

mgr inż. Piotr Hildebrandt

Konstrukcja rekombinantowego szczepu drożdży
Saccharomyces cerevisiae produkującego
zewnętrzkomórkowo zaadaptowaną do zimna β -D-
galaktozydazę, zdolnego do wydajnej produkcji
etanolu z laktozy zawartej w serwatce

promotor: prof. dr hab. Józef Kur

Katedra Mikrobiologii

Wydziału Chemicznego

Politechniki Gdańskiej

Gdańsk 2010

*Składam serdeczne podziękowania mojemu
promotorowi Panu Profesorowi Józefowi Kur
za opiekę i pomoc podczas wykonywania
i redagowania niniejszej pracy.*

*Koleżankom i Kolegom z Katedry Mikrobiologii
dziękuję za przyjazną atmosferę i okazaną pomoc.*

*Dziękuję również swojej ukochanej żonie
za wyrozumiałość i pomoc w realizacji marzeń.*

Rodzinie

Spis treści

1.	STRESZCZENIE	9
2.	CEL PRACY	13
3.	WSTĘP TEORETYCZNY	14
3.1.	Biopaliwa	14
3.2.	Bioetanol	16
3.2.1.	Surowce do produkcji bioetanolu	17
3.2.1.1.	Zboża i surowce tradycyjne	18
3.2.1.2.	Trzcina cukrowa	19
3.2.1.3.	Serwatka	20
3.2.1.4.	Celuloza	21
3.3.	Wykorzystanie serwatki do produkcji etanolu	22
3.4.	Rekombinantowe szczepy <i>S. cerevisiae</i> do produkcji etanolu z serwatki	23
3.5.	β-D-galaktozydazy	24
3.6.	Metody immobilizacji enzymów	25
3.7.	Immobilizacja β-D-galaktozydaz	27
3.8.	Inhibicja β-D-galaktozydaz a immobilizacja	29
3.9.	Produkcja zewnątrzkomórkowa białek w oparciu o komórki rekombinantowych drożdży	30
3.10.	Permeazy dwucukru laktozy i maltozy	31
3.11.	Metabolizm galaktozy u <i>S. cerevisiae</i>	32
4.	MATERIAŁY I METODY	34
4.1.	Szczepy bakteryjne	34
4.2.	DNA plazmidowe	34
4.3.	Pożywki i podłoża	35
4.4.	Dodatkowe składniki do pożywek i podłoży	36
4.5.	Hodowla mikroorganizmów	37
4.6.	Oczyszczanie DNA	37
4.6.1.	Izolacja DNA genomowego	37
4.6.2.	Izolacja DNA plazmidowego	37
4.6.3.	Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego	37
4.6.4.	Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych	38
4.7.	Oznaczanie stężenia DNA	38
4.8.	Elektroforetyczny rozdział	38
4.8.1.	DNA w żelu agarozowym	38
4.8.2.	Białek	39
4.8.2.1.	Warunki natywne	39
4.8.2.2.	Warunki denaturujące	40
4.9.	Amplifikacja fragmentów DNA z zastosowaniem techniki PCR	42
4.10.	Sekwencjonowanie DNA plazmidów rekombinantowych	43
4.11.	Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	44
4.12.	Reakcja ligacji fragmentów DNA	45
4.12.1.	Klonowanie produktów PCR w wektorze pCRZeroBlunt	45

4.12.2.	Klonowanie fragmentów DNA	46
4.12.3.	Biblioteka DNA	46
4.13.	Precypitacja DNA	46
4.14.	Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i>.	47
4.15.	Transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i> plazmidowym DNA	47
4.16.	Otrzymanie plazmidów rekombinantowych pSach424-α-gal22b, pSach424-STA2-gal22b oraz pSach424-PHO5-gal22b	47
4.17.	Konstrukcja plazmidów rekombinantowych pPICZalfa-gal22b, pPICZ-STA2-gal22b oraz pPICZ-PHO5-gal22b	48
4.18.	Transformacja komórek kompetentnych <i>S. cerevisiae</i> plazmidowym DNA	50
4.19.	Transformacja komórek kompetentnych <i>P. pastoris</i> plazmidowym DNA	50
4.20.	Izolacja szczepów psychrotrofowych z gleby antarktycznej produkujących β-D-galaktozydazę	50
4.21.	Izolacja białek natywnych z komórek bakterii psychrotrofowych	50
4.22.	Określenie aktywności biochemicznej szczepu 32c	51
4.23.	Charakterystyka wzrostu szczepu psychrotrofowego 32c	51
4.24.	Hybrydyzacja 2 produktów PCR celem wykształcenia lepkiego końca	51
4.25.	Konstrukcja plazmidu rekombinantowego pBADMyHisA-gal32c	51
4.26.	Ekspresja genu β-D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	52
4.27.	Konstrukcja plazmidów rekombinantowych pPICZalfa-gal32c i pGAPZalfa-gal32c	53
4.28.	Produkcja β-D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c przez drożdże <i>P. pastoris</i> GS11554	
4.28.1.	Optymalizacja produkcji β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c przez drożdże <i>P. pastoris</i> GS115 w układzie konstytutywnym	55
4.29.	Oznaczanie aktywności β-D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	55
4.30.	Liofilizacja	57
4.31.	Oczyszczanie β-D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	57
4.32.	Oczyszczanie β-D-galaktozydazy z płynu pochodowlanego metodą wysalania białek	58
4.33.	Bradford	59
4.34.	Sączenie molekularne	59
4.35.	Konstrukcja plazmidu YIpDCE1-gal1-ura3-gal2	60
4.36.	Test fermentacyjny szczepu zaadaptowanego do jednoczesnego metabolizmu glukozy i galaktozy	61
4.37.	Konstrukcja plazmidów rekombinantowych pSach424-sekw.sygn-gen-β-D-galaktozydazy do zewnątrzkomórkowej produkcji β-D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c przez <i>S. cerevisiae</i>	61
4.38.	Hodowla rekombinantowych szczepów <i>S. cerevisiae</i> na pożywce YDO-TRP	63
4.39.	Analiza frakcji wewnątrz i zewnątrzkomórkowej po ekspresji genu β-D-galaktozydazy w rekombinantowych drożdżach <i>S. cerevisiae</i>	63
4.40.	Konstrukcja plazmidu YIpDCE1-kex2-gal32c	63
4.41.	Test płytkowy sekrecji β-D-galaktozydazy	64
4.42.	Ferementacja alkoholowa:	65
4.42.1.	z wykorzystaniem szczepów rekombinantowych <i>S. cerevisiae</i> konstytutywnie produkujących zewnątrzkomórkowo β -D-galaktozydazę <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	65
4.42.2.	z wykorzystaniem konsorcjum mikroorganizmów <i>S. cerevisiae</i> oraz <i>P. pastoris</i> pGAPZ α β -gal32c	65

4.43.	Analiza HPLC	65
4.44.	Konstrukcja plazmidu YlpDCE1 PsLac-gal32c	66
4.45.	Konstrukcja plazmidu YlpDCE1-mal61-gal32	66
4.46.	Fermentacja alkoholowa laktozy z zastosowaniem dodatku β-D-galaktozydaz	67
4.47.	Przygotowanie złoża chitozanowego do immobilizacji	68
4.48.	Immobilizacja β-D-galaktozydaz	68
4.49.	Fermentacja alkoholowa laktozy z wykorzystaniem immobilizowanych β-D-galaktozydaz	69
5.	WYNIKI	70
5.1.	Konstrukcja szczepów <i>S. cerevisiae</i> ekspresujących gen β-D-galaktozydazy <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b	71
5.2.	Poszukiwanie nowej β-D-galaktozydazy	72
5.2.1.	Izolacja szczepów psychrotrofowych z gleby antarktycznej produkujących β -D-galaktozydazę	72
5.2.2.	Charakterystyka oraz oznaczanie przynależności gatunkowej szczepu 32c	73
5.2.3.	Izolacja genu kodującego β -D-galaktozydazę <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	77
5.2.4.	Produkcja rekombinantowej β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	77
5.2.4.1.	Konstrukcja układów do produkcji rekombinantowej β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	77
5.2.4.1.1.	Układ bakteryjny	77
5.2.4.1.2.	Układ drożdżowy	77
5.2.4.2.	Ekspresja genu beta-D-galaktozydazy	78
5.2.4.2.1.	Układ bakteryjny	78
5.2.4.2.2.	Układ drożdżowy	78
	a) Układ indukowany metanolem	78
	b) Układ konstytutywny	78
	c) Optymalizacja produkcji enzymu przy wykorzystaniu konstytutywnego układu ekspresyjnego	78
5.3.	Ekspresja i oczyszczanie β-D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c w zależności od układu ekspresyjnego – porównanie otrzymanych wyników	79
5.4.	Charakterystyka biochemiczna β-D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	82
5.4.1.	Sączenie molekularne	82
5.4.2.	Badanie aktywności	83
5.4.2.1.	Badanie wpływu temperatury i pH środowiska reakcji na aktywność hydrolityczną enzymu	83
5.4.2.2.	Badanie wpływu jonów metali i EDTA na aktywność hydrolityczną enzymu	84
5.4.2.3.	Badanie wpływu związków tiolowych na aktywność hydrolityczną enzymu	85
5.4.2.4.	Badanie wpływu stężenia etanolu na aktywność enzymu	86
5.4.2.5.	Określenie parametrów kinetycznych otrzymanej β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c reakcji rozkładu laktozy i ONPG,	86
5.5.	Konstrukcja szczepu drożdży <i>S. cerevisiae</i> w celu produkcji etanolu z laktozy zawartej w serwatce	89
5.5.1.	Konstrukcja szczepu <i>S. cerevisiae</i> zaadaptowanego do jednoczesnego metabolizmu galaktozy i glukozy z pożywki	90
5.5.2.	Wybór sekwencji liderowej do zewnątrzkomórkowej produkcji β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c	91

SPIS TREŚCI

5.5.2.1.	Ocena przydatności szczepów <i>S. cerevisiae</i> BMA64-1A, <i>S. cerevisiae</i> BMA64-1A-G1-G2 oraz <i>S. cerevisiae</i> BMA64-1A-G1-G2-K2-gal32c do produkcji etanolu z laktozy	91
5.5.1.	Konstrukcja szczepu <i>S. cerevisiae</i> produkującego wewnątrzkomórkowo β -D-galaktozydazę <i>Arthrobacter</i> sp. 32c oraz permeazę disacharydu	92
5.6.	Analiza wydajności produkcji etanolu z laktozy z wykorzystaniem preparatu enzymatycznego β-D-galaktozydazy <i>K. lactis</i> oraz szczepów rekombinantowych.	93
5.7.	Otrzymanie β-D-galaktozydaz w postaci unieruchomionych na chitozanie	94
5.8.	Fermentacja alkoholowa z wykorzystaniem imobilizowanych enzymów	95
6.	<u>PODSUMOWANIE</u>	<u>98</u>
7.	<u>DOROBEK NAUKOWY</u>	<u>100</u>
8.	<u>LITERATURA</u>	<u>103</u>

Wykaz Tabel:

Tabela 1. Porównanie właściwości paliw płynnych ¹² .	16
Tabela 2. Surowce oraz teoretyczne wydajności produkcji Et-OH ^{19; 20} .	18
Tabela 3. Zawartość celulozy, hemicelulozy i ligniny w różnych materiałach roślinnych ^{30; 31; 32} .	21
Tabela 4. β -D-galaktozydazy zaadaptowane do zimna i najczęściej charakteryzowane mezofilne odpowiedniki.	25
Tabela 5. β -D-galaktozydazy immobilizowane na różnych nośnikach stosowane w procesach ⁵⁹ .	28
Tabela 6. Parametry reakcji PCR	43
Tabela 7. Enzymy restrykcyjne wykorzystywane w badaniach.	44
Tabela 8. Zdolność produkcji β -D-galaktozydazy <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b przez drożdże <i>S. cerevisiae</i> oraz <i>P. pastoris</i> .	72
Tabela 9. Wydajność produkcji β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c w oparciu o układ konstytutywnej biosyntezy enzymu w komórkach drożdży metylotroficznych <i>P. pastoris</i> .	79
Tabela 10. Oczyszczanie rekombinantowej β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c.	81
Tabela 11. Aktywność względna enzymu w obecności jonów metali.	85
Tabela 12. Wpływ związków zawierających grupy tiolowe na aktywność hydrolityczną β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c.	85
Tabela 13. Aktywność β -D-galaktozydazy <i>Arthrobacter</i> sp. 32c wobec chromogennych substratów.	87
Tabela 14. Parametry kinetyczne katalizy reakcji hydrolizy ONPG oraz laktozy przez β -D-galaktozydazę <i>Arthrobacter</i> sp. 32c.	88
Tabela 15. Wynik testów fermentacyjnych.	92
Tabela 16. Steżenie laktozy i etanolu w czasie fermentacji laktozy przez szczepy drożdży.	93
Tabela 17. Stężenia związków chemicznych w płynie pofermentacyjnym.	94
Tabela 18. Wynik testów aktywności preparatów enzymatycznych.	95
Tabela 19. Szczepy drożdży skonstruowane w ramach badań do produkcji zewnątrzkomórkowej β -D-galaktozydaz.	99

