

STRESZCZENIE

Biokonwersja substancji toksycznych jest aktualnym problemem nowoczesnej biotechnologii, toksykologii, mikrobiologii oraz enzymologii praktycznej. Wśród takich niebezpiecznych związków są produkty przemysłowej działalności człowieka (ksenobiotyki) oraz toksyczne metabolity, wytwarzane przez mikroorganizmy w trakcie procesów biotechnologicznych.

Przykładami takich substancji są chromian (ksenobiotyk) oraz D-mleczan (naturalny metabolit).

W niniejszej pracy badano potencjał wykorzystania niekonwencjonalnych, termotolerancyjnych, metylotroficznych drożdży *Hansenula (Ogataea) polymorpha*, jako źródło flawoprotein: flawocytochromu b_2 i dehydrogenazy D-mleczanu, do detoksykacji D - mleczanu oraz chromianu. Enzymy te charakteryzują się absolutną stereospecyficznością do substratu (L- lub D-mleczanu, odpowiednio), nie posiadają natomiast, specyficznego akceptora elektronów *in vitro*.

Jako źródło enzymu dehydrogenazy D-mleczanu, drożdże *H. polymorpha* mogą posłużyć do specyficznego rozkładu tego metabolitu, będącego związkiem potencjalnie szkodliwym dla osób z grupy zwiększonego ryzyka. Drożdże rekombinowane, zdolne do nadsyntezy enzymu, mogą być tanią alternatywą dla konstruowania bioreaktorów komórkowych do biorozkładu D-mleczanu. Wykorzystanie do tego celu komórek szczepu rekombinowanego tr6 drożdży *H. polymorpha* (żywych oraz permabilizowanych, liofilizowanych), ze zwiększoną syntezą dehydrogenazy D-mleczanu i pozbawione aktywności oksydacyjnej względem L-mleczanu, umożliwiło oksydacyjną detoksykację D-mleczanu z wydajnością $9 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$.

D-mleczan to także prekursor, stosowany w wielu syntezach. Synteza tej odmiany enancjomerycznej kwasu mlekowego, w postaci czystej, jest nieporównalnie kosztowna. Rozwiązaniem tego problemu, może okazać się wykorzystanie metody enzymatycznej do specyficznego rozkładu L-odmiany enancjomeru zawartego w racemacie, bez zmiany D-izomeru. Zastosowanie oczyszczonego flawocytochromu b_2 z drożdży *H. polymorpha* umożliwiło otrzymanie D-mleczanu z racematu na drodze utleniania L-mleczanu, który jest specyficznym substratem dla wykorzystanego enzymu.

Ze względu na lokalizację wewnątrzkomórkową obu enzymów (mitochondria), oczyszczanie i zastosowanie ich w czystej postaci jest utrudnione. Z tego powodu, wciąż

aktualnym jest problem nadsyntezy tych enzymów za pomocą alternatywnych systemów ekspresyjnych, oraz zastosowanie podejść inżynierii białkowej w celu modyfikacji białek, ułatwiających ich izolację i oczyszczanie.

W tym celu, wykorzystano w pracy eukariotyczne i prokariotyczny system ekspresyjny do syntezy tych enzymów.

Zastosowano system, oparty na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, dla syntezy białka fuzyjnego, składającego się z połączenia białka yEGFP („*Yeast Enhanced Green Fluorescent Protein*”), dehydrogenazy D - mleczanu z drożdży *Hansenula polymorpha* oraz znacznika (His)₆-tag. Ekspymowane białko fuzyjne jest zdolne do fluorescencji w komórkach gospodarza ekspresyjnego, nie wykazuje, jednak, aktywności enzymatycznej, charakterystycznej dla dehydrogenazy D - mleczanu.

Natomiast, eukariotycznego układu sekrecyjny z użyciem drożdży *Kluyveromyces lactis* dla ekspresji pochodzącej z drożdży *Hansenula polymorpha* dehydrogenazy D-mleczanu powoduje sekrecję skróconej i nieaktywnej postaci enzymu.

Wykorzystanie prokariotycznego systemu ekspresyjnego opartego na bakteriiach *Escherichia coli* i wektorze plazmidowym z serii *pET32a* do IPTG-indukowanej ekspresji drożdżowego ORF *HpCYB2*, kodującego flawocytochrom *b*₂, daje w efekcie syntezę tego enzymu w postaci ciał inkluzyjnych. Fuzja białek znacznikowych - tioredoksyny (Trx), (His)₆-tag, S-tag z flawocytochromem *b*₂, zachowuje aktywność (16 J · mg⁻¹), enzymatyczną tego białka, po solubilizacji ciał inkluzyjnych w obecności 0,3% N-lauroilosarkozyny.

Do mikrobiologicznej bioremediacji chromianu zastosowano rekombinowane drożdże *H. polymorpha* tr1, wykazujące zwiększoną syntezę mitochondrialnej flawoproteiny, flawocytochromu *b*₂. Jak pokazały doświadczenia, enzym przyczynia się do wyższej aktywności bioremediacyjnej, względem chromianu, drożdży rekombinowanych w porównaniu do szczepu drożdży wyjściowych, na bazie których zostały skonstruowane. Szczep ten był zdolny do wydajnej (100%) bioremediacji redukcyjnej 1 mM chromianu. Natomiast, przy zastosowaniu czystej postaci enzymu, wykazano że Cr(VI) może bezpośrednio reagować ze zredukowaną postacią FC *b*₂, dzięki niespecyficznosci tego enzymu do akceptora elektronów *in vitro*, co skutkuje powstawaniem formy Cr(III). Wyselekcjonowany barwnik o aktywności redoks, dichlorofenoloindofenol, znacznie przyczynia się do zwiększonej aktywności bioremediacyjnej względem chromianu zarówno

oczyszczonej postaci enzymu oraz komórek drożdży *H. polymorpha* (żywych bądź permabilizowanych, liofilizowanych).

Wykazano ponadto, że drożdże *H. polymorpha* tr1 posiadają zdolność do zewnątrzkomórkowej redukcji toksycznego chromianu i chelatacji chromu(III), czego wynikiem było powstawanie biokompleksów Cr(III) w podłożu hodowlanym. Jak wykazała analiza fizyko-chemiczna, wyizolowane biokompleksy Cr(III) składają się przynajmniej z dwóch komponentów, w tym białkowego. Wyraźnie pochłaniają światło w zakresie UV posiadając piki absorpcji 275 i 325 nm oraz słabsze przy 580 i 975 nm. Biokompleksy te fluoryzują również na zielono. Posiadają także właściwości antyoksydacyjne ($9,9 \div 21,9 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Cr}$) w testach z ABTS i jonami żelaza(III).

Otrzymane bio-kompleksy Cr(III) wykazują pozytywną biologiczną aktywność w badaniach fizjologicznych z użyciem szczurów jako modelu badawczego: spowodowały obniżenie poziomu glukozy we krwi zwierząt, nie wykazując działania toksycznego (w teście na aktywność aminotransferaz ALAT i AST).