiały i metody 4.23). W wyniku oczyszczania przy użyciu chromatografii powinowactwa na złożu ze związanymi jonami niklu oraz dializy wobec 20 mM buforu Tris-HCl o pH 7,5 z wykorzystaniem w tym celu kasety ultrafiltracyjnej otrzymano 1,115 mg białka α EstS9short z 1,8 litra hodowli drożdży (Rys 32), (Materiały i metody 4.24). Właściwości uzyskanego preparatu białkowego α EstS9short przedstawiono w Tabeli 10. Analiza elektroforetyczna w żelu poliakrylamidowym (Materiały i metody 4.26) wykazała obecność dwóch białek o różnej wielkości, zbliżonych masą cząsteczkową do wyliczonej teoretycznej masy białka α EstS9short (Rys 32). Świadczyć to może o niecałkowitym usunięciu peptydu sygnałnego α -faktora *S. cerevisiae* z białka. Prawdopodobnie w otrzymanym preparacie białkowym znajdują się dwie formy rekombinantowej jednodomenowej esterazy (z sekwencją sygnałną i bez).



Rys. 32. Wyniki analizy SDS-PAGE. 1 - Płyn pohodowlany *P. pastoris* X-33/pPICZ α estS9short; 2 – Wzorzec masy cząsteczkowej białek (Unstained Protein Molecular Weight Marker 116-14,4 kDa, Fermentas); 3 - Oczyszczony preparat białka α EstS9short .

Tabela 10. Właściwości preparatu białkowego α EstS9short.

Białko	Ilość całkowita [mg]	Całkowita aktywność enzymatyczna [U]	Aktywność specyficzna [U/mg białka]	Aktywność [U/l]
α EstS9short z <i>P. pastoris</i>	1,155	0,08	0,069	5,375

5.4 Charakterystyka właściwości biochemicznych esterazy α EstS9short produkowanej w komórkach *P. pastoris*

Wszystkie pomiary aktywności prowadzono z wykorzystaniem preparatu białka α EstS9short z C-kończącą domeną oligohistydynową, otrzymanego w indukowanym systemie ekspresyjnym *P. pastoris* X-33 (Wyniki i dyskusja 5.3.3.2).

We wszystkich badaniach aktywność oznaczano wobec maślanu *p*-nitrofenylu, z wyjątkiem określania specyficzności substratowej i badania kinetyki enzymu, która była wykonana również z wykorzystaniem octanu *p*-nitrofenylu (Materiały i metody 4.28).

5.4.2 Analiza specyficzności substratowej α EstS9short

Badano specyficzność substratową preparatu α EstS9short, w celu określenia długości łańcucha węglowodorowego preferowanego substratu. Badania wykazały, że α EstS9short wykazuje typową aktywność esterazy, tj. hydrolizuje estry krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, przy czym największą aktywność wykazuje wobec octanu *p*-nitrofenylu (Tabela 11). Co ciekawe, w przypadku rekombinantowej esterazy EstS9Auto, zawierającej oprócz tej samej domeny katalitycznej także domenę autotransportera, wykazano większą preferencję badanego enzymu do hydrolizy maślanu *p*-nitrofenylu jako substratu (Rozdział 5.1.3, Tabela 7).

Tabela 11. Wyniki analizy specyficzności substratowej α EstS9short wyprodukowanej w systemie ekspresyjnym *P. pastoris*.

Substrat	Aktywność względna [%]
octan <i>p</i> -nitrofenylu (C2)	100 ± 2,1
maślan <i>p</i> -nitrofenylu (C4)	79 ± 3,3
kaprylan <i>p</i> -nitrofenylu (C8)	37,7 ± 0,5
kaprynian <i>p</i> -nitrofenylu (C10)	4,8 ± 1,2
palmitynian <i>p</i> -nitrofenylu (C16)	< 0,01
stearynian <i>p</i> -nitrofenylu (C18)	< 0,01

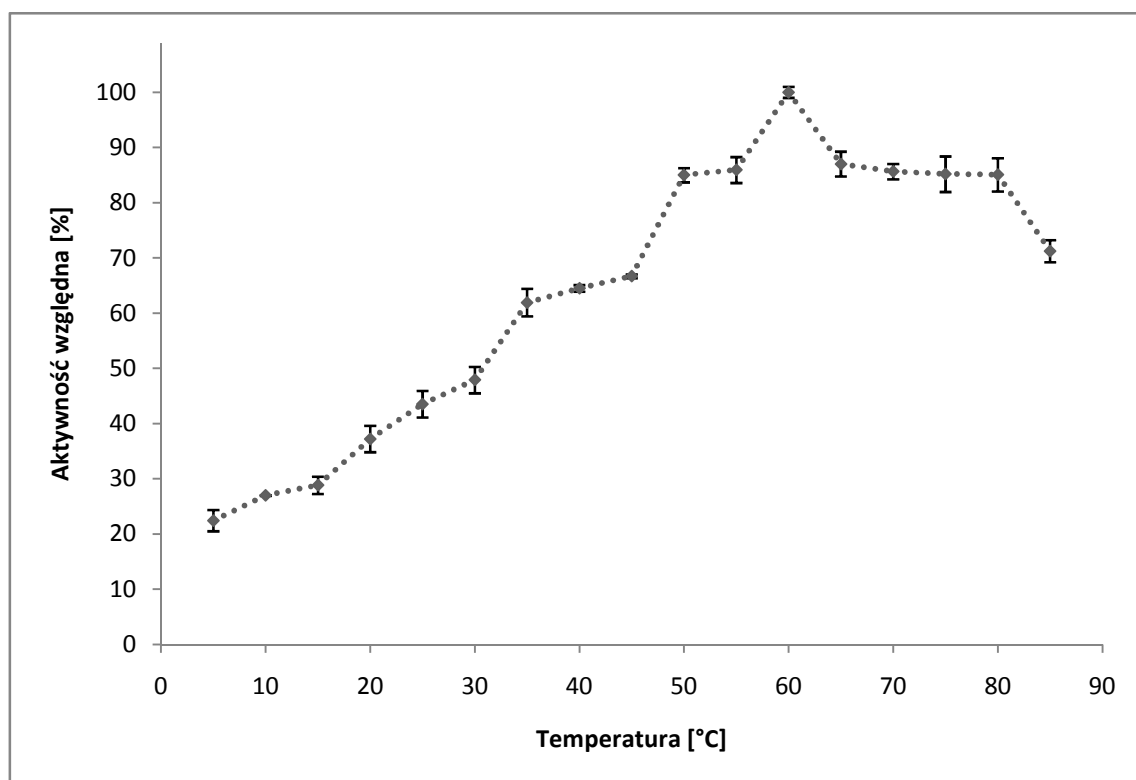
5.4.2 Wpływ temperatury na aktywność α EstS9short

W celu określenia wpływu temperatury na aktywność esterazy α EstS9short produkowanej w indukowanym systemie ekspresyjnym *P. pastoris*, oznaczano aktywność enzymu wobec maślanu *p*-nitrofenylu w różnych temperaturach, w zakresie 5-60°C, w 20 mM buforze Tris-HCl o pH 7,5 (Materiały i metody 4.28). Wyniki zestawiono na rysunku 33. Optymalna temperatura dla działania enzymu α EstS9short wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *P. pastoris* wynosi 60°C.

Uzyskane wyniki porównano z charakterystyką białka rekombinantowego dwudomenowego EstS9Auto, wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli* i izolowanego z ciał inkluzyjnych (Wyniki i dyskusja 5.1.3). Stwierdzono, że otrzymany preparat rekombinantowej esterazy jednodomenowej produkowanej w systemie ekspresyjnym *P. pastoris* wykazuje maksymalną aktywność w temperaturze o 25°C wyższej od tej wyznaczonej dla enzymu EstS9Auto. W temperaturze wynoszącej 35°C, tj. temperaturze optymalnej dla działania enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w *E. coli* (Rys. 8), wykazuje on około 60% swojej maksymalnej aktywności.