1. STRESZCZENIE

1. Streszczenie

Etanol jest jednym z najważniejszych produktów przemysłu biotechnologicznego zarówno ze względu na cenę, jak i wielkość produkcji. Bioetanol - odwodniony alkohol etylowy otrzymywany z produktów roślinnych (zboża, ziemniaki, buraki cukrowe itp.), może być stosowany jako paliwo samochodowe samo w sobie, w specjalnie przystosowanych silnikach lub mieszany z benzyną. Alkohol etylowy może być również przetwarzany na ETBE (eter etylo-tert-butyłowy), który stanowi dodatek do benzyny. Do światowych liderów stosowania biopaliw (paliw zawierających powyżej 5% biokomponentu, np. bioetanolu czy ETBE) w transporcie zalicza się Brazylię i USA. W krajach Unii Europejskiej kładzie się obecnie również ogromny nacisk na wspieranie użycia w transporcie paliw z udziałem biokomponentów. Głównym parametrem determinującym opłacalność produkcji etanolu jest koszt surowca podlegającego fermentacji. Tanim surowcem może być laktoza zawarta w serwatce, ubocznym produkcie przemysłu mleczarskiego. Obecnie światowa produkcja serwatki szacowana jest na ponad 145 mln ton rocznie i tylko połowa z niej jest przetwarzana, natomiast reszta traktowana jest jako odpad. Zagospodarowanie serwatki jako surowca do produkcji bioetanolu przyniosłoby podwójną korzyść w postaci obniżenia kosztów produkcji alkoholu oraz ochrony środowiska naturalnego. Szczepy *Saccharomyces cerevisiae*, stosowane do produkcji etanolu, nie są jednak zdolne do bezpośredniej fermentacji laktozy.

Celem finalnym prowadzonych badań jest skonstruowanie rekombinantowego szczepu *S. cerevisiae*, zdolnego do wydajnej produkcji etanolu z zawartej w serwatce laktozy, mogącego znaleźć zastosowanie jako składnik biopaliwa. Przeprowadzone badania wykazały, że sekrecja β -D-galaktozydaz w komórkach *Pichia pastoris* i *Saccharomyces cerevisiae* nie zachodzi z identyczną wydajnością. Najprawdopodobniej jednym z parametrów decydujących o dobrej sekrecji białek zawierających w postaci fuzji translacyjnej sekwencję α -faktora na N-końcu polipeptydu, w przypadku drożdży *S. cerevisiae* jest poziom ekspresji genu endopeptydazy Kex2, obecność jonów Ca^{2+} oraz specyfika samej endopeptydazy. Otrzymany szczep rekombinantowych drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A zdolny do sekrecji β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c wykazywał niski poziom produkcji zewnątrzkomórkowej enzymu, prawdopodobnie ze względu na zbyt silną ekspresję endopeptydazy Kex2 *P. pastoris*. Analiza biochemiczna β -

1. STRESZCZENIE

D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c wykazała, że mimo atutu enzymu przejawiającego się w niskiej masie cząsteczkowej oraz korzystnego profilu aktywności pod względem temperatury i pH środowiska, enzym niestety ulega silnej inhibicji glukozą, co zaburza metabolizm laktozy przez szczep rekombinantowych drożdży *S. cerevisiae* produkujących na niskim poziomie ten enzym zewnątrzkomórkowo. Zwiększenie produktywności enzymu przez szczep mogłoby prawdopodobnie usunąć problem. Przeprowadzone testy fermentacyjne wykazały, że poziom produkcji etanolu w różnych stosowanych wariantach: homogennej hodowli drożdży *S. cerevisiae* zewnątrzkomórkowo produkujących β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c, jak również w przypadku konsorcjum organizmów *P. pastoris* zewnątrzkomórkowo produkującej wspomnianą β -D-galaktozydazę i szczepów *S. cerevisiae* nie stanowią obecnie dobrego rozwiązania produkcji etanolu z laktozy. Nie mniej jednak otrzymane wyniki świadczące o zwiększonej zdolności produkcji etanolu z laktozy przez szczepy rekombinantowe konstytutywnie ekspresyjujące geny *gal1* i *gal2* (*S. cerevisiae*) w stosunku do szczepu laboratoryjnego, w przypadku stosowania preparatu enzymatycznego technicznej β -D-galaktozydazy *K. lactis*, sugerują rozwiązanie polegające na stosowaniu biokatalizatora unieruchomionego w postaci β -D-galaktozydazy lub bardziej korzystnie pod względem opłacalności procesu, wewnątrzkomórkowej produkcji enzymu wraz z zastosowaniem odpowiedniej permeazy laktozy (bądź analogu, np. zmutowanej permeazy maltozy).

1. ABSTRACT

Ethanol is one of the most important products of the biotechnology industry in terms of both: price and volume of production. Bioethanol - dehydrated ethyl alcohol derived from vegetable products (cereals, potatoes, sugar beets, etc.) can be used as motor fuel in itself in specially adapted engines or blended with gasoline. Ethyl alcohol can also be converted into ETBE (ethyl tertiary butyl ether), which is a gasoline additive. The world's leaders in biofuels production (fuels containing more than 5% bio-component, such as bioethanol and ETBE) are Brazil and the USA. In the European Union it is now also placed great emphasis on promoting the use of transportation fuels with bio-components. The main parameter that determines the profitability of ethanol production is cost of raw materials for the fermentation process. A cheap material may be lactose that is present in whey, the dairy industry by-product. Currently, worldwide production of whey is estimated at 145 million tonnes per year and only half of it is processed, while the rest is treated as waste. Use of whey as a raw material for bioethanol production would benefit in reducing the cost of alcohol production and in environmental protection. However *Saccharomyces cerevisiae* strains mostly used in the production of ethanol, are not capable of direct fermentation of lactose.

The ultimate objective of this study was to construct a recombinant *S. cerevisiae* strain capable of efficient production of ethanol from lactose from whey, which could be used as an ingredient in biofuels. The study showed that the secretion of β -D-galactosidase by the cells of *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae* does not occur with the same efficiency. Probably one of the parameters determining a high secretion level of proteins, containing translational fusion with α -factor sequence at the N-terminus of the polypeptide, is the level of *kex2* endopeptidase expression, the presence of Ca^{2+} and the specificity of the endopeptidase by processing of the fusion protein. The resulting *S. cerevisiae* BMA64-1A recombinant strain able to secrete *Arthrobacter* sp. 32c β -D-galactosidase showed low ability in extracellular enzyme production, probably due to too high expression of the *P. pastoris* Kex2 endopeptidase. Biochemical analysis of β -D-galactosidase of *Arthrobacter* sp 32c showed that although asset enzyme manifested in low molecular weight and a favorable profile of activity in terms of temperature and pH, unfortunately is strongly inhibited by glucose, which interferes with the metabolism of lactose by the said recombinant strain. Increasing the productivity of the enzyme by the strain could probably fix the problem. Fermentation tests carried out showed that the

1. ABSTRACT

level of ethanol obtained from lactose in different fermentation variants: homogeneous culture of *S. cerevisiae* extracellularly producing *Arthrobacter* sp. 32c β -D-galactosidase, as well as in the case of a consortium of organisms *P. pastoris* extracellularly producing said β -D-galactosidase and a *S. cerevisiae* strain, are not a good solution out of the production of ethanol from lactose. Nevertheless, in the case of the use of technical *K. lactis* β -D-galactosidase the results showing an increased ability of the ethanol production from lactose by a recombinant strain constitutively expressing *gal1* and *gal2* genes (*S. cerevisiae*), suggests a solution for the use of immobilized biocatalyst in the form of β -D-galactosidase, or more preferably, in terms of cost-effectiveness of the process, the intracellular enzyme production, together with the lactose permease or an analog, such as mutated maltose permease.

2. CEL PRACY

2. Cel pracy

Celem pracy było skonstruowanie rekombinantowych szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* produkujących zewnątrzkomórkowo zaadaptowaną do zimna β -D-galaktozydazę oraz w oparciu o skonstruowane szczepy, analiza możliwości wytworzenia nowej i wydajnej biotechnologii produkcji etanolu z laktozy zawartej w serwatce.

3. Wstęp teoretyczny

3.1. Biopaliwa

W odróżnieniu od ropy naftowej oraz gazu ziemnego, których zasoby ulegają bezpowrotnym zmniejszeniu, biopaliwa uznaje się za odnawialne źródła energii. Zgodnie z dyrektywą 2003/30/WE Parlamentu Europejskiego biopaliwo to płynne lub gazowe paliwo wyprodukowane z biomasy służące do napędu środków transportu. Do biopaliw zaliczono bioetanol, biobutanol, biodiesel, biogaz, biometanol, biodimetyloeter, bio-ETBE (eter etylowo-tert-butyłowy produkowany na bazie bioetanolu), bio-MTBE (eter metylowo-tert-butyłowy produkowany na bazie biometanolu), biopaliwa syntetyczne (olej napędowy uzyskiwany w technologii BTL – Biomass to Liquid), biowodór oraz olej roślinny.

W zależności od źródła węgla przetwarzanego do biopaliwa wyróżnia się trzy generacje biopaliw: pierwszą – do której produkcji wykorzystuje się rośliny mające zastosowanie również w przemyśle spożywczym, drugą – do której produkcji wykorzystuje się rośliny, które nie mają zastosowania w przemyśle spożywczym oraz trzecią – zakładającą wykorzystanie alg morskich jako źródła węglowodanów.

I Generacja biopaliw

- ETBE Ethyl Tertiary Butyl Ether - powstający w wyniku syntezy z etanolu oraz izobutyleny. Jest częściowo biopaliwem ze względu na izobutyl. ETBE stosowany jest jako dodatek do benzyn w celu polepszenia charakterystyki spalania.
- SVO Straight Vegetable Oils– olej roślinny.
- Biogas - biometan CH₄ (65-70%) oraz CO₂ (30-35%) o niewielkiej zawartości innych gazów, powstaje w wyniku beztlenowego rozkładu odpadów pochodzenia organicznego.
- Bioetanol – etanol z przeznaczeniem jako biopaliwo.
- Biodiesel - olej roślinny albo zwierzęcy poddany uwodornieniu lub estryfikacji (FAME – Fatty Acid Metyl Ester).

II Generacja biopaliw

- Butanol – alkohol produkowany na drodze tradycyjnej fermentacji ABE przy wykorzystaniu szczepów Clostridium; na chwilę obecną technologia nieoptymalna¹; 2; 3; 4; 5. Butanol może być pozyskiwany również z odpadów ligninocelulozowych⁶.
- Wodór – gaz mogący być produkowany na drodze fermentacji w obecności światła –fotofermentacja lub przy braku oświetlenia (ciemna fermentacja). Trwają prace nad intensyfikacją produkcji biowodoru przez bakterie⁷.
- Bioelektryczność – uzyskiwanie prądu w fabrykach CHP (Combined Heat and Power plants), BIG-GT (Biomass integrated combined cycle gasification gas turbine technology) lub też przy stosowaniu założeń BECS (Bioenergy and Carbon Storage)⁸.
- Biooleje – substancje pozyskiwane na drodze inowacyjnego procesu pirolizy oraz termochemicznej konwersji szerokiego wachlarza rodzaju biomasy (odpady drzewne, słoma, odpady ligninocelulozowe, odpady pochodzenia organicznego).
- Bio-SNG (Synthetic Natural Gas) – metan produkowany na drodze zgazowania odpadów celulozowych⁹.
- BioDME – dodatek do diesla otrzymywany z metanolu lub bezpośrednio z syngazu.
- Etanol – etanol pozyskiwany z odpadów celulozowych¹⁰.
- BtL (synfuels) – biopaliwa uzyskiwane z biomasy na drodze reakcji termochemicznych.
- Inne: pochodne furanu, HMF (5-hydroxymetylfurfural), GVL gamma-valerolactone¹¹.