Przyczyną uzyskania rozbieżnych wyników dotyczących wpływu temperatury na aktywność EstS9Auto produkowanej w *E. coli* i α EstS9short produkowanej w *P. pastoris* może być obecność mocznika w preparacie EstS9Auto. Czynniki denaturujące, nawet jeśli nie powodują pełnego rozfałdowania struktury białka zaburzają ją w pewnym stopniu, co może wpływać na obniżenie jego optymalnej temperatury aktywności (Deshapande i in., 2001). Zakres temperatury, w którym wariant jednodomenowy α EstS9short jest aktywny przesunął się w kierunku wyższych temperatur tj. od 50 do 80°C, zatem nie może on być porównywany z enzymami

esterolitycznymi zebranych w tabeli 2, gdyż te enzymy wykazują najwyższą aktywność w temperaturach 5-46°C. W związku z tym, zasadne jest porównanie α EstS9short z enzymem EstEP16 (Zhu i in. 2013), który najwyższą aktywność wykazuje również w 60°C czy esterazą GDSL z termofilnej bakterii *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1, która wykazuje aktywność w zakresie temperatury 30–80°C, z maksymalną aktywnością w temperaturze równej 75°C (Yu i in. 2010).

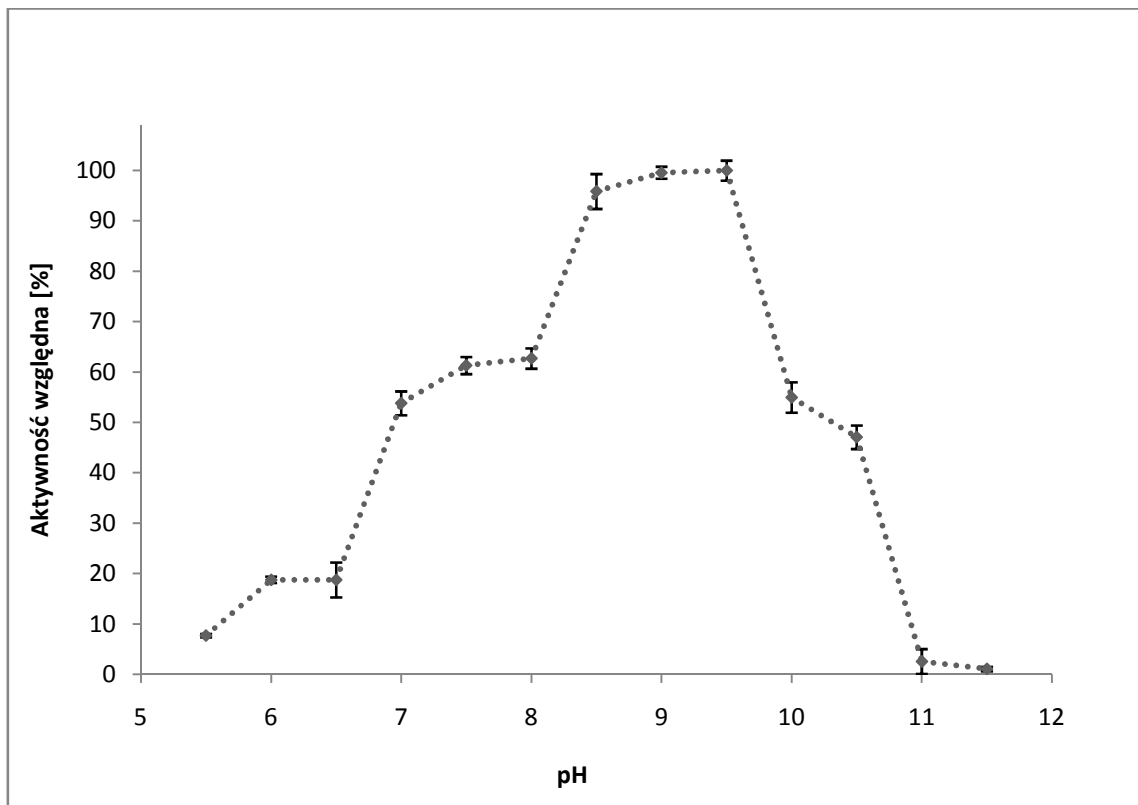


Rys. 33. Wpływ temperatury na aktywność enzymu α EstS9short wyprodukowanego w indukowanym systemie ekspresyjnym *P. pastoris*.

5.4.3 Wpływ pH na aktywność α EstS9short

W celu określenia wpływu pH na aktywność esterazy α EstS9short oznaczano aktywność enzymu wobec maślanu *p*-nitrofenyłu w temperaturze 25°C, w buforach Brittona-Robinsona w zakresie pH 2,0-12,0 (Materiały i metody 4.28). Wyniki

zestawiono na rysunku 34. W buforach o pH w zakresie 2,0-5,0 oraz 11,0-12,0 enzym nie wykazywał aktywności.



Rys. 34. Wpływ pH na aktywność esterazy α EstS9short.

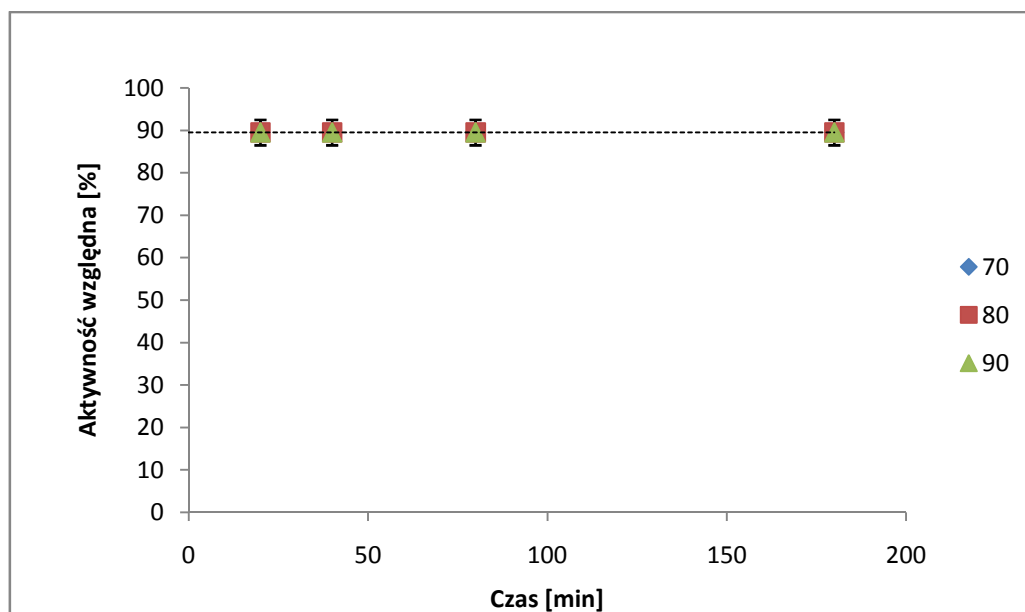
Esteraza α EstS9short wykazuje aktywność powyżej 50% maksymalnej aktywności w zakresie pH 7,5-10, z maksymalną aktywnością w pH równym 9,5. Powyżej pH 10,5 enzym bardzo szybko traci zdolność do hydrolizy maślanu *p*-nitrofenylu. Otrzymane wyniki są porównywalne z tymi uzyskanymi dla esterazy dwudomenowej EstS9Auto wyprodukowanej w systemie ekspresyjnym *E. coli*, izolowanej z ciał inkluzyjnych (Wyniki i dyskusja 5.1.4).

5.4.4 Wpływ temperatury na stabilność α EstS9short

W celu określenia wpływu temperatury na stabilność esterazy α EstS9short produkowanej w systemie ekspresyjnym *P. pastoris*, preparat enzymu inkubowano 5 h w różnych temperaturach (w zakresie 40-90⁰C), w optymalnym pH równym 9,0, a następnie mierzono aktywność wobec maślanu *p*-nitrofenylu w 35⁰C (Materiały i metody 4.28). Wyniki pokazano na rysunku 35. W zakresie temperatury 40-70⁰C białko

to wykazywało 100% aktywności. Esteraza α EstS9short pozostaje stabilna (90% aktywności) w zakresie temperatury 70-90°C przez 3 h.

Wyniki te różnią się od uzyskanych dla enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w systemie ekspresyjnym *E. coli* (Wyniki dyskusja 5.1.5) izolowanego z ciał inkluzyjnych, który nie jest stabilny w zakresie temperatury 70-90°C. Wzrost termostabilności enzymu na skutek inżynierii białka polegającej na usunięciu domeny autotransportera jest bardzo interesujący. Wariant jednodomenowy α EstS9short wykazuje stabilność w wysokich temperaturach, zatem enzym ten z powodzeniem można porównywać do enzymów z mikroorganizmów termofilnych, tj. esterazy GDSL z *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1, która po 80 minutowej inkubacji w 80°C traci połowę swojej aktywności (Yu i in. 2010), bądź termostabilnej esterazy EstEP16, która zachowuje swoją aktywność po 6 h inkubacji w temperaturze 90°C (80% aktywności) (Zhu i in. 2013). Wzrost termostabilności α EstS9short koreluje ze wzrostem optymalnej temperatury aktywności enzymu.

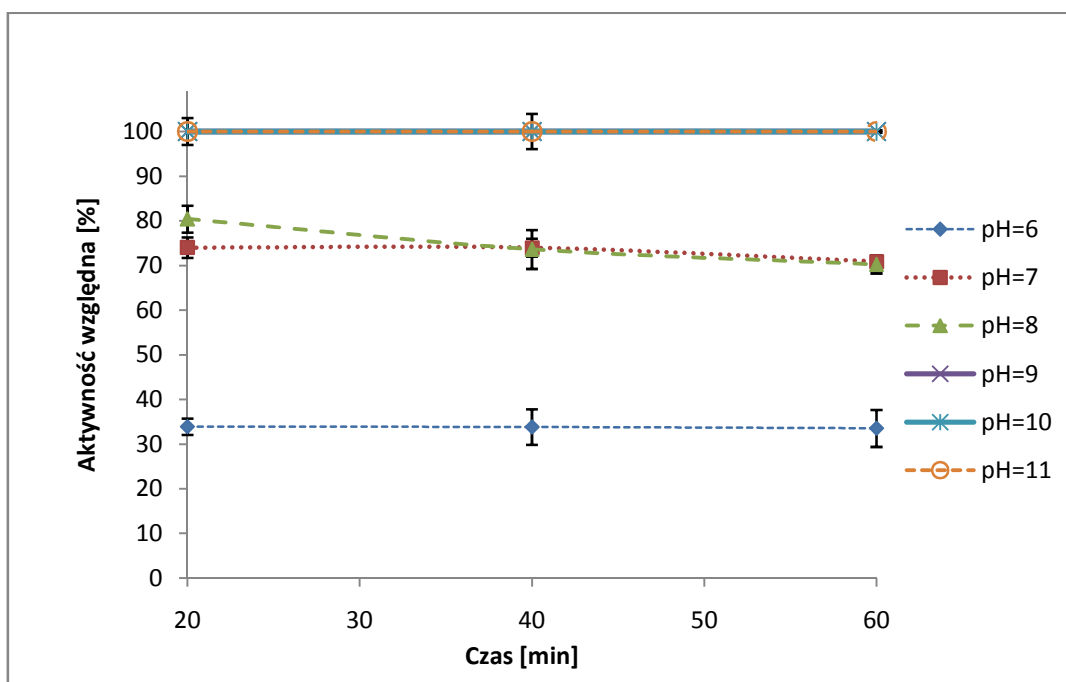


Rys. 35. Wpływ temperatury na stabilność enzymu α EstS9short wyprodukowanego w indukowanym systemie ekspresyjnym *P. pastoris*.

5.4.5 Wpływ pH na stabilność α EstS9short

W celu określenia wpływu pH na stabilność enzymu, preparat esterazy α EstS9short inkubowano 20, 40 i 60 min w 35°C, w buforach Brittona-Robinsona, o pH w zakresie 2,0-12,0, a następnie mierzono aktywność wobec maślanu *p*-nitrofenyłu w temperaturze 35°C (Materiały i metody 4.28). Wyniki zestawiono na rysunku 36. W buforach o pH w zakresie 2,0-5,0 oraz 11,0-12,0 enzym nie wykazywał aktywności (wyników nie przedstawiono).

Badany enzym zachowuje stabilność w zakresie pH 9,0-11,0, a w pH 7,0-8,0 wykazywał powyżej 60% swojej aktywności. α EstS9short wyprodukowany w *P. pastoris* pozostaje stabilny w szerszym zakresie pH niż EstS9Auto wyprodukowany w *E. coli* i izolowany z ciał inkluzyjnych (Wyniki i dyskusja 5.1.6).

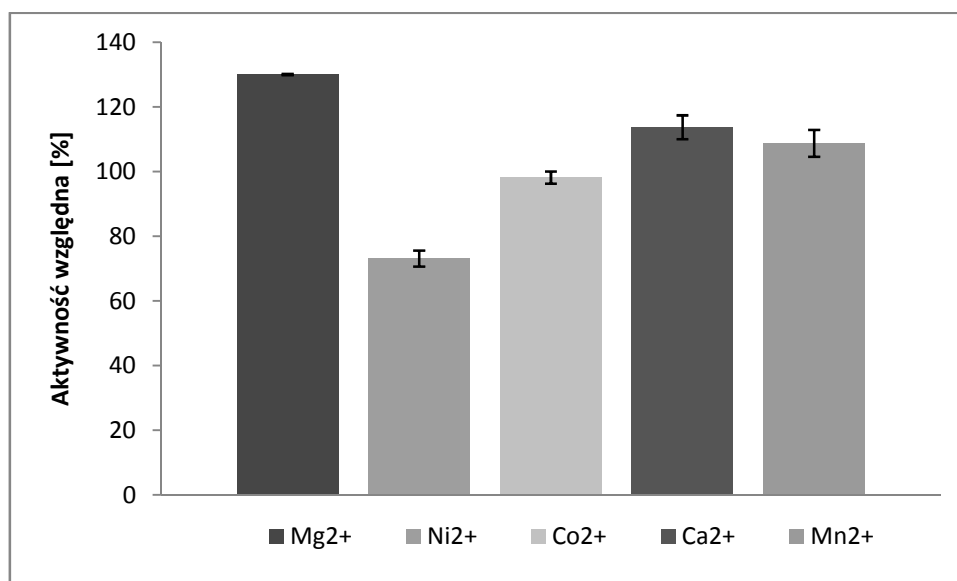


Rys 36. Wpływ pH na stabilność enzymu α EstS9short wyprodukowanego w indukowanym systemie ekspresyjnym *P. pastoris*.

5.4.6 Wpływ wybranych jonów metali na aktywność α EstS9short

W celu określenia wpływu wybranych jonów metali na aktywność esterazy α EsS9short wyprodukowanej w *P. pastoris*, preparat enzymu inkubowano 1 h w temperaturze 35°C, w 20 mM buforze Tris-HCl o pH 9,0, zawierającym chlorki odpowiednich metali o końcowym stężeniu 5 mM (Materiały i metody 4.28). Kontrolę

stanowił preparat esterazy α EstS9short inkubowany 1 h w 35⁰C, w 20 mM buforze Tris-HCl o pH 9,0. Po okresie inkubacji mierzono aktywność enzymu wobec maślanu *p*-nitrofenylu w 35⁰C. Wyniki zestawiono na rysunku 37.