III Generacja biopaliw

Biopaliwa III generacji stanowią paliwa dla silników samochodowych oraz paliwa dla silników odrzutowych. Zgodnie z założeniami źródłem węglowodanów dla biopaliw tej generacji mają być glony i wodne biomasy. Niewątpliwą zaletą biopaliw III generacji jest uzyskiwanie wysokich plonów biomasy, powszechna dostępność, zdolność wychwytywania CO₂ oraz brak lub bardzo ograniczone zapotrzebowanie na grunty rolne.

Tabela 1. Porównanie właściwości paliw płynnych ¹².

	Silniki Diesel				Silniki typu Otto				
	Diesel	Bio-diesel	DME	F-T diesel	Benzyna	Etanol	ETBE	Metanol	MTBE
Wzór chemiczny	C ₁₂ H ₂₆	Estry metylowe	CH ₃ O-CH ₃	Parafiny	C ₈ H ₁₈	C ₂ H ₅ OH	C ₄ H ₉ -OC ₂ H ₅	CH ₃ OH	C ₄ H ₉ -OCH ₃
Liczba Cetan	50	54	55-60	>74	8	11		5	
Liczba Octan	-	-	-	-	86	92	105	92	100
Gęstość [kg/l]	0,84	0,88	0,67	0,78	0,75	0,8	0,74	0,79	0,74
LHV [MJ/kg 15°C]	42,7	37,3	28,4	44	41,3	26,4	36	19,8	35,2

Bioetanol stanowi przy szerokiej różnorodności alternatywnych biopaliw najbardziej zrównoważone rozwiązanie, przejawiające się w:

- łatwości pozyskiwania,
- parametrach fizyko-chemicznych zbliżonych do parametrów paliw kopalnych.

3.2. Bioetanol

Produkcja etanolu zajmuje czołowe miejsce w rankingu produktów przemysłu biotechnologicznego. Tak wysoki poziom wytwarzania alkoholu wynika z faktu wysokiego popytu na produkt do zastosowań spożywczych oraz wynikającego z uregulowań prawnych, ciągle rosnącego popytu w przemyśle petrochemicznym, gdzie etanol stosowany jest jako dodatek do paliw. Obecnie etanol pozyskuje się na drodze fermentacji alkoholowej prowadzonej przez drożdże *S. cerevisiae* ze zbóż czy kukurydzy ¹³, z wykorzystaniem bakterii *Zymomonas mobilis* z trzciny cukrowej ^{14; 15}, czy też stosując szczep drożdży *Kluyveromyces marxianus* z serwatki ^{16; 17; 18}. Produkcja etanolu ze zbóż czy kukurydzy z wykorzystaniem szczepów drożdży *S. cerevisiae* jest stosunkowo drogą technologią, głównie z powodu ceny surowca oraz cen enzymów takich jak proteazy i alfa-amylazy, koniecznych do przeprowadzenia efektywnego słodowania. Ponadto, ze względu na wymagania biochemiczne stosowanych enzymów, etap słodowania prowadzony jest 3-etapowo w temperaturze 50, 90 i 90°C, co dodatkowo zwiększa nakłady energetyczne procesu. Kluczowe nakłady energetyczne stanowi etap mieszania po kleikowaniu skrobi, co jest istotną wadą tego surowca. W przypadku pozyskiwania etanolu z substratów odpadowych, jak np. z serwatki, przy wykorzystaniu drożdży *Kluyveromyces marxianus*, ze

względu na niski poziom produkcji etanolu wynikający z braku osmotolerancyjności drożdży i ich braku odporności na wysokie stężenie produktu fermentacji alkoholowej, proces charakteryzuje się niskim współczynnikiem opłacalności produkcji¹⁸.

Zastosowanie rekombinantowych drożdży *S. cerevisiae* produkujących zewnątrzkomórkowo β -D-galaktozydazę, wykazującą optymalną aktywność w warunkach prowadzenia fermentacji alkoholowej, zredukowanie kosztów związanych z pozyskaniem taniego surowca jakim jest laktoza zawarta w serwatce, zredukowanie nakładów energetycznych na przygotowanie surowca do fermentacji i obniżenie kosztów związanych z rektyfikacją ze względu na uzyskanie wyższego stężenia etanolu w mieszaninie pofermentacyjnej powinno pozwolić na efektywne wykorzystanie odpadowej serwatki do bardzo opłacalnej produkcji etanolu dla biopaliw.

3.2.1. Surowce do produkcji bioetanolu

Bioetanol może być otrzymywany z wielu różnych surowców. Historycznie najstarszym surowcami do produkcji etanolu są owoce oraz warzywa, wykorzystywane również jako pożywienie. Wydajność produkcji etanolu zmienia się wraz z rodzajem stosowanego surowca, Tabela 2. Obecnie najlepszym substratem do produkcji etanolu jest trzcina cukrowa. Niestety ze względu na dość duże wymagania środowiskowe dla wzrostu tej rośliny, jej wykorzystanie ograniczone jest do krajów okołorównikowych, jak np. Brazylia i Meksyk.

Tabela 2. Surowce oraz teoretyczne wydajności produkcji Et-OH^{19; 20}.

Surowiec	Wydajność produkcji Et-OH z 1 kg surowca [L/kg]	m ³ Et-OH/ha	Koszt surowca [PLN/L Et-OH]
Kukurydza	0,52	Bd	1,06
Przenica	0,55	0,5 – 2,0	1,25-1,58
Jęczmień	0,41	0,9 – 2,5	1,00-1,07
Sorgo	0,52	3,0 – 5,0	0,66-0,99
Owies	0,42	bd	1,31
Ryż	0,57	bd	2,72-3,96
Kasawa	0,45	1,5 – 6,0	2,31
Trzcina cukrowa	0,079	3500 – 5000	0,53
Buraki cukrowe	0,097	2500 – 3000	0,99-1,32
Melasa	0,28	nd	1,24
Ziemniaki	bd	1,2 – 2,7	2,64-2,97
Serwatka	0,028-0,037	nd	bd
Serwatka 3x zag.	0,084-0,11	nd	0,91-1,19
Serwatka w proszku	1,06	nd	2,93

Legenda: nd – nie badano; bd – brak danych

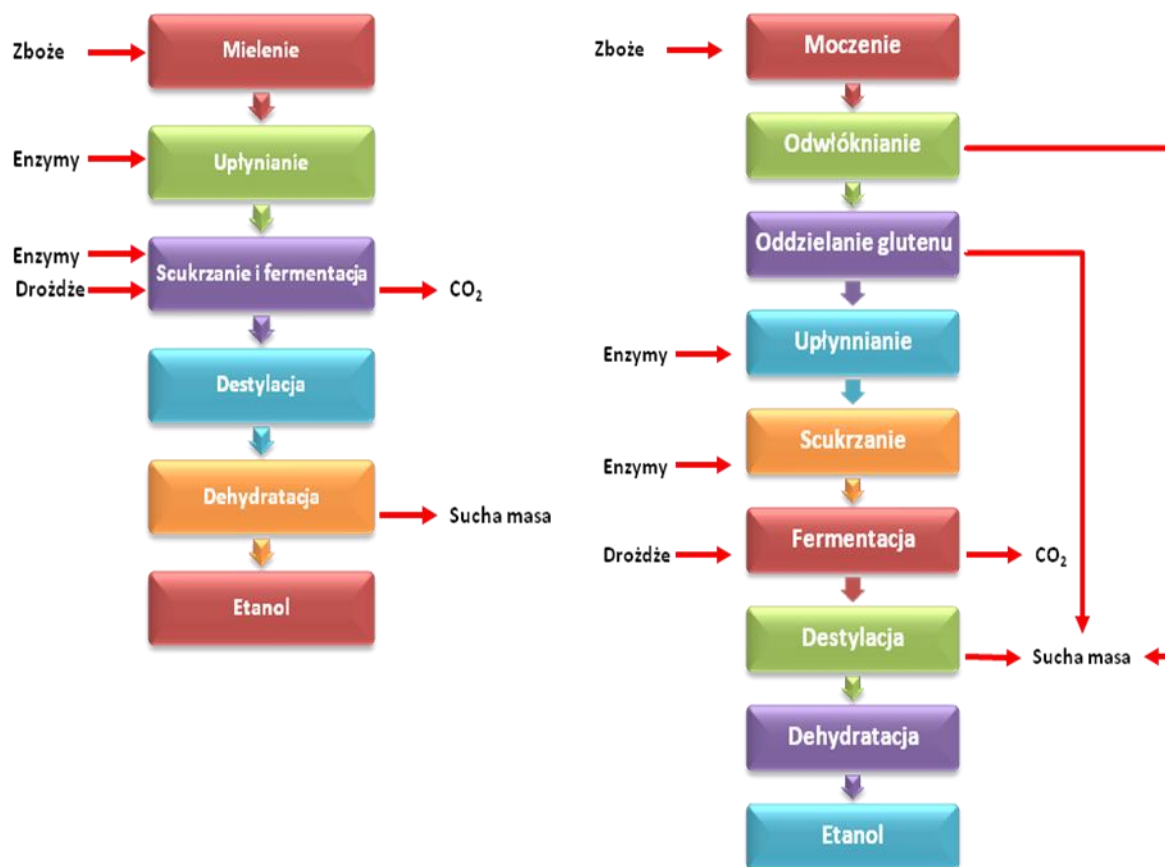
3.2.1.1. Zboża i surowce tradycyjne

Obecnie większość etanolu otrzymywanego ze zboża jest pozyskiwana na drodze suchego słodowania, ukierunkowanego na intensyfikację wydajności produkcji etanolu z kilograma surowca. Jedynie około $\frac{1}{3}$ etanolu uzyskiwanego ze zboża otrzymywana jest na drodze mokrego mielenia ziarna z wykorzystaniem separacji substancji o znaczeniu przemysłowym, jak np. gluten.

Proces wykorzystujący mielenie na mokro, pozwalający na izolacje dodatkowych produktów jest bardziej energochłonny, a inwestycja konieczna do wprowadzenia technologii większa niż w przypadku pozyskiwania etanolu ze zboża na sucho. Technologia na mokro pozwala na uzyskanie wysokowartościowego produktu do skarmiania zwierząt. Cukrem poddawanym fermentacji w obu przypadkach jest skrobia, która składa się z glukozy połączonej wiązaniem alfa 1,4 oraz w mniejszym stopniu wiązaniami alfa 1,6. W wyniku ogrzewania skrobi z wodą poddaje się polimer degradacji przy zastosowaniu alfa-amylaz, głównie termostabilnych pozwalających na zredukowanie lepkości mieszaniny w pH=6,0. Alfa amylaza umożliwia otrzymanie dekstryn zbudowanych z glukozy, które następnie są upłynniane do glukozy przy wykorzystaniu glukoamylaz już w temperaturze prowadzenia fermentacji alkoholowej 30-38°C, przy pH=4,5. Obecnie technologie

fermentacji skrobi do etanolu pozwalają na uzyskanie ok. 500 ml etanolu z 1 kg zboża,

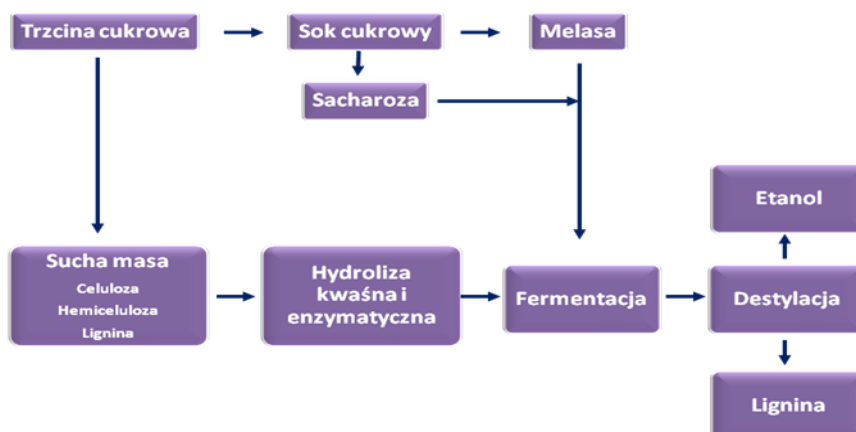
Tabela 2.