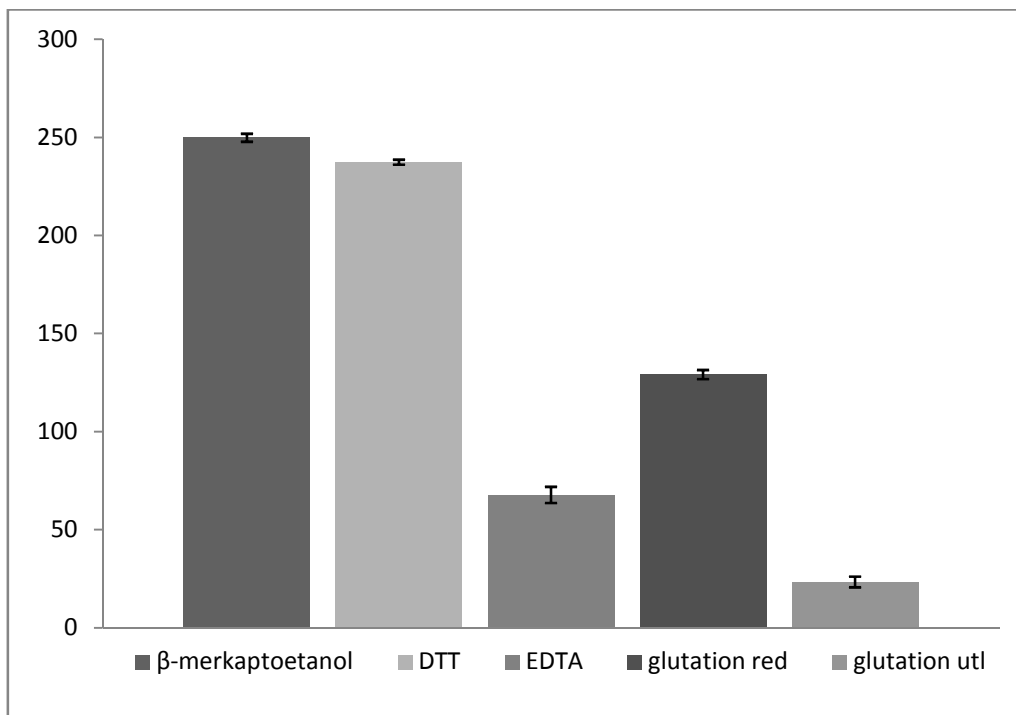
Rys 37. Wpływ jonów metali na aktywność enzymu α EstS9short wyprodukowanego w indukowanym systemie ekspresyjnym *P. pastoris*.

Aktywność enzymu α EstS9short hamowana jest w obecności jonów niklu i nieznacznie przez jony kobaltu. Tak jak w przypadku EstS9Auto jony te są inhibitorami enzymu. Jony wapnia i manganu wpływają nieznacznie na zwiększenie aktywności α EstS9short. Dla porównania, te same jony nieznacznie hamują aktywność EstS9Auto. Jednak ze względu na niewielkie różnice można przypuszczać, że jony te nie mają większego wpływu na aktywność obu białek. Ponadto, wyniki wskazują, że jony magnezu są aktywatorem zarówno dla α EstS9short jak i EstS9Auto (Wyniki i dyskusja 5.1.7).

5.4.7 Wpływ wybranych związków chemicznych na aktywność α EstS9short

W celu określenia wpływu wybranych związków chemicznych na aktywność esterazy α EstS9short wyprodukowanej w systemie ekspresyjnym *P. pastoris*, preparat enzymu inkubowano 1 h w temperaturze 35⁰C, w 20 mM buforze Tris-HCl o pH 9,0, zawierającym wybrane związki chemiczne o końcowym stężeniu 5 mM (Materiały i metody 4.28). Kontrolę stanowił preparat esterazy α EstS9short inkubowany 1 h w 35⁰C,

w buforze 20 mM Tris-HCl, pH 9,0. Po okresie inkubacji mierzono aktywność wobec maślanu *p*-nitrofenylu w 35°C. Wyniki zestawiono na rysunku 38.



Rys 38. Wpływ wybranych związków chemicznych na aktywność enzymu α EstS9short wyprodukowanego w indukowanym systemie ekspresyjnym *P. pastoris*.

Aktywność esteraży α EstS9short jest hamowana w obecności EDTA i utlenionego glutationu. W przypadku większości enzymów lipolitycznych EDTA nie wpływa na aktywność lub jest ich inhibitorem (Saxena i in. 1999; Suzuki i in., 2003; Zhang i in., 2007). Olbrzymi wpływ na aktywność esteraży ma obecność związków tiolowych: β -merkaptioetanolu i DTT. Obie substancje silnie zwiększają aktywność esteraży. Analiza wykazała, że aktywatorem esteraży α EstS9short jest również glutation w formie zredukowanej.

Dla porównania, enzym EstS9Auto produkowany w systemie ekspresyjnym *E. coli* jest aktywowany w obecności EDTA, a nie jak w przypadku α EstS9short hamowany. Wynikać to może z obecności jonów niklu w preparacie enzymatycznym EstS9Auto, które są chelatowane przez EDTA. Preparat enzymatyczny α EstS9short po oczyszczeniu był dializowany z wykorzystaniem kasety ultrafiltracyjnej o przepływie „cross-flow” co mogło skutkować zwiększoną czystością preparatu, a więc znacząco obniżyć końcowe stężenie jonów niklu w preparacie. Ponadto, β -merkaptioetanol nie wpływał na aktywność EstS9Auto, jednak dla α EstS9short jest silnym aktywatorem.

5.4.8 Określenie parametrów kinetycznych α EstS9short

Właściwości kinetyczne enzymu analizowano wobec maślanu *p*-nitrofenylu i octanu *p*-nitrofenylu (Materiały i metody 4.28) w temperaturze 60°C tj. optymalnej temperaturze dla działania tego enzymu. Pracę poszerzono o badanie właściwości kinetycznych białka wobec maślanu *p*-nitrofenylu w temperaturze 35°C w celu porównania uzyskanych parametrów kinetycznych z analogicznymi parametrami uzyskanymi dla EstS9Auto. Najwyższe powinowactwo (niska wartość K_m) enzym α EstS9short wykazuje wobec maślanu *p*-nitrofenylu. Esteraza α EstS9short wykazuje niższe powinowactwo w temperaturze optymalnej tj. 60°C niż w temperaturze niższej 35°C (optymalna temperatura aktywności enzymu EstS9Auto). W 60°C enzym α EstS9short charakteryzuje się zbliżoną wartością k_{cat}/K_m wobec octanu *p*-nitrofenylu i maślanu *p*-nitrofenylu (Tabela 12).

Wartości parametrów kinetycznych α EstS9short są znacznie niższe niż te charakteryzujące EstS9Auto (Tabela 8). Na tej podstawie można przypuszczać, że usunięcie domeny autotransportera negatywnie wpłynęło na aktywność domeny katalitycznej badanego enzymu. Być może usunięcie domeny autotransportera jest przyczyną nieprawidłowego sfałdowania domeny katalitycznej, a co za tym idzie w konsekwencji obniżonej aktywności enzymu α EstS9short (Tabela 12).

Tabela 12. Parametry kinetyczne esterazy α EstS9short.