Rys. 1. Schemat poglądowy produkcji etanolu ze zboża ¹³.

3.2.1.2. Trzcina cukrowa

Trzcina cukrowa jest rośliną szeroko wykorzystywaną do produkcji cukru spożywczego oraz etanolu w strefie tropikalnej (głównie Brazylia). Roślina składa się z 10-15% sacharozy oraz 13% suchej masy. Produkcja etanolu z trzciny cukrowej przebiega prawie bezodpadowo. Z trzciny cukrowej otrzymuje się sok cukrowy zawierający sacharozę oraz odpad suchy, będący wykorzystywany np. do produkcji pary technologicznej ⁸, jako substrat dla przemysłu papierniczego lub jako pożywienie dla zwierząt hodowlanych. Ostatnio trwają prace nad wykorzystaniem suchej masy również do produkcji etanolu ²¹; ²². Sok cukrowy wykorzystuje się do produkcji cukru spożywczego jak i do produkcji etanolu .



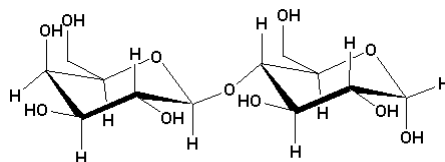
Rys. 2. Schemat uproszczony technologii fermentacji trzciny cukrowej²³.

3.2.1.3. Serwatka

Serwatka jest prawie klarowną cieczą pozostałą po ścięciu zawartej w mleku kazeiny. Podczas produkcji 1 kg sera powstaje aż 9 kg serwatki, a roczna światowa produkcja płynnej serwatki przekracza 160 mln ton^{24; 25}. Serwatka stanowi 85-95% objętości mleka wykorzystanego do produkcji sera. Głównym składnikiem tego ubocznego produktu przemysłu mleczarskiego jest laktoza, która stanowi 4,5–5% m/v serwatki. Laktoza jest węglowodanem obecnym w każdym mleku ssaków. Jest disacharydem zbudowanym z galaktozy oraz glukozy powiązanych ze sobą wiązaniem 1,4-β-D-O-glikozydowym, rys. 3. Rocznie produkowane jest zatem ok. 6 mln ton laktozy. Ponadto, serwatka zawiera białka (0,6-0,8% m/v), lipidy (0,4-0,5%), sole mineralne (głównie chlorek sodu, potasu i fosforan wapnia, 8-10% suchej masy), kwas mlekowy, kwas cytrynowy, mocznik oraz kwas moczowy (0,05% w/v). Biologiczne zapotrzebowanie na tlen BZT₅ wynosi w przypadku serwatki 30-50 g/L natomiast ChZT₅ 60-80 g/L²⁶. Wczesne prace nad zagospodarowaniem serwatki polegały na pompowaniu serwatki do rzek, jezior lub oceanu, gromadzenia w jaskiniach, wylewania na pola czy jako pokarm dla przeżuwaczy. Wspomniane metody utylizacji serwatki nie pozwalały na wytworzenie wartościowego produktu. Co prawda opisane sposoby na wykorzystanie serwatki pozwalają na eliminację w pewien sposób problemu mleczarni związanego z serwatką, niemniej jednak ze względu na liczne walory serwatki poszukuje się ekonomicznie korzystniejszych rozwiązań. Obecnie około 50% serwatki znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym (produkcja napojów, lodów, pieczywa, czy słodczy), jako dodatek do pasz dla zwierząt hodowlanych, w produkcji laktozy dla przemysłu farmaceutycznego (wypełniacz tabletek), spożywczego

(odżywki dla niemowląt, żywność instant) i chemicznego (produkcja laktitolu, laktulozy), a także do produkcji produktów fermentacji jak biogazu, białek organizmów jednokomórkowych, kwasów organicznych, etanolu, czy biopolimerów (guma ksantanowa). Tylko połowa produkowanej rocznie na świecie serwatki jest przetwarzana. Najprawdopodobniej nadal część wytworzonej serwatki jest traktowana jako odpad, który poważnie obciąża ścieki przemysłu spożywczego^{27; 28}.

Jednym ze znaczących produktów przetworzenia serwatki jest koncentrat białek serwatkowych (WPC), o aplikacjach w przemyśle spożywczym oraz kosmetycznym. Podczas produkcji WPC otrzymuje się duże objętości bogatego w laktozę permeatu serwatkowego oraz sole mineralne²⁹.



Rys. 3. Struktura chemiczna laktozy.

3.2.1.4. Celuloza

Bioetanol otrzymywany z źródeł odnawialnych takich jak drewno, trawa i odpady celulozowe powszechnie dostrzegany jest jako najlepsze alternatywne paliwo, o wysokich walorach ekonomicznych i środowiskowych. Celuloza występuje w roślinach w postaci mieszaniny z hemicelulozą oraz ligniną. Zawartość procentowa celulozy, hemicelulozy oraz ligniny w suchej masie roślinnej jest różna dla danego typu rośliny, Tabela 3.

Tabela 3. Zawartość celulozy, hemicelulozy i ligniny w różnych materiałach roślinnych^{30; 31; 32}.

Surowiec	Celuloza	Hemiceluloza	Lignina
Tytoń	30	17	21
Ketmia konopiwata	42	bd	15
Trzcina cukrowa	30-38	bd	16-21
Bawełna	40	bd	20
Drewno	40-55	20-35	25-30
Algi biomasa	7	16	1,5
Skórki pomarańczy	13,6	6,1	2,1
Skórki cytryny	12,7	5,3	1,7

Legenda: bd – brak danych

Celuloza zbudowana jest z glukozy połączonej wiązaniami beta 1,4 glikozydowymi, natomiast hemiceluloza oprócz glukozy zawierać może w swej strukturze reszty ksylozy, mannozy, galaktozy, ramnozy. Lignina zbudowana jest z aromatycznych węglowodorów usieciowanych szczególnie wiązaniami eterowymi. Fermentacja substancji ligninocelulozowych jak dotąd dostarcza dużo problemów z wydajnością.

Ponad 100 lat temu wiadome było, że kwasy katalizują reakcję hydrolizy celulozy i hemicelulozy do cukrów prostych C6 i C5. Niemcy i Rosjanie wykorzystywali tę prostą technologię w początkach XX wieku w celu produkcji paliwa alkoholowego, by zaspokoić ich potrzeby militarne. Jednak tak otrzymywane biopaliwo było zbyt drogie ażeby jego produkcja wyparła pozyskiwane paliwo kopalne. Z tego względu przez wiele lat prowadzono badania nad polepszeniem technologii produkcji etanolu z celulozy na niewielką skalę. Obecnie, mimo dużej popularności prowadzenia badań nad biopaliwem otrzymywanym z odpadów celulozowych, nie udało się opracować technologii pozwalającej na uzyskanie większego stężenia etanolu niż 60 g/L³¹.

3.3. Wykorzystanie serwatki do produkcji etanolu

Laktoza obecna w wysokim stężeniu w serwatce oraz produktach podobnych stanowi tanię źródło węgla dla wzrostu/fermentacji przeprowadzanej przez mikroorganizmy. Jednym z procesów fermentacji gdzie mogłaby zostać wykorzystana laktoza jest fermentacja alkoholowa. Proces ten charakteryzuje się tym, że przebiega w warunkach beztlenowych. Tak jak liczba mikroorganizmów asymilujących ten cukier w warunkach tlenowych jest duża to liczba mikroorganizmów asymilujących laktozę w warunkach beztlenowych jest bardzo ograniczona: np. *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianum*, *Candida pseudotropicalis*.

Obecnie tylko w kilku krajach na świecie serwatka wykorzystywana jest jako surowiec do produkcji etanolu – Nowej Zelandii, USA, Irlandii²⁷, a także od niedawna w Niemczech.

Szczepy *S. cerevisiae*, powszechnie stosowane w gorzelnictwie, nie są jednak zdolne do bezpośredniej fermentacji laktozy, tak więc wykorzystanie serwatki jako surowca do fermentacji alkoholowej wymaga wstępnej hydrolizy disacharydu. Proces ten może przebiegać z zastosowaniem mikroorganizmów zdolnych do syntezy β -D-galaktozydazy, enzymu katalizującego reakcję hydrolizy laktozy do glukozy i galaktozy lub też z wykorzystaniem samego białka. W przypadku wykorzystania całych komórek jako

biokatalizatora, proces produkcji etanolu może być dwuetapowy lub jednoetapowy. Proces dwuetapowy obejmuje hydrolizę laktozy zawartej w serwatce z wykorzystaniem jednego szczepu mikroorganizmów, a następnie fermentację produktów reakcji przy użyciu innego szczepu. Proces jednoetapowy wykorzystuje mieszaninę kultur mikroorganizmów. W przypadku zastosowania izolowanego enzymu, może on być dodany w formie rozpuszczalnej bezpośrednio do bioreaktora, w którym prowadzona jest fermentacja alkoholowa lub też w postaci immobilizowanego preparatu, dodawanego, a następnie usuwanego z bioreaktora jeszcze przed głównym procesem fermentacji. Wstępny etap hydrolizy laktozy zawartej w serwatce, zwłaszcza z wykorzystaniem izolowanego enzymu, znacznie podwyższa koszty produkcji etanolu. Ponadto, wzrost drożdży w pożywce zawierającej glukozę i galaktozę jest dwufazowy. Początkowo asymilowana jest tylko glukoza i dopiero po jej całkowitym wykorzystaniu, galaktoza. Przeprowadzone badania wykazały również, że wydajność produkcji etanolu z galaktozy jest niższa niż w przypadku fermentacji glukozy oraz, że pomiędzy dwoma etapami fermentacji następuje etap przejściowy, podczas którego produkcja etanolu jest całkowicie zahamowana^{27; 33}. Aby przezwyciężyć te problemy, podjęto próby wykorzystania do produkcji alkoholu drożdży *Kluyveromyces fragilis*, które wykazują zdolność hydrolizy laktozy zawartej w serwatce. Nie znalazły one jednak szerokiego zastosowania ze względu na małą wydajność produkcji alkoholu oraz dużą wrażliwość na jego stężenie w płynie hodowlanym^{27; 34}. Z powyższych względów prowadzone są intensywne badania zmierzające do skonstruowania rekombinantowych szczepów *S. cerevisiae* zdolnych do hydrolizy laktozy.

3.4. Rekombinantowe szczepy *S. cerevisiae* do produkcji etanolu z serwatki

Do tej pory skonstruowano szereg szczepów *S. cerevisiae* zdolnych do hydrolizy laktozy, jednak żaden z nich nie znalazł szerokiego zastosowania w produkcji etanolu na skalę przemysłową. Skonstruowany w 1985 r. szczep *S. cerevisiae* zawierający geny kodujące β -D-galaktozydazę oraz permeazę laktozową *K. lactis* zdolny był do wzrostu w pożywce zawierającej laktozę, jednak wzrost ten był bardzo wolny, a szczep okazał się dodatkowo niestabilny genetycznie³⁵. Zwiększenie stabilności genetycznej rekombinantowych szczepów uzyskano na drodze integracji DNA zawierającego geny kodujące oba enzymy *K. lactis* z chromosomalnym DNA *S. cerevisiae*, w obrębie

niekodujących sekwencji rDNA. Uzyskane szczepy charakteryzowały się jednak obniżoną zdolnością do beztlenowego metabolizmu cukrów, co uniemożliwiło ich wykorzystanie do produkcji etanolu ³⁶. Niewielkie ilości etanolu (poniżej 3%), uzyskano również w przypadku rekombinantowego szczepu *S. cerevisiae* produkującego zewnątrzkomórkowo β -D-galaktozydazę *K. lactis* ³⁷. Inne szczepy *S. cerevisiae* Lac⁺ zdolne były do koekspresji genów β -D-galaktozydazy *E. coli* oraz genu *gal4* *S. cerevisiae*. Skutkiem nadekspresji genu *gal4* była częściowa liza komórek drożdży i uwolnienie β -D-galaktozydazy do płynu hodowlanego, gdzie następowała efektywna hydroliza laktozy i produkcja etanolu ³⁸. Kolejne badania obejmowały konstrukcję szczepu zawierającego gen kodujący β -D-galaktozydazę *Aspergillus niger* wraz z sekwencją sygnałną, dzięki czemu enzym był produkowany zewnątrzkomórkowo. Nie spełniał on jednak w pełni wymagań procesu fermentacji alkoholowej (30°C, pH = 5,5), ze względu na swoje właściwości biochemiczne, tj. optymalną aktywność w temperaturze 65°C i pH 3,5. Rekombinantowy szczep drożdży wykazywał ponadto dwufazowość wzrostu i niestabilność genetyczną. Zaledwie 10% populacji drożdży po procesie fermentacji zachowywała zdolność do produkcji enzymu *A. niger* ³³. W związku z powyższym konstrukcja szczepu drożdży *S. cerevisiae* zdolnego do sekrecji β -D-galaktozydazy kompatybilnej z warunkami fermentacji alkoholowej prowadzonej przez te drożdże oraz nadanie drożdżom zdolności do efektywnego metabolizmu glukozy i galaktozy do etanolu, pozwoliłaby na uzyskanie etanolu w sposób wydajny i tani z laktozy zawartej w serwatce.