Substrat	Temperatura [°C]	K_m [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_m [s ⁻¹ mM ⁻¹]
maślan <i>p</i> -nitrofenylu	35	0,727	0,034	0,047
maślan <i>p</i> -nitrofenylu	60	6,151	0,145	0,024
octan <i>p</i> -nitrofenylu	60	7,358	0,203	0,028

[U] = 1 μ mol/min (Materiały i metody 4.28)

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Źródłem genu, który posłużył do otrzymania zbadanych rekombinowanych wariantów sekwencyjnych esterazy EstS9 był szczep adaptowanej do zimna bakterii *Pseudomonas* sp. S9 wyizolowanej z gleby pochodzącej ze Spitzbergenu. W celu uzyskania wydajnej produkcji aktywnego białka wykorzystano trzy systemy ekspresyjne, tj. system ekspresyjny oparty o komórki mezofilnego gospodarza *E. coli*, a także systemy konstytutywnej i indukowanej ekspresji genów oparte o wykorzystanie komórek drożdży *P. pastoris* jako gospodarza ekspresyjnego.

Rekombinantowe białko EstS9Auto w systemie ekspresyjnym *E. coli* produkowane było w postaci ciał inkluzyjnych, mimo to z powodzeniem zostało oczyszczone w warunkach denaturujących i denaturowane, a następnie scharakteryzowane zostały jego właściwości enzymatyczne. Ze względu na podobieństwo budowy topologicznej EstS9Auto i enzymu PsEstI analizowano właściwości enzymatyczne obu białek (Tabela 2). Obydwa enzymy wykazują aktywność w środowisku lekko alkalicznym, z maksymalną aktywnością w pH 9,0 dla EstS9Auto oraz pH 8,0 dla PsEstI. Preferują katalizę reakcji hydrolizy estrów krótkołańcuchowych kwasów monokarboksylowych, z najwyższą aktywnością wobec maślanu *p*-nitrofenylu. Jednakże białko EstS9Auto wykazuje najwyższą aktywność wobec wspomnianego substratu w 35°C, a nie w 45°C tak jak wykazano dla PsEstI. Ponadto, EstS9Auto charakteryzuje się znacznie wyższą termostabilnością niż esteraza PsEstI (Tabela 2). Co warto podkreślić, właściwość ta jest wyjątkowo interesująca, gdyż większość aktywnych w niskich temperaturach esteraz traci swoją aktywność w zakresie temperatury 50-70°C (30 minutowa bądź krótsza inkubacja białka inaktywuje enzym) (Tabela 2). W przypadku biotechnologii, w których pożądana jest łatwa metoda inaktywacji enzymu po zakończeniu reakcji enzymatycznej a przed kolejnym etapem procesu technologicznego, ta cecha rekombinantowego enzymu EstS9Auto jest jego wadą.

Dla porównania, badania nad rekombinantowym wariantem esterazy EstS9short tj. esterazy EstS9 pozbawionej domeny autortransportera, zakończyły się niepowodzeniem. Przeprowadzone badania wykazały, że analogicznie jak dla enzymu EstS9Auto, wariant jednodomenowy EstS9short produkowany był w postaci nieaktywnej (ciałka inkluzyjne) i w celu otrzymania jego aktywnej formy enzym ten wymagał przeprowadzenia procesu oczyszczania w warunkach denaturujących i

następnie jego renaturacji. Białko EstS9short wykazywało znacznie niższą aktywność właściwą (0,0025 U/mg_{białka}) w porównaniu do EstS9Auto (0,088 U/mg_{białka}). Niska aktywność białka EstS9short oraz jego niska stabilność w czasie przechowywania uniemożliwiły przeprowadzenie pełnej charakterystyki właściwości biochemicznych enzymu.

Problemy z otrzymaniem aktywnych enzymatycznie preparatów rekombinantowych esteraz stały się podstawą do rozszerzenia pracy o wykorzystanie innych systemów ekspresyjnych. System ekspresyjny oparty o komórki drożdży *P. pastoris* umożliwia produkcję heterologicznych białek połączoną z ich sekrecją do pożywki, co w teorii powinno ułatwiać otrzymanie dużych ilości obu form esterazy S9, a także wykluczyć problemy wynikające z produkcji rekombinantowych białek w postaci ciałek inkluzyjnych.

System ekspresyjny umożliwiający konstytutywną ekspresję heterologicznych genów znajdujących się pod kontrolą promotora transkrypcji genu dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerolowego (P_{GAP}) w komórkach *P. pastoris* X-33 nie pozwolił na otrzymanie żadnego z czterech testowanych wariantów rekombinantowych białek: α EstS9short, α EstS9Auto, sygEstS9short oraz sygEstS9Auto . Założono więc możliwy toksyczny wpływ produkowanych białek na komórki *P. pastoris*. W związku z tym sięgnięto po rozwiązanie stosowane z dużym powodzeniem do produkcji „toksycznych” białek w komórkach drożdży. Przeniesiono geny odpowiedzialne za produkcję w/w białek do wektora pPICZalphaA umożliwiającego ich kontrolowaną ekspresję w komórkach *P. pastoris* pod kontrolą promotora transkrypcji genu *AOXI* indukowanego w obecności metanolu w medium hodowlanym. Jak pokazały wykonane eksperymenty, indukowany system ekspresyjny umożliwił produkcję dwóch rekombinantowych białek, tj. α EstS9Auto i α EstS9short natomiast nie potwierdzono, aby doszło do ekspresji genów *sygestS9auto* i *sygestS9short* kodujących białka rekombinantowe SygEstS9Auto i SygEstS9short . W związku z powyższym wykluczono przydatność własnej sekwencji sygnałnej enzymu EstS9 do jego produkcji i sekrecji przez komórki *P. pastoris*.

W oparciu o uzyskane wyniki dla enzymu α EstS9Auto i analizę tych wyników w świetle zebranych danych literaturowych, można wysunąć hipotezę, że białko α EstS9Auto prawdopodobnie zakotwiczone jest w błonie bądź w ścianie komórkowej drożdży (Wilhelm i in. 2011; Rutherford 2006). Niestety przeprowadzone badania nie pozwoliły na potwierdzenie tej hipotezy i ze względów czasowych oraz braku koniecznego wyposażenia, dalsze badania zostały zawieszono. W przyszłości ta

teoria ma zostać zweryfikowana w czasie badań nad możliwością wykorzystania odkrytej domeny autotransportera enzymu EstS9 do kotwiczenia enzymów w ścianach komórkowych drożdży. W literaturze znane jest takie wykorzystanie domeny autotransportera (Rutherford i in., 2006; Bielen i in., 2014) mające szereg zalet w stosunku do wieloetapowego oczyszczania białek z płynu pochodzącego bądź z cytoplazmy, m.in. dzięki zakotwiczeniu w ścianie komórkowej białek fuzyjnych z wybraną domeną autotransportera możliwe jest stosowanie całych komórek drożdży lub bakterii jako biokatalizatorów mogących mieć potencjalne zastosowanie w przemyśle biotechnologicznym.

W dalszym etapie badań przeprowadzono charakterystykę właściwości enzymatycznych α EstS9short. Stwierdzono, że otrzymany preparat rekombinantowej esterazy jednodomenowej produkowanej w systemie ekspresyjnym *P. pastoris* wykazuje maksymalną aktywność w temperaturze 60°C, a więc w temperaturze o 25°C wyższej od tej wyznaczonej dla enzymu EstS9Auto. W temperaturze wynoszącej 35°C, tj. temperaturze optymalnej dla działania enzymu EstS9Auto wyprodukowanego w *E. coli*, wykazuje on około 60% swojej aktywności.

Esteraza α EstS9short wykazuje powyżej 50% aktywności w zakresie pH 7,5-10,0 z maksymalną aktywnością w pH równym 9,5. Powyżej pH 10,5 enzym bardzo szybko traci zdolność do hydrolizy maślanu *p*-nitrofenylu. Otrzymane wyniki są porównywalne z uzyskanymi dla esterazy dwudomenowej wyprodukowanej w systemie ekspresyjnym *E. coli*, tj. EstS9Auto (optymalne pH = 9,0). Aktywność α EstS9short w środowisku lekko alkalicznym to właściwość enzymu, która nie odbiega od właściwości innych esteraz (Tabela 2).