3.5. β -D-galaktozydazy

β -D-galaktozydazy EC 3.2.1.23 to enzymy katalizujące reakcję hydrolizy wiązań 1,4- β -D-galaktozydowych, np. takiego wiązania jakie występuje między galaktozą a glukozą w laktozie. W zależności od źródła pochodzenia, enzymy te wykazują optymalną aktywność w różnych warunkach pH i temperatury. W przypadku β -D-galaktozydaz zaadaptowanych do zimna optymalna temperatura aktywności jest niższa niż wykazywana przez mezofilną β -D-galaktozydazę *E. coli* (55°C), co może być korzystne w przypadku stosowania takich enzymów podczas jednoczesnej hydrolizy laktozy i produkcji etanolu przez drożdże *S. cerevisiae* ze względu na fakt prowadzenia procesu fermentacji alkoholowej w temperaturze od 30 do 38°C. Istotnym parametrem decydującym o skali aplikacji β -D-galaktozydaz do rozkładu laktozy jest fakt zdolności przeprowadzania prehydrolizy tego

dwucukru. Jednak większość β -D-galaktozydaz nie posiada takiej zdolności ulegając inhibicji kompetytywnej galaktozą i glukozą powstającą w ramach reakcji hydrolizy. Dotychczas poznano i scharakteryzowano niewiele enzymów tego typu. Ze względu na założenia badań w ramach pracy doktorskiej, korzystnie byłoby zastosować β -D-galaktozydazę, charakteryzującą się spektrum aktywności przedstawionym powyżej i także niską masą cząsteczkową białka natywnego. Dotychczas poznano niewiele β -D-galaktozydaz zaadaptowanych do zimna o niskiej masie cząsteczkowej białka natywnego (Tabela 4).

Tabela 4. β -D-galaktozydazy zaadaptowane do zimna i najczęściej charakteryzowane mezofilne odpowiedniki.

Szczep	Optymalna temperatura aktywności	Optymalne pH	Masa cząsteczkowa	Oligomeryczność	Masa natywnego białka	Literatura
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> F2	10	8,0	130	nb	nb	39
<i>Aspergillus niger</i>	65	3,2-4,0	124,150,173	1	124,150,173	40
<i>Kluyveromyces lactis</i>	50	6,9-7,3	135	2	270	41
<i>Escherichia coli</i>	55	6,0-8,0	107	4	465	42
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 22b	40	6,0-8,0	115	4	490	43; 44
<i>Pseudoalteromonas haloplanctis</i>	50	8,5	118	-	powyżej 300	45
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. TAE 79b	26	9,0	110	4/5	513	46
<i>Arthrobacter</i> sp. C2-2	-	-	110	6	660	47
<i>Planococcus</i> sp. L4	20	7,0	78	2	156	48

3.6. Metody immobilizacji enzymów

Przewaga enzymów nad katalizatorami chemicznymi i ich możliwości aplikacyjne, jako przyspieszaczy reakcji chemicznych sprawiły, że znalazły one zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Niemniej jednak poza zaletami jakie niesie ich aplikacja: takimi jak wysoka specyficzność, duży współczynnik przyspieszenia reakcji w stosunku do reakcji bez enzymu, zalety stereo specyficzności reakcji, stosowanie enzymu w procesie biotechnologicznym wiąże się również często z wysokim kosztem procesu. Głównym powodem jest wysoka cena preparatów enzymatycznych, która wynika z dużych nakładów potrzebnych na izolację i oczyszczenie biokatalizatorów. Problemem

pojawiającym się w aplikacji płynnych formulacji enzymatycznych jest zanik aktywności enzymatycznej wraz z upływem czasu. W przypadku niektórych enzymów ich szybkość połowicznej inaktywacji wynosić może kilkadziesiąt minut, co uniemożliwia ich aplikację przemysłową. Enzymy są wrażliwe w szczególności na zmiany warunków fizykochemicznych, takich jak: temperatura, pH, czy obecność substancji pełniących rolę aktywatorów (np. etanol) lub inhibitorów (np. glukoza). Ponadto, w wielu przypadkach zastosowanie enzymu ogranicza się do roztworów wodnych ze względu na wspomnianą labilność.

Od wielu lat próbuje się znieść te ograniczenia enzymów na drodze różnych metod immobilizacji. Wykazano między innymi, że immobilizacja wpływa korzystnie na stabilność struktury białka, zwiększając jego termostabilność i wrażliwość na czynniki denaturujące^{49; 50}. Immobilizowane enzymy również znalazły zastosowanie w środowisku rozpuszczalników organicznych⁵¹. Z punktu widzenia samej technologii unieruchomienie enzymu na nierozpuszczalnym nośniku pozwala na jego łatwe oddzielenie od mieszaniny reakcyjnej. Takie biokatalizatory mogą być oddzielane na sitach bądź też w szczególnych przypadkach przy pomocy elektromagnesu.

Ze względu na sposób unieruchamiania enzymu metody immobilizacji dzieli się na chemiczne i fizyczne. Do fizycznych metod immobilizacji zalicza się adsorpcję enzymu na nierozpuszczalnej matrycy, a także pułapkowanie biokatalizatora wewnątrz struktury naturalnych lub syntetycznych polimerów. Chemiczne metody polegają na stworzeniu wiązania chemicznego pomiędzy nośnikiem a enzymem z wykorzystaniem wielofunkcyjnych odczynników. Enzymy można również unieruchomić poprzez umiejscowienie ich wewnątrz określonej przestrzeni, np. pomiędzy dwiema membranami półprzepuszczalnymi w bioreaktorze lub na drodze kapsułkowania. Zaletą metod fizycznych jest zachowanie struktury enzymu. Często jednak następuje wmywanie biokatalizatora ze złoża, zwłaszcza w przypadku stosowania prostej adsorpcji białka na powierzchni matrycy. Metody chemiczne zapewniają stabilność układu, ale w wielu przypadkach wiąże się to z częściową utratą aktywności enzymu, spowodowaną zmianą konformacji białka. Membrany półprzepuszczalne i kapsułkowanie stosować zaś można wyłącznie do reakcji z udziałem małocząsteczkowych substratów.

Ostateczna przydatność immobilizowanego biokatalizatora w procesach przemysłowych uzależniona jest od trzech głównych czynników: enzymu, nośnika oraz metody unieruchamiania.

3.7. Immobilizacja β -D-galaktozydaz

Bardzo ważna dla przydatności β -D-galaktozydazy w procesach przemysłowych jest cena i ilość dostępnego komercyjnie biokatalizatora. Obecnie większość enzymów wytwarzana jest przez rekombinantowe szczepy drobnoustrojów, dzięki czemu są znacznie tańsze od białek wyizolowanych z komórek ich naturalnego producenta. Biosynteza termolabilnych β -D-galaktozydaz w komórkach mezofilnych gospodarzy (np. *E. coli*), z reguły nie stanowi problemu technicznego.

Ważny jest racjonalny wybór złoza do immobilizacji enzymu. Nośnik powinien być przede wszystkim nierozpuszczalny w środowisku, w którym prowadzona jest reakcja katalizowana enzymatycznie (zwykle jest to roztwór wodny). Musi charakteryzować się dużą zdolnością wiązania enzymu, która uzależniona jest od ilości i rodzaju grup funkcyjnych zdolnych do przyłączenia białka, a także podatności na modyfikacje prowadzące do zwiększenia ilości tych grup (aktywacja nośnika). O pojemności złoza decyduje również jego porowatość i kształt cząstek. Nośnik powinien być ponadto odporny na degradację chemiczną i mikrobiologiczną oraz nietoksyczny. O przydatności złoza decydują też jego właściwości mechaniczne, cena oraz dostępność. β -D-galaktozydazy próbowano wiązać z różnymi nośnikami, zarówno pochodzenia naturalnego, jak i syntetycznymi. Były wśród nich perełki szklane⁵², żel krzemionkowy⁵³, agarozą⁵⁴, matryca żelatynowo-alginianowa⁵⁵, celuloza⁵⁰, chityna⁵⁶, chitozan⁵⁷, grafit⁴⁹, proszek kostny⁵⁸, żywica fenolo-formaldehydowa⁵¹ i inne.

W Tabeli 4 przedstawiono wyniki uzyskiwane dla β -D-galaktozydaz unieruchomionych na różnych nośnikach⁵⁹.

W przypadku β -D-galaktozydaz stosując immobilizację uzyskano znaczącą poprawę efektywności przeprowadzania hydrolizy laktozy.

Tabela 5. β -D-galaktozydazy immobilizowane na różnych nośnikach stosowane w procesach ⁵⁹.

Źródło enzymu	Metoda immobilizacji	Złoże	Bioreaktor	% hydrolizy
			Reaktor z upakowanym	
<i>Saccharomyces fragiies</i>	Wiązanie kowalencyjne	Grys kukurydziany	złożem	50% /3h ~15% produkcja
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sieciowanie	Chitozan	Reaktor przepływowy	oligosacharydów
			Reaktor z upakowanym	86–90% hydrolizy laktozy
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Wiązanie kowalencyjne	Szkło porowate	złożem	w serwatce
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Silanowane przez 10% g-APTES w wodzie	Alumina - krzemionka	Kolba szklana	ND
			Reaktor laboratoryjny z	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Pułapkowanie	Wapń alginian	recyrkulacją	99.5% (30 h)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Sieciowanie	Poli winylo chitozan	Reaktor przepływowy	50% (24h)
	Wiązanie do włókien bawełny aktywowanych p-		Reaktor z upakowanym	
<i>Aspergillus oryzae</i>	TES	Bawełna	złożem	~95% hydrolizy laktozy
	Wiązanie kowalencyjne, aktywacja			>70% produkcja
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	epichlorohydryną	Ziarna celulozy	Rektor przepływowy	oligosacharydów
		Alginate–chitosan alginate		
		rdzeń usieciowany Ca ²⁺ I jony		
β -D-galaktozydaza	Mikrokapsułkowanie	Ba ²⁺	Reaktor fluidalny	
		Polysiloxane–polyvinyl alcohol		
		magnetic (mPOS–PVA)		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Wiązanie kowalencyjne	composite	ND	-
β -D-galaktozydaza	Retencja w membranie	-	Eppendorfy	>90% konwersji w 5h
<i>Aspergillus oryzae</i>	Pułapkowanie	LentiKat [®]	-	-

Doskonałym nośnikiem do immobilizacji enzymów stosowanych w przemyśle spożywczym, również β -D-galaktozydaz, jest chitozan. Ten naturalny polimer składający się z cząsteczek glukozaminy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi charakteryzuje się unikalnymi właściwościami: jest hydrofilowy, wykazuje duże powinowactwo do białek, posiada też szereg grup funkcyjnych, aminowych i hydroksylowych, podatnych na modyfikacje chemiczne prowadzące do utworzenia wiązań kowalencyjnych z enzymem. Ponadto jest nietoksyczny, wykazuje własności antybakteryjne i jest mało podatny na degradację mikrobiologiczną. Chitozan jest nierozpuszczalny w wodzie, ale rozpuszcza się w roztworach kwaśnych. W formie rozpuszczonej jest silnie naładowany dodatnio i może tworzyć nierozpuszczalne w wodzie agregaty ze związkami polianionowymi. Ulega również precypitacji w roztworach o wysokim pH. Dzięki tym właściwościom łatwo można go formować w różne kształty: kulki, włókna, kapsułki, membrany i inne. Najczęściej spotykane kuleczki chitozanowe charakteryzują się znaczną porowatością. Chitozan jest też tani i łatwo dostępny. Wytwarza się go na drodze deacetylacji chityny, składnika budulcowego między innymi pancerzy skorupiaków morskich (krewetek, krabów, czy kryla antarktycznego), które stanowią odpady przemysłu spożywczego⁶⁰.