Esteraza α EstS9short pozostaje stabilna (90% aktywności) po 3 h inkubacji enzymu w zakresie temperatury 70-90°C. Wyniki te znacząco różnią α EstS9short od enzymu EstS9Auto, który nie jest stabilny w zakresie temperatury 70-90°C. Wpływ usunięcia domeny autotransportera na termostabilność enzymu jest bardzo interesujący. Wariant jednodomenowy α EstS9short wykazuje stabilność w wysokich temperaturach, zatem z powodzeniem można go porównywać do enzymów z mikroorganizmów termofilnych (Yu i in. 2010; Zhu i in. 2013). Enzym α EstS9short zachowuje stabilność w zakresie pH 9,0-11,0 zaś w pH 7,0-8,0 wykazywał powyżej 60% swojej aktywności. Enzym α EstS9short pozostaje stabilny w szerszym zakresie pH niż EstS9Auto wyprodukowany w *E. coli*.

Wartości parametrów kinetycznych α EstS9short (Tabela 12) są znacznie niższe niż te charakteryzujące EstS9Auto (Tabela 8). Na tej podstawie można przypuszczać, że usunięcie domeny autotransporterera negatywnie wpłynęło na aktywność białka. Dane literaturowe donoszą o ścisłym powiązaniu procesu składania z sekrecją białek w komórkach bakterii Gram-ujemnych wykorzystujących w tym celu V mechanizm sekrecji. Ponadto wskazują, że domena „pasażera” nie jest w pełni sfałdowana podczas procesu sekrecji przez błonę zewnętrzną, proces fałdowania rozpoczyna się natychmiast po jej wydzieleniu. Mechanizm translokacji białka należącego do rodziny AT poznano na przykładzie autotrasporterera o aktywności proteolitycznej EspP z *E. coli* O157:H7. Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, że fałdowanie C-terminalnego fragmentu domeny „pasażera” odbywa się wewnątrz komórki i jest etapem limitującym przemieszczania się pasażera (pełnej sekwencji aminokwasowej). Energia potrzebna do przemieszczania się białka powstaje dzięki częściowemu foldingowi domeny „pasażera” (po tym jak domena ta przejdzie przez błonę wewnętrzną) (Wilhelm i in., 2011). Na tej podstawie, można domniemywać, że brak domeny autotransporterera może skutkować nieprawidłowym sfałdowaniem domeny katalitycznej, co może prowadzić w konsekwencji do obniżonej aktywności tego białka. Preparat enzymatyczny α EstS9short wyprodukowany w systemie ekspresyjnym *P. pastoris* wykazuje wyższą aktywność specyficzną (0,069 U/mg_{białka}) niż EstS9Short wyprodukowany w systemie ekspresyjnym *E. coli* (0,0025 U/mg_{białka}), jednak niższą niż wariant dwudomenowy białka EstS9Auto wyprodukowany w systemie ekspresyjnym *E. coli* (0,088 U/mg_{białka}).

Przyjmując, że enzym EstS9 wydzielany jest za pomocą V mechanizmu sekrecji białek można wnioskować, że aktywna „dzika forma” enzymu składa się z dwóch domen. Wysnutą przeze mnie hipotezę potwierdzają wyniki badań przedstawione przez Wilhelma i jego współpracowników, którzy opisują białko EstA izolowane z *Pseudomonas* sp. PAO1. Esteraza EstA ulokowana jest w zewnętrznej błonie i składa się z N-terminalnej domeny katalitycznej i C-terminalnej domeny autotransporterera (Wilhelm i in., 1999). W związku z tym oraz porównując i analizując wyniki uzyskanych badań można wnioskować, że uzyskane enzymy rekombinantowe posiadają ograniczony potencjał biotechnologiczny, m.in. ze względu na problemy z ich wydajną produkcją w aktywnej formie we wszystkich przetestowanych systemach bakteryjnych i drożdżowych. Mimo wszystko przeprowadzone badania znacząco poszerzyły obecny stan wiedzy nad esterazami aktywnymi w niskiej temperaturze i należącymi do rodziny GDSL. Badany enzym jest trzecim białkiem należącym do tej

rodziny i drugim, w którym występuje domena autotransporterera oraz pierwszym gdzie fakt istnienia tej domeny został uwzględniony w czasie prowadzonych badań nad właściwościami badanego enzymu (Wicka i in. 2016). Szczególnie zaskakujące okazało się wykazanie, że usunięcie domeny AT prowadzi do znaczącego wzrostu wartości optymalnej temperatury aktywności i termostabilności badanego enzymu. Jest to dobry punkt do rozpoczęcia badań nad wpływem zaplanowanych mutacji w obrębie mutein białka α EstS9short na wspomniane właściwości i jego aktywność katalityczną w reakcji hydrolizy maślanu *p*-nitrofenylu.

Ciekawym kierunkiem badań, który uważamy że także warto podjąć, są badania nad wykorzystaniem zidentyfikowanej domeny AT do kotwiczenia białek fuzyjnych o różnorodnych aktywnościach enzymatycznych na powierzchni rekombinantowych komórek *E. coli* oraz przetestowanie uzyskanych komórek jako potencjalnych biokatalizatorów wybranych reakcji enzymatycznych.

7. BIBLIOGRAFIA

Abhijit R. (2012) Application of Lipase in Industry. Asian Journal of Pharmacy and Technology 2(2): 33-37.

Al Khudary R., Venkatachalam R., Katzer M., Elleuche S., Antranikian G. (2010) A cold-adapted esterase of a novel marine isolate, *Pseudoalteromonas arctica*: gene cloning, enzyme purification and characterization. Extremophiles 14(3): 273-85.

Andualema B., Gessesse A. (2012) Microbial lipases and their industrial applications: Review. Biotechnology 11(3): 100-118.

Arpigny JL., Jaeger KE. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. The Biochemical journal 343: 177–183.

Babu J., Pramod WR., George T. (2008) Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. Biotechnology advances 26(5): 457-70.

Bielen A., Teparić R., Vujaklija D., Mrsa V. (2014) Cell-Surface Display of Lipolytic Enzymes. Food Technology and Biotechnology 52 (1): 16–34.

Bornscheuer UT, Kazlauskas RT. (2006) Hydrolases in Organic Synthesis Regio- And Stereoselective Biotransformations.

Brault G, Shareck F, Hurtubise Y, Lépine F, Doucet N (2012) Isolation and Characterization of EstC, a New Cold-Active Esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). Plos one 7(3): e32041.

Cieśliński H., Białkowska A., Długołęcka A., Daroch M. L., Tkaczuk K., Kalinowski H., Kur J., Turkiewicz M. (2007) A cold-adapted esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromas* sp. strain 643A. Archives of Microbiology 188: 27–36.

Cheng Y., Qian YK., Li ZF., Wu ZH., Liu H., Li YZ. (2011) A novel cold-adapted lipase from *Sorangium cellulosum* strain So0157-2: gene cloning, expression, and

enzymatic characterization. *International Journal of Molecular Sciences* 12(10): 6765-80.

Choi YJ., Miguez CB., Lee BH. (2004) Characterization and Heterologous Gene Expression of a Novel Esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3213–3221.

Choo D-W, Kurihara T, Suzuki T, Soda K, Esaki N. (1998) A Cold-Adapted Lipase of an Alaskan Psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 64(2): 486-491.

De Santi C., Tedesco P., Ambrosino L., Altermark B., Willassen NP., de Pascale D. (2014) A new alkaliphilic cold-active esterase from the psychrophilic marine bacterium *Rhodococcus* sp.: functional and structural studies and biotechnological potential. *Applied biochemistry and biotechnology*: 172(6):3054-68.

De Santi C., Leiros HK.S., Di Scala A. De Pascale D., Altermark B., Willassen NP. (2016) Biochemical characterization and structural analysis of a new cold-active and salt-tolerant esterase from the marine bacterium *Thalassospira* sp. *Extremophiles* 20 (3): 323-336.