Jeżeli immobilizowany biokatalizator ma być stosowany w przemyśle spożywczym, jedynym rozwiązaniem jest kowalencyjne związanie go z nośnikiem. Tylko ta metoda zapewnia uzyskanie czystego produktu, nie zanieczyszczonego białkiem enzymatycznym, które może powodować reakcję alergiczną u konsumentów. Również stosowanie termostabilnych enzymów wymaga chemicznej metody unieruchamiania, bo tylko dzięki niej można uzyskać stabilny w wysokiej temperaturze układ biokatalizator-nośnik.

3.8. Inhibicja β -D-galaktozydaz a immobilizacja

β -D-galaktozydazy ulegają inhibicji w przypadku obecności glukozy [15]. Stopień inhibicji zależy od stężenia glukozy oraz od danej rodziny β -D-galaktozydaz. W przypadku immobilizacji β -D-galaktozydazy na nośniku udało się zredukować niekorzystny wpływ glukozy na β -D-galaktozydazę *K. lactis* [16]. W związku z tym aplikacja unieruchomionego na nośniku enzymu w produkcji etanolu z laktozy powinna przynieść obiecujące rezultaty.

3.9. Produkcja zewnątrzkomórkowa białek w oparciu o komórki rekombinantowych drożdży

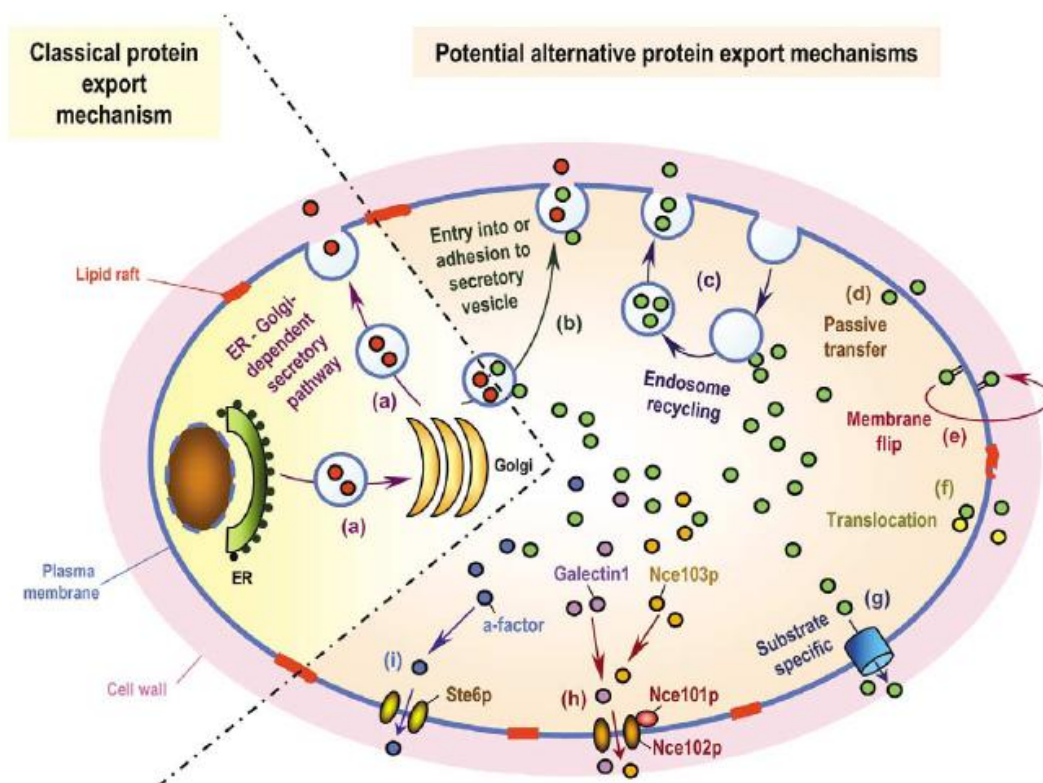
W sposób szczególnie komórki eukariotyczne wykazują zdolność produkcji zewnątrzkomórkowej białek, wykorzystując przy tym endocytozę bądź transport przez białka kanałowe. Produkowane wewnątrzkomórkowo białka posiadają określone sekwencje liderowe, kierujące je do odpowiednich regionów komórki. Jedną z najlepiej poznanych sekwencji sekrecji białek u drożdży jest czynnik koniugacyjny *S. cerevisiae* alfa-faktor zawierający region pre oraz pro.

Sekwencja alfa-faktora składa się z sekwencji pre – kierującej białko do retikulum endoplazmatycznego oraz sekwencji pro – kierującej białko do aparatu Golgiego. Sekwencja pre ulega odłączeniu od łańcucha polipeptydowego w wyniku działania błonowej endopeptydazy sygnałnej retikulum endoplazmatycznego rozpoznającego tę sekwencję^{61; 62}. W retikulum endoplazmatycznym reszty aminokwasowe białka ulegają posttranslacyjnym modyfikacją. Rodzaj modyfikacji może wpływać na poziom produkcji zewnątrzkomórkowej białka i jest charakterystyczny dla danego białka. W dalszym etapie białko zawierające sekwencję pro na N-końcu łańcucha polipeptydowego kierowane jest do aparatu Golgiego gdzie endopeptydazy błonowe, np. Kex2^{63; 64}, odcina tę sekwencję i w wyniku czego następuje sortowanie białek do odpowiednich pęcherzyków^{65; 66}.

Szczepy dzikich drożdży *S. cerevisiae* są zdolne do sekrecji bardzo niewielkiej ilości białek. Segregacja białek w komórkach drożdży następuje na drodze rozpoznawania przez białka wewnątrzkomórkowe sekwencji liderowych umieszczonych na N końcu łańcucha polipeptydowego produkowanego białka. W pierwszej kolejności białko zawierające sekwencję liderową jest kierowane zawsze do retikulum endoplazmatycznego, skąd dalej kierowane jest do odpowiedniego miejsca w komórce: jądro, mitochondrium, błona cytoplazmatyczna oraz na zewnątrz komórki. W przypadku sekrecji białek, dokładny mechanizm nie został jak dotąd poznany⁶⁷.

W celu zewnątrzkomórkowej produkcji białek heterologicznych przez drożdże *S. cerevisiae* wykorzystano szereg różnych sekwencji sekrecji umieszczanych w postaci fuzji translacyjnej na N końcu docelowego białka. Wśród nich możemy wyróżnić sekwencję α -faktora *S. cerevisiae*⁶¹, PHO5 *S. cerevisiae*⁶⁸, STA2 *S. diastiticus*⁶⁹, INU *Kluyveromyces marxianus*⁷⁰ oraz SUC2 *S. cerevisiae*⁷¹. Niemniej jednak najbardziej popularną sekwencją sekrecji jest α -faktor *S. cerevisiae*, który rozpoznawany jest w

pierwszej kolejności przez endopeptydazę sygnałną, po czym białko transportowane jest do retikulum endoplazmatycznego. Odcinanie sekwencji liderowej następuje w aparacie Golgiego i katalizowane jest przez endopeptydazę Kex2. Endopeptydaza sygnałna Kex2 hydrolizuje wiązanie peptydowe po sekwencji reszt aminokwasowych Lys-Arg. Efektywność hydrolizy jest wzmagana przez obecność za sekwencją rozpoznania dla proteazy Kex2 powtórzeń sekwencji Glu-Ala. Same białko Kex2 wymaga obecności jonów wapnia jako kofaktora reakcji ⁷², Rys. 4.



Rys. 4. Schemat obrazujący możliwości sekrecji u drożdży ⁷³.

3.10. Permeazy dwucukru laktozy i maltozy

Jedną z koncepcji rozwiązania problemu produkcji etanolu z laktozy przez drożdże *S. cerevisiae* było wprowadzenie genu kodującego permeazę laktozową wraz z genem kodującym β -D-galaktozydazę *K. lactis* ³⁶. Produkcja β -D-galaktozydazy odbywała się tutaj wewnątrzkomórkowo. Transport dwucukru do wnętrza komórki odbywający się na drodze aktywnego symportu jonów wodorkowych zachodzi według określonego mechanizmu ⁷⁴. W przypadku tego rozwiązania napotkano jednak problem w utylizacji laktozy wynikający z dwufazowości wzrostu rekombinantów metabolizujących laktozę. Problem ten wynikać może ze złego kotwiczenia się permeazy w błonie komórkowej

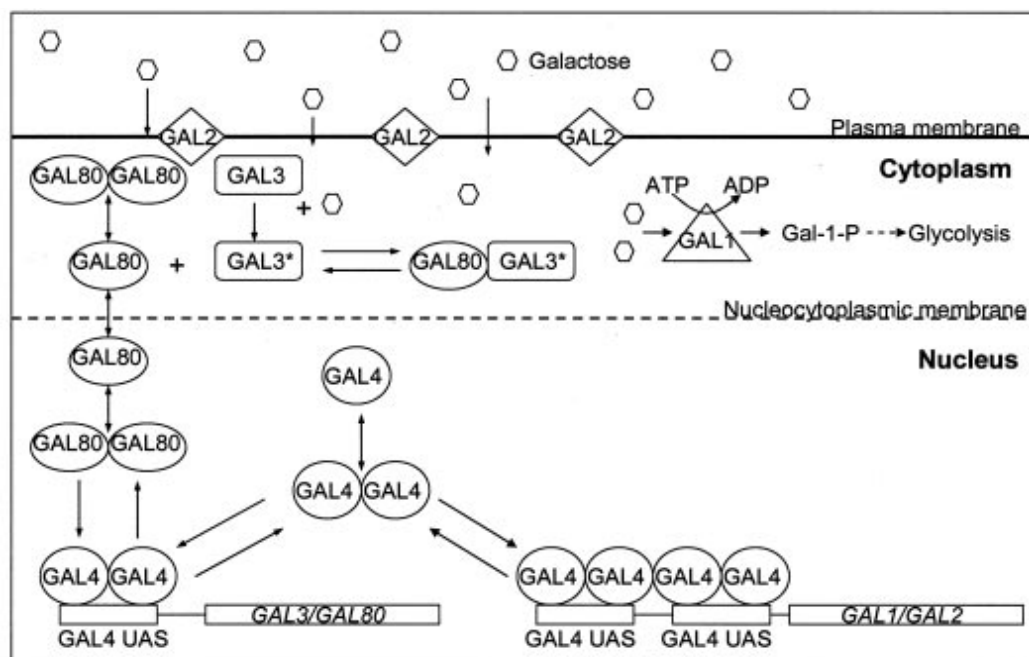
drożdży *S. cerevisiae*. W związku z tym potencjalnie permeaza dwucukru będąca białkiem homologicznym dla *S. cerevisiae*, a wykazująca zdolność do transportu również laktozy mogłaby stanowić pewną alternatywę. Sekwencje aminokwasowe permeaz laktozy i permeaz maltozy *S. cerevisiae* wykazują stosunkowo wysoką homologię sekwencji⁷⁵.

W przypadku permeazy maltozy *S. cerevisiae* Mal61 wyróżnić można domenę N-terminalną odpowiedzialną za degradację białka wywołaną przez indukcję glukozą. Wyselekcjonowana została sekwencja PEST (prolina-glutamina-seryna-threonina) we fragmencie N-terminalnym znajdująca się w regionie od 49 do 78 reszty aminokwasowej, która spełnia rolę w degradacji permeazy. Usunięcie tego fragmentu w białku skutkuje w odporności permeazy na indukowaną degradację obecnością glukozy⁷⁶. W przypadku obecności glukozy efektywność transportu maltozy do wnętrza komórki spada ponad 100 razy⁷⁷.

3.11. Metabolizm galaktozy u *S. cerevisiae*

Ze względu na to, że galaktoza jest mniej energetycznym substratem dla wzrostu komórek niż glukoza, ekspresja genów kodujących białka uczestniczące w metabolizmie tego węglowodanu znajduje się pod ścisłą kontrolą. Galaktoza jest transportowana do wnętrza komórki drożdży *S. cerevisiae* na zasadzie aktywnego transportu wykorzystującego permeazę galaktozy (Gal2) oraz na niewielkim poziomie poprzez dyfuzję wspomaganą. Monocukier ulega następnie ufosforylowaniu w reakcji katalizowanej przez galaktokinazę (Gal1) w obecności ATP. W kolejnym etapie galaktozo-1-fosforan jest przekształcany przez urydylotransferazę do α -D-glukozy-1-fosforanu. Powstały produkt ulega dalszemu przekształceniu w wyniku działania mutazy fosfoglukozowej (Gal5p) do α -D-glukozy-6-fosforanu, który jest włączany do szlaku glikolizy. Ponadto w szlaku metabolizmu galaktozy Leloir'a występuje również mutarotaza galaktozy (Gal10p) przekształcająca anomery galaktozy między α a β , aczkolwiek enzym ten nie jest konieczny dla metabolizmu galaktozy⁷⁸. Ekspresja genów *gal1* i *gal2* jest ściśle regulowana. W warunkach nieindukowanych i braku represji katabolicznej, białko Gal4p, które jest aktywatorem transkrypcji wiąże się jako dimer do miejsca rozpoznania zlokalizowanym przed genami szlaku metabolizmu galaktozy. Białko represorowe, Gal80p, dimeryzuje i wiąże się do jądrowego białka Gal4p, uniemożliwiając ekspresję genów poprzez blokadę aktywacyjnej funkcji białka Gal4p. W obecności glukozy, białko

występujące wyłącznie w cytoplazmie (Gal3p), ulega aktywacji przez co nabywa zdolności wiązania się z białkiem represorowym Gal80p (migrującym w sposób ciągły pomiędzy jądrem a cytoplazmą), redukując ilość białka wiążącego się do aktywatora ekspresji genów szlaku metabolizmu galaktozy. Białko Gal80p związane z białkiem Gal3p traci zdolność migracji do jądra. W przypadku obecności glukozy ekspresja tych genów ulega represji na skutek kilku mechanizmów. Ilość galaktozy transportowanej do wnętrza komórki ulega redukcji ze względu na inaktywację kataboliczną permeazy galaktozy. Ponadto represor Mig1p blokuje zarówno transkrypcję jak i funkcję białka Gal4p⁷⁹. Wykazano również, że nadprodukcja białka Gal7 (urydylotransferazy) wpływa na układ kontroli i ekspresji genów metabolizmu galaktozy, odblokowując ekspresję genów ze szlaku, w przypadku nadprodukcji wspomnianego białka⁸⁰, Rys. 5.



Rys. 5. Schemat kontroli metabolizmu galaktozy⁷⁹.

4. Materiały i metody

4.1. Szczepy bakteryjne

- *Arthrobacter* sp. 32c – bakteryjny szczep, wyizolowany z gleby antarktycznej w Katedrze Mikrobiologii PG,
- *Escherichia coli* LMG194 plysN⁸¹;
- *Escherichia coli* TOP10F' – F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 deoR recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG* (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, USA);
- *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen);
- *Pichia stipitis* ATCC 58785 (LGC Standards Sp. z o.o., Polska);
- *Saccharomyces cerevisiae* BMA64-1A MATa; *ura3-52; trp1*Δ2; *leu2-3_112; his3-11; ade2-1; can1-100* (Euroscarf);

4.2. DNA plazmidowe

- pCRZeroBlunt – wektor DNA do szybkiego klonowania fragmentów DNA zakończonych tępymi końcami (Invitrogen);
- pPICZalfaA – wahadłowy wektor plazmidowy pozwalający na indukowaną ekspresję genów z fuzją translacyjną sekwencji sekrecyjnej α-faktora *S. cerevisiae* w komórkach *Pichia pastoris* oraz integrację w obrębie locus *gap P. pastoris* (Invitrogen);
- pGAPZalfaA – wahadłowy wektor plazmidowy pozwalający na konstytutywną ekspresję genów w komórkach *Pichia pastoris* oraz integrację w obrębie locus *gap P. pastoris* (Invitrogen);
- pSach424 – wahadłowy, autonomiczny wektor plazmidowy umożliwiający konstytutywną ekspresję genów w komórkach *S. cerevisiae*⁸².
- YIpDCE1 – wektor plazmidowy umożliwiający konstytutywną ekspresję dwóch genów w komórkach *S. cerevisiae* oraz pozwalający na integrację kasety ekspresyjnej w obrębie locus *ade2 S. cerevisiae*⁸³;
- pYES2/CT – wektor DNA posiadający jako marker selekcyjny gen *ura3* (Invitrogen).

4. MATERIAŁY I METODY

- **pTES3/CT** – wektor DNA posiadający jako marker selekcyjny gen *trp1* (Invitrogen).

4.3. Pożywki i podłoża

- **podłoże AMYL**: pepton K 2 g, ekstrakt drożdżowy 1 g, sól morską 10 g, agar 15 g, skrobia ziemniaczana 2 g, woda destylowana 1000 ml (pH = 7,0);
- **pożywka BMGY**: pepton K 20 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, 1 M bufor fosforanowy (pH = 6,0) 100 ml, 10x stężony YNB 100 ml, roztwór biotyny 2 ml, roztwór glicerolu 100 ml, woda destylowana 700 ml;
- **pożywka BMMY**: pepton K 20 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, 1 M bufor fosforanowy (pH = 6,0) 100 ml, 10x stężony YNB 100 ml, roztwór biotyny 2 ml, roztwór metanolu 100 ml, woda destylowana 700 ml.
- **podłoże CEL**: pepton K 0,5%, ekstrakt drożdżowy 0,25%, sól morską 1%, avicell 0,2%, agar bakteriologiczny 1,5%.
- **pożywka LB**: pepton K 10 g, ekstrakt drożdżowy 5 g, NaCl 10 g, woda destylowana 1000 ml (pH = 7,2);
- **pożywka LB*** (niskosolna): pepton K 10 g, ekstrakt drożdżowy 5 g, NaCl 5 g, woda destylowana 1000 ml (pH = 7,5);
- **podłoże LA**: pepton K 10 g, ekstrakt drożdżowy 5 g, NaCl 10 g, agar 15 g, woda destylowana 1000 ml;
- **podłoże LA*** (niskosolne): pepton K 10 g, ekstrakt drożdżowy 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g, woda destylowana 1000 ml (pH = 7,5);
- **podłoże LAS**: pepton K 2 g, ekstrakt drożdżowy 1 g, sól morską 10 g, agar 15 g, laktoza 10 g, woda destylowana 1000 ml (pH = 7,0);
- **podłoże LASAra**: pepton K 2 g, ekstrakt drożdżowy 1 g, arabinoza 10 g, sól morską 10 g, woda destylowana 1000 ml;
- **pożywka LOS**: pepton K 0,5%, ekstrakt drożdżowy 0,25%, sól morską 1%, glukoza 0,2%.
- **podłoże LOS**: pepton K 0,5%, ekstrakt drożdżowy 0,25%, sól morską 1%, glukoza 0,2%, agar bakteriologiczny 1,5%.

4. MATERIAŁY I METODY

- **podłoże PROT:** pepton K 0,5%, ekstrakt drożdżowy 0,25%, sól morską 1%, glukoza 0,2%, mleko 50%, agar bakteriologiczny 1,5%.
- **pożywka SER:** serwatka liofilizowana 150 g (zawartość laktozy ok. 13-15% w/w), pepton K 5 g, ekstrakt drożdżowy 2,5 g, woda destylowana 1000ml;
- **podłoże YPD:** pepton K 20 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, agar 20 g, glukoza 20 g, woda destylowana 1000 ml;
- **pożywka YPG:** pepton K 20 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, glicerol 20 ml, woda destylowana 980 ml;
- **pożywka YPG_{1/2}:** pepton K 20g, ekstrakt drożdżowy 10g, glicerol 10 ml, woda destylowana 990 ml;
- **podłoże YPDS:** pepton K 20 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, sorbitol 182,2 g, agar 20 g, 20% glukoza 100 ml, woda destylowana 900 ml;
- **podłoże YPL:** pepton K 20 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, laktoza 150 g, agar 20 g, woda destylowana 1000 ml;
- **YP:** pepton K 20 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, woda destylowana 1000 ml;
- **podłoże YDO-Trp:** Yeast Nitrogen Base z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,7 g, Yeast Drop Out Medium – TRP 1,92 g, agar 20 g, woda destylowana 1000 ml;
- **podłoże YDO-Ura:** Yeast Nitrogen Base z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6,7 g, Yeast Drop Out Medium – Uracil 1,92 g, agar 20 g, woda destylowana 1000 ml;

4.4. Dodatkowe składniki do pożywek i podłoży

20% arabinoza: 20% arabinozy wag/wag w wodzie destylowanej;

1 M bufor fosforanowy (pH = 6,0): 1 M K_2HPO_4 132 ml, 1 M KH_2PO_4 868 ml;

10x stężony YNB: Yeast Nitrogen Base without amino acids (Fluka, Szwajcaria) 134 g, woda destylowana 1000 ml;

roztwór glicerolu: glicerol 10 ml, woda destylowana 90 ml;

roztwór metanolu: metanol 5 ml, woda destylowana 95 ml;

roztwór biotyny: biotyna 20 mg, woda destylowana 100 ml;

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktopiranozyd) 100 mM roztwór w N,N-dimetyloformamidzie;

4. MATERIAŁY I METODY

Ampicylina 100 mg/ml wody;

Tetracyklina 12,5 mg/ml 70% etanolu;

Chloramfenikol 34 mg/ml 70% etanolu;

Zeocyna 100 mg/ml (Invitrogen);

4.5. Hodowla mikroorganizmów

Szczep bakteryjny *Arthrobacter* sp. 32c hodowano w 10 ml pożywki LOS (4.3) przez 36 h w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 20°C, stosując wytrząsanie na poziomie 200 rpm.

Szczepy bakteryjne *E. coli* hodowano w pożywce LB (4.3) z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku lub LB* (4.3) w przypadku gdy jako marker selekcyjny wykorzystywana była zeocyna.

Szczepy drożdżowe hodowano w pożywce YPD (4.3).

4.6. Oczyszczanie DNA

4.6.1. Izolacja DNA genomowego

Bakteryjne DNA genomowe izolowano z 2 ml 36- h hodowli przy pomocy zestawu „Genomic Mini AX Bacteria” (A&A Biotechnology), według procedury dostarczonej przez producenta zestawu.

Drożdżowe DNA genomowe izolowano z 1 ml 24 h hodowli drożdży przy pomocy zestawu „Genomic Mini AX Yeast” (A&A Biotechnology), według procedury dostarczonej przez producenta zestawu.

4.6.2. Izolacja DNA plazmidowego

DNA plazmidowe z 1,5 ml 12-18 h hodowli *E. coli* izolowano przy pomocy zestawu „Plasmid Miniprep Plus” (A&A Biotechnology), według procedury dostarczonej przez producenta zestawu.

4.6.3. Izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego

Fragmenty DNA rozdzielano w 1 i 2% żelach agarozowych w roztworze buforowym 1x TAE. Wycinano z żelu bloczek agarozowy zawierający odpowiedni

4. MATERIAŁY I METODY

fragment DNA. Izolację fragmentów DNA z żelu agarozowego przeprowadzano wykorzystując zestaw „DNA Gel Out” (A&A Biotechnology).

4.6.4. Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych

DNA po przeprowadzonych reakcjach enzymatycznych oczyszczano stosując zestaw „Clean Up” (A&A Biotechnology), według procedury dostarczonej przez producenta.

4.7. Oznaczanie stężenia DNA

Stężenie DNA oznaczano na podstawie pomiaru absorbancji roztworów przy $\lambda=260$ nm za pomocą kalkulatora DNA GeneQuant (Pharmacia).

4.8. Elektroforetyczny rozdział

4.8.1. DNA w żelu agarozowym

- **Wzorce masy cząsteczkowej DNA:**

- **Marker 100 - 500** o wielkości fragmentów DNA: 500, 400, 300, 200 i 100 pz, (DNA-Gdańsk, Polska);
- **Marker 100 – 1000** o wielkości fragmentów DNA: 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 i 100 pz, (DNA-Gdańsk, Polska);
- **Marker O’Gene Ruler** o wielkościach fragmentów DNA: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pz, (Fermentas, Litwa);

Odczynniki do elektroforetycznego rozdzielania DNA

- **bufor 50x TAE** (pH = 7,5): Tris-HCl 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:** 0,25% błękit bromofenolowy, 40% sacharoza;
- bromek etydyny (5 mg/ml);
- Agaroza Plus (Prona, Hiszpania).