Dong J., Zhao W., Gasmalla MAA., Sun J., Hua X., Zhanga W., Han L., Fan Y., Feng Y., Shen Q., Yang R. (2015) A novel extracellular cold-active esterase of *Pseudomonas* sp. TB11 from glacier No.1: Differential induction, purification and characterisation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*: 121 (2015) 53–63.

Eom GT., Lee SH., Song BK., Chung KW., Kim YW., Song JK. (2013) High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 116(2): 165-170.

Esteban-Torres M., Mancheño JM., de las Rivas B., Muñoz R. (2014) Characterization of a Cold-Active Esterase from *Lactobacillus plantarum* Suitable for Food Fermentations. *Journal of Agricultural Food Chemistry*: 62(22): 5126-5132.

Esteban-Torres M., Santamaría L., De las Rivas B., Muñoz R. (2014) Characterization of a cold-active and salt-tolerant esterase from *Lactobacillus*

plantarum with potential application during cheese ripening. *International Dairy Journal*: 39: 312-315.

Feller G., (2013) Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. *Scientifica* 2013: 1-28.

Ferrer P., Alarcón M., Ramón R., Benaiges MD., Valero F. (2009) Recombinant *Candida rugosa* LIP2 expression in *Pichia pastoris* under the control of the AOX1 promoter. *Biochemical Engineering Journal* 46: 271–277.

Gerday C. (2013) Cold-adapted Yeasts. *Fundamentals of Cold-Active Enzymes* 15: 325-350.

Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M., Chessa J.P., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Dumont J., Garsoux G., Georgette D., Hoyoux A., Lonhienne T., Meuwis M.A., Feller G., (2000) Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology, *Trend in biotechnology* 18: 103–107.

Gotor V (1999) Non-Conventional Hydrolase Chemistry: Amide and Carbamate Bond Formation Catalyzed By Lipases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7: 2189-2197.

Gotor-Fernandez V, Gotor V. (2007) Use of lipases in organic synthesis. *Industrial enzymes*: 301-315.

Gupta R, Gupta N, Rathi P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology* 64(6): 763–781.

Green ER, Meccas J. (2016) Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiology Spectrum* 4(1): VMBF-0012-2015.

Hang Y., Ran S., Wang X., Jiao J., Wang S., Liu Z. (2016) Mutational analysis and stability characterization of a novel esterase of lipolytic enzyme family VI from *Shewanella* sp. *International Journal of Biological Macromolecules* 93: 655–664.

Hasan F., Shah A. A., Hameed A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235–251.

Hasan F, Shah AA, Javed S, Hameed A (2010) Enzymes used in detergents: Lipases. African Journal of Biotechnology 9 (31): 4836-4844.

Hausmann S., Jaeger KE., (2010) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology: Lipolytic enzymes from bacteria 21:1100-1102.

Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends in Microbiology 6: 370–378.

Hong S., Lee C., Jang SH. (2012) Purification and properties of an extracellular esterase from a cold-adapted *Pseudomonas mandelii*. Biotechnology Letters 34(6):1051-1055.

Hu XP, Heath C., Taylor MP., Tuffin M., Cowan D. (2012) A novel, extremely alkaliphilic and cold-active esterase from Antarctic desert soil. Extremophiles 16:79–86.

Huang J., Yang Z., Guan F., Zhang S., Cui D, Guan G., Li Y. (2013) A novel mono- and diacylglycerol lipase highly expressed in *Pichia pastoris* and its application for food emulsifier preparation. Process Biochemistry 48: 1899–1904.

Inmaculada NG., Alvaro SF., Francisco GC. (2013) Overexpression, Purification, and Biochemical Characterization of the Esterase Est0796 from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Molecular Biotechnology 54:651–660.

Jaeger KE., Ransac S., Dijkstra BW., Colson C., van Heuvel M., Misset O. (1994) Bacterial lipases. FEMS Microbiology 15: 29–63.

Jaeger KE, Reetz MT (1998) Microbial lipases form versatile tools for Biotechnology. Trends in Biotechnology 16: 396-403.

Jaeger KE., Dijkstra BW., Reetz MT. (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annual Review of Microbiology 53: 315–51.

Jaeger KE, Eggert T. (2002) Lipases for biotechnology. Current Opinion in biotechnology 13(4): 390-397.

Jalloulia R., Parsieglia G., Carrière F., Gargouri Y., Bezzine S. (2017) Efficient heterologous expression of *Fusarium solani* lipase, FSL2, in *Pichia pastoris*, functional characterization of the recombinant enzyme and molecular modeling. *International Journal of Biological Macromolecules* 94: 61–71.

Jiang ZB., Song HT., Gupta N., Ma LX., Wu ZB. (2007) Cell surface display of functionally active lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 56: 35–39.

Jiang H., Zhang S., Gao H., Hu N. (2016) Characterization of a cold-active esterase from *Serratia* sp. and improvement of thermostability by directed evolution. *BMC Biotechnology* 16:7.

Kim YJ., Choi GS., Kim SB., Yoon GS., Kim YS., Ryu YW. (2006) Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification* 45(2): 315-323.

Kim YO., Par IS., Kim HK., Nam BH., Kong HJ., Kim WJ., Kim DG., Kim KK., Lee SJ. (2011) A novel cold-adapted esterase from *Salinisphaera* sp. P7-4: Gene cloning, overproduction, and characterization. *The Journal of General and Applied Microbiology* 57: 357-364.

Kim YO, Heo YL, Kim HK, Nam BH, Kong HJ, Kim DG, Kim WJ, Kim BS, Jee YJ, Lee SJ. (2012) Gene Cloning and Characterization of a Cold-Adapted Esterase from *Acinetobacter venetianus* V28. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(9): 1245–1252.

Kim YO., Heo YL., Nam BH., Kim DG, Jee YJ., Lee SJ., An CM. (2013) Molecular Cloning, Purification, and Characterization of a Cold-Adapted Esterase from *Photobacterium* sp. MA1-3. *Fisheries and aquatic Sciences* 16(4): 311-318.

Kim Y., Ryu BH., Kim J., Yoo W., An DR., Kim BY., Kwon S., Lee S., Wang Y., Kim KK., Kim TD. (2016) Characterization of a novel SGNH-type esterase from *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Biological Macromolecules* 96: 560–568.

Kiyota H., Higashi E., Koike T., Oritani T. (2001) Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. *Tetrahedron Asymmetry* 12: 1035-1038.

Ko KC., Rim SO., Han Y., Shin BS., Kim GJ., Choi JH., Song JJ. (2012) Identification and characterization of a novel cold-adapted esterase from a metagenomic library of mountain soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 39(5): 681-689.

Kovacic F., Mandrysch A., Poojari C., Strodel B., Jaeger KE. (2016) Structural features determining thermal adaptation of esterases. *Protein Engineering, Design and Selection* 29 (2): 65-76.

Kretza E., Papaneophytou CP., Papi RM., Karidi K., Kiparissides C., Kyriakidis DA. (2012) Lipase Activity in *Thermus thermophilus* HB8: Purification and Characterization of the Extracellular Enzyme. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17: 512-525.

Kulakova L., Galkin A., Nakayama T., Nishino T., Esaki N. (2004) Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp. Ant300: gene cloning, characterization, and the effects of Gly-->Pro substitution near the active site on its catalytic activity and stability. *Biochimica et Biophysica Acta* 1696: 59– 65.

Leo J.C., Grin I., Linke D. (2012) Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1592): 1088–1101.

Lee YS. (2016) Isolation and Characterization of a Novel Cold-Adapted Esterase, MtEst45, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *Frontiers in Microbiology* 7:218.

Margesin R. (2009) Extremophiles. Cold-Active Enzymes as New Tools in Biotechnology.

Minning S., Schmidt-Dannert C., Schmid RD. (1998) Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of Biotechnology* 66: 147–156.

Miyazawa T., Yukawa T., Ueji S., Yanagihara R., Yamada T. (1998) Resolution of 2-phenoxy-1-propanols by *Pseudomonas* sp. lipase-catalyzed highly enantioselective

transesterification: influence of reaction conditions on the enantioselectivity toward primary alcohols. *Biotechnology Letters* 20(3): 235–238.

Mohamad Ali MS., Mohd Fuzi SF., Ganasen M., Abdul Rahman RN., Basri M., Salleh AB. (2013) Structural Adaptation of Cold-Active RTX Lipase from *Pseudomonas* sp. Strain AMS8 Revealed via Homology and Molecular Dynamics Simulation Approaches. *BioMed Research International* 2013: 925373.

Mougous JD., Cuff ME., Raunser S., Shen A., Zhou M., Gifford CA., Goodman AL., Joachimiak G., Ordoñez CL., Lory S., Walz T., Joachimiak A., Mekalanos JJ. (2006) A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312: 1526–1530.

Novototskaya-Vlasova K., Petrovskaya L., Yakimov S., Gilichinsky D. (2012) *FEMS Microbiology Ecology* 82(2): 367-375.

Olędzka G., Dąbrowski S., Kur J. (2003) High-level expression, secretion, and purification of the thermostable aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 29: 223–229.

Olukoshi ER., Packter NM. (1994) Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces* : possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* 140: 931-943.

Petrovskaya LE., Novototskaya-Vlasova KA., Kryukova EA., Rivkina EM., Dolgikh DA., Kirpichnikov MP. (2015) Cell surface display of cold-active esterase EstPc with the use of a new autotransporter from *Psychrobacter cryohalolentis* K5(T). *Extremophiles* 19(1):161-170.

Perron-Savard P., De Crescenzo G., Le Moual H. (2005) Dimerization and DNA binding of the *Salmonella enterica* PhoP response regulator are phosphorylation independent. *Microbiology* 151: 3979–3987.

Rahman MA., Culsum U., Tang W., Zhang SW., Wu G., Liu Z. (2016) Characterization of a novel cold active and salt tolerant esterase from *Zunongwangia profunda*. *Enzyme and Microbial Technology* 85:1–11.

Ravichandran R., Parthiban R. (2000) Lipid occurrence, distribution and degradation to flavour volatiles during tea processing. *Food Chemistry* 68(1): 7-13.

Royter M., Schmidt M., Elend C., Hobenreich H., Schafer T., Bornscheuer UT., Antranikian G. (2009) Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *Tengcongensis*. *Extremophiles* 13:769–783.

Rutherford N., Mourez M. (2006) Surface display of proteins by Gram-negative bacterial autotransporters. *Microbial Cell Factories* 5:22.

Sambrook J., Russel D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Santiago M., Ramírez-Sarmiento CA., Zamora RA., Parra LP. (2016) Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Applications of Cold-Active Enzymes. *Frontiers in Microbiology* 7: 1408.

Saxena RK., Ghosh PK., Gupta R., Davidson WS., Bradoo S., Gulati R. (1999) Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science* 77: 101-115.

Shakiba MH., Ali MS., Rahman RN., Salleh AB., Leow TC. (2016) Cloning, expression and characterization of a novel cold-adapted GDSL family esterase from *Photobacterium* sp. strain J15 *Extremophiles* 20:45–55.

Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. C. (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627–662.

Suzuki T., Nakayama T., Kurihara T., Nishino T., Esaki N. (2002) A cold-active esterase with a substrate preference for vinyl esters from a psychrotroph, *Acinetobacter* sp. strain no. 6: gene cloning, purification, and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 255–263.

Sriyapai P., Kawai F., Siripoke S., Chansiri K., Sriyapai T. (2015) Cloning, Expression and Characterization of a Thermostable Esterase HydS14 from *Actinomadura* sp. Strain S14 in *Pichia pastoris*. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 13579-13594.

Suzuki T., Nakayama T., Choo DW., Hirano Y., Kurihara T., Nishino T., Esaki N. (2003) Cloning, heterologous expression, renaturation, and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp. strain B11-1. *Protein Expression and Purification* 30: 171–178.

Wang C-H., Guo R-F., Yu H-W., Jia Y-M. (2008) Cloning and Sequence Analysis of a Novel Cold-Adapted Lipase Gene from Strain lip35 (*Pseudomonas* sp.). *Agricultural Sciences in China* 7(10): 1216-1221.

Wang X., Sun Y., Ke F., Zhao H., Liu T., Xu L., Liu Y., Yan Y. (2012) Constitutive expression of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using GAP as promoter. *Applied biochemistry and biotechnology* 166(5): 1355-1367.

Wang G., Wang Q., Lin X., Ng TB., Yan R., Lin J., Ye X. (2016) A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium* sp. SL3 from the sediment of a soda lake. *Scientific reports* 26(6): 19494.

Wicka M., Wanarska M., Krajewska E., Pawlak-Szukalska A., Kur J., Cieśliński H. (2016) Cloning, expression, and biochemical characterization of a cold-active GDSL-esterase of a *Pseudomonas* sp. S9 isolated from Spitsbergen island soil. *Acta Biochemica Polonica* 63(1): 117-125.

Wilhelm S., Tommassen J., Jaeger KE. (1999) A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 181: 6977-6986.

Wilhelm S., Rosenau F., Kolmar H., Jaeger KE. (2011) Autotransporters with GDSL passenger domains: molecular physiology and biotechnological applications. *Chembiochem: european journal of chemical biology*. 12(10):1476-1485.

Wong DWS. (1995) *Food Enzymes: Structure and Mechanism* XVI, 6: 170-198.

Wongwatanapaiboon J., Malilas W., Ruangchainikom C., Thummadetsak G., Chulalaksananukul S., Marty A., Chulalaksananukul W. (2016) Overexpression of *Fusarium solani* lipase in *Pichia pastoris* and its application in lipid degradation. *Journal Biotechnology and Biotechnological Equipment* 30(5): 885-893.

Wu G., Wu G., Zhan T., Shao Z., Liu Z. (2013) Characterization of a cold-adapted and salt-tolerant esterase from a psychrotrophic bacterium *Psychrobacter pacificensis*. *Extremophiles* 17:809–819.

Wu G., Zhang S., Zhang H., Zhang S., Liu Z. (2013) A novel esterase from a psychrotrophic bacterium *Psychrobacter celer* 3Pb1 showed cold-adaptation and salt-tolerance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 98: 119– 126.

Wu G., Zhang X., Wei L., Wu G., Kumar A., Mao T., Liu Z. (2015) A cold-adapted, solvent and salt tolerant esterase from marine bacterium *Psychrobacter pacificensis*. International Journal of Biological Macromolecules 81:180–187.

Xin L., Hui-Ying Y. (2013) Purification and characterization of an extracellular esterase with organic solvent tolerance from a halotolerant isolate, *Salimicrobium* sp. LY19. BMC Biotechnology 13:108.

Yu M., Lange S., Richter S., Tan T., Schmid RD. (2007) High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. Protein Expression and Purification 53: 255–263.

Yu XW., Wang LL., Xu Y. (2009) *Rhizopus chinensis* lipase: Gene cloning, expression *Pichia pastoris* and properties. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 57: 304–311.

Yu S., Yu S., Han W., Yan Feng L. (2010) A novel thermophilic lipase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17B1 representing a new subfamily of bacterial lipases. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic 66(1): 81-89.

Zhang J, Lin S, Zeng R. (2007) Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted lipase gene from an antarctic deep-sea psychrotrophic bacterium, *Psychrobacter* sp 7195. Journal of microbiology and biotechnology 17(4): 604-610.

Zhu Y., Li J., Cai H., Ni H., Xiao A., Hou L. (2013) Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. Microbiological Research 168: 589–597.