DNA genomowe, plazmidowe i fragmenty restrykcyjne rozdzielano elektroforetycznie w 1 i 2% żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny (0,1

4. MATERIAŁY I METODY

µg/ml). Elektroforezę prowadzono w roztworze buforowym 1x TAE, przy napięciu 8 V/cm długości żelu.

Produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelach agarozowych z dodatkiem bromku etydyny (0,1 µg/ml). Elektroforezę prowadzono w roztworze buforowym 1x TAE, przy napięciu 8 V/cm długości żelu.

4.8.2. Białek

4.8.2.1. Warunki natywne

Wzorce masy cząsteczkowej białek

Odczynniki do elektroforetycznego rozdzielania białek

- **bufor 5x Tris-Glicyna*** (pH = 8,8): Tris-HCl 15,1 g, glicyna 94 g, woda destylowana do 1000 ml;
- **bufor do nanoszenia próbek białkowych w studzienki żelu:** 0,1% błękit bromofenolowy, 25% glicerol, 60 mM Tris-HCl (pH = 6,8);
- **I roztwór barwiący:** 5 mM ONPG, 20 mM K₂HPO₄-KH₂PO₄, (pH=7,0);
- **II roztwór barwiący:** Coomassie Brilliant Blue R (Sigma) 0,25 g, metanol 50 ml, kwas octowy 10 ml, woda destylowana 40 ml;

Odczynniki do przygotowania żelu poliakrylamidowego:

- 30% roztwór akrylamidów: akrylamid (Sigma) 29 g, N,N'-metylenobisakrylamid (Sigma) 1 g, woda destylowana do 100 ml;
- 1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8);
- 1 M Tris-HCl (pH = 6,8);
- 10% nadsiarczan amonu;
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametylo-etylenodiamina).

Skład 8% żelu poliakrylamidowego rozdzielającego (5 ml):

woda destylowana	2,45 ml,
30% roztwór akrylamidów	1,2 ml,
1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)	1,3 ml,
10% nadsiarczan amonu	0,05 ml,
TEMED	0,002 ml.

4. MATERIAŁY I METODY

Skład 5% żelu poliakrylamidowego zagęszczającego (2 ml):

woda destylowana	1,4 ml,
30% roztwór akrylamidów	0,33 ml,
1,0 M Tris-HCl (pH = 6,8)	0,25 ml,
10% nadsiarczan amonu	0,02 ml,
TEMED	0,002 ml.

Elektroforezę prowadzono według metody Laemmli⁸⁴, w 8% żelach rozdzielających i 5% żelach zagęszczających, w buforze 1x Tris-Glicyna, przy napięciu 25 V/cm długości żelu, w żelu zagęszczającym i 20 V/cm długości żelu, w żelu rozdzielającym. Rozdział elektroforetyczny kończono w momencie, kiedy barwnik osiągał koniec żelu. Żele barwiono w I roztworze barwiącym przez 30 min, a następnie barwiono w II roztworze barwiącym, po czym odbarwiano w roztworze odbarwiającym przez około 6-8 h.

4.8.2.2. Warunki denaturujące

Wzorce masy cząsteczkowej białek

- **O'Page Ruler** o wielkości białek wzorcowych: 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 kDa, (Fermentas);

Odczynniki do elektroforetycznego rozdzielania białek

- **bufor 5x Tris-Glicyna** (pH = 8,8): Tris-HCl 15,1 g, glicyna 94 g, 10% SDS 50 ml, woda destylowana do 1000 ml;
- **bufor do nanoszenia próbek białkowych w studzienki żelu**: 0,1% błękit bromofenolowy, 25% glicerol, 2% SDS, 14,4 mM 2-merkaptoetanol, 60 mM Tris-HCl (pH = 6,8);
- **roztwór barwiący**: Coomassie Brilliant Blue R (Sigma) 0,25 g, metanol 50 ml, kwas octowy 10 ml, woda destylowana 40 ml;
- **roztwór odbarwiający**: metanol 200 ml, kwas octowy 100 ml, woda destylowana 800 ml;

4. MATERIAŁY I METODY

Odczynniki do przygotowania żelu poliakrylamidowego:

- 30% roztwór akrylamidów: akrylamid (Sigma) 29 g, N,N'-metylenobisakrylamid (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'-tetrametylo-etylenodiamina).

Skład 12% żelu poliakrylamidowego rozdzielającego (5 ml):

woda destylowana	1,6 ml,
30% roztwór akrylamidów	2,0 ml,
1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8)	1,3 ml,
10% SDS	0,05 ml,
10% nadsiarczan amonu	0,05 ml,
TEMED	0,002 ml.

Skład 5% żelu poliakrylamidowego zagęszczającego (2 ml):

woda destylowana	1,4 ml,
30% roztwór akrylamidów	0,33 ml,
1,0 M Tris-HCl (pH = 6,8)	0,25 ml,
10% SDS	0,02 ml,
10% nadsiarczan amonu	0,02 ml,
TEMED	0,002 ml.

Elektroforezę prowadzono według metody Laemmli⁸⁴, w 12% żelach rozdzielających i 5% żelach zagęszczających, w buforze 1x Tris-Glicyna, przy napięciu 25 V/cm długości żelu, w żelu zagęszczającym i 20 V/cm długości żelu, w żelu rozdzielającym. Rozdział elektroforetyczny kończono w momencie, kiedy barwnik osiągał koniec żelu. Żele barwiono w roztworze barwiącym przez 30 min, a następnie odbarwiano w roztworze odbarwiającym przez około 6-8 h.

4.9. Amplifikacja fragmentów DNA z zastosowaniem techniki PCR

Odczynniki do reakcji PCR

- **10x PCR bufor***Pwo*: 200 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 100 mM KCl, 1% Triton X-100;
- **MgCl₂** 50 mM;
- **trifosforany deoksyrybonukleozydów** (dNTPs): 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP (Sigma);
- **startery:**

Odpowiednio zaprojektowane w stężeniu 10 μM.

- **DNA matrycowe:** DNA genomowe *S. cerevisiae* EthanolRed, 220 μg/ml; DNA genomowe *P. pastoris* GS115 200 μg/ml, DNA genomowe *P. stipitis* 250 μg/ml, DNA plazmidowe 200 μg/ml;
- **polimeraza DNA Hypernova** 3 U/μl (BLIRT S.A. Dział DNA-Gdańsk).

Tabela 6. Parametry reakcji PCR

<i>Dane wejściowe</i>			<i>Wartości docelowe</i>		
Rodzaj matrycy	plazmidowe lub genomowe DNA				
Stężenie matrycy	<i>odpowiednio</i>	µg/µl	Stężenie matrycy	0,0016	µg/µl
Nazwa startera	<i>Odpowiednio</i>				
Stężenie startera	10	µM	Stężenie startera	0,2	µM
Nazwa startera	<i>Odpowiednio</i>				
Stężenie startera	10	µM	Stężenie startera	0,2	µM
Polimeraza	Pwo				
Stężenie polimerazy	2	U/µl	Stężenie polimerazy	0,04	U/µl
Stężenie dNTPs	10	mM	Stężenie dNTPs	0,2	mM
Stężenie Mg ²⁺	50	mM	Stężenie Mg ²⁺	3,4	mM
Roztwór buforowy	10	krotnie	Roztwór buforowy	1	krotnie

Skład mieszaniny

DNA matrycowe	2	µl
Bufor	25	µl
dNTPs	5	µl
Mg ²⁺	17	µl
Starter forward	5	µl
Starter rewers	5	µl
Hypernova	5	µl
H ₂ O	186	µl
Objętość końcowa	250	µl

Profil temperaturowo-czasowy

95°C	3	min	}	5
95°C	1	min		
optymalna temperatura	1	min		
72°C	2	min	}	25
95°C	1	min		
64°C	1	min		
optymalna temperatura	2	min		
72°C	5	min		
4°C				

Termocykler Biometra Professional

4.10. Sekwencjonowanie DNA plazmidów rekombinantowych

DNA plazmidów rekombinantowych precypitowano z objętości 250 - 500 µl. Osadu nie rozpuszczano. Sekwencjonowanie insertów plazmidów

4. MATERIAŁY I METODY

rekombinantowych zlecono firmie AGOWA GmbH Sequencing Service, Berlin, Niemcy.

4.11. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Enzymy restrykcyjne (Fermentas, Litwa)

Tabela 7. Enzymy restrykcyjne wykorzystywane w badaniach.

Enzym	Sekwencja rozpoznania	Bufor	Temperatura	Aktywność
			[°C]	[U/μl]
<i>Acc65I</i>	5'-G↓GTACC-3'	O ⁺	37	10
<i>AflIII</i>	5' C↓TTAAG 3'	4+1xBSA	37	20
<i>BamHI</i>	5' G↓GATCC 3'	Bufor BamHI	37	10
<i>BglII</i>	5' A↓GATCT 3'	O ⁺	37	10
<i>Bsp119I</i>	5' TT↓CGAA 3'	Y ⁺ /Tango™	37	10
<i>EcoRI</i>	5' G↓AATTC 3'	Bufor EcoRI	37	10
<i>Ecl116I</i> (EcoICRI)	5' GAG↓CTC 3'	Bufor Ecl116I	37	10
<i>EheI</i>	5' GGC↓GCC 3'	Y ⁺ /Tango™	37	10
<i>HindIII</i>	5' A↓AGCTT 3'	R ⁺	37	10
<i>NcoI</i>	5' C↓CATGG 3'	Y ⁺ /Tango™	37	10
<i>PfoI</i>	5' T↓CCNGGA3'	Y ⁺ /Tango™	37	10
<i>Sall</i>	5' G↓TCGAC 3'	O ⁺	37	10
<i>SmaI</i>	5' CCC↓GGG 3'	Y ⁺ /Tango™	30	10
<i>XbaI</i>	5' T↓CTAGA 3'	Y ⁺ /Tango™	37	10
<i>XmaI</i> (AvrII)	5' C↓CTAGG 3'	Y ⁺ /Tango™	37	10
<i>XhoI</i>	5' C↓TCGAG 3'	R ⁺	37	10

Roztwory buforowe do trawienia enzymami restrykcyjnymi (Fermentas):

- **1x bufor BamHI:** 10 mM Tris-HCl (pH 8,0 at 37°C), 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,02% Triton X-100, 1 mM 2-merkaptoetanol, 0,1 mg/ml BSA;
- **1x bufor O⁺:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1mg/ml BSA;
- **1x bufor EcoRI:** 50 mM Tris-HCl (pH 7,5 at 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,02% Triton X-100, 0,1mg/ml BSA;
- **1x bufor R⁺:** 10 mM Tris-HCl (pH = 8,5 w 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA;
- **1x bufor Y⁺/Tango™:** 33 mM Tris-CH₃COOH (pH = 7,9 w 37°C), 10 mM (CH₃COO)₂Mg, 66 mM CH₃COOK, 0,1 mg/ml BSA.

4. MATERIAŁY I METODY

- **1x bufor 4:** 200 mM Tris-kwas octowy; 500 mM octan potasu; 100 mM octan magnezu; 10 mM Dithiothreitol.
- **100x BSA:** 10mg/ml BSA

Objętość mieszanin reakcyjnych wynosiła 25 – 50 μ l i uzależniona była od stężenia DNA. Do trawienia używano po 10 U enzymów. Bufor reakcyjny i temperaturę trawienia dobierano, dla każdej z użytych restryktaz, zgodnie ze wskazówkami dostarczonymi przez producenta enzymu. Inkubacja mieszanin reakcyjnych trwała 1,5 – 12 h. W przypadku jednoczesnego trawienia dwoma enzymami restrykcyjnymi, bufor reakcyjny dobierano zgodnie ze wskazówkami sugerowanymi przez producenta.

4.12. Reakcja ligacji fragmentów DNA

Odczynniki do reakcji ligacji (Epicentre, USA):

- DNA ligaza faga T4 2 U/ μ l;
- 10x bufor reakcyjny: 330 mM Tris- CH_3COOH (pH = 7,8), 100 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 660 mM CH_3COOK , 5 mM DTT;
- 25 mM ATP.

Reakcję ligacji DNA prowadzono w objętości 25 μ l, przy użyciu 2 U ligazy faga T4, w 1x stężonym buforze reakcyjnym, z dodatkiem roztworu ATP (końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 1 mM). Stosunek ilościowy DNA insertu, np. odpowiedniego fragmentu DNA po trawieniu enzymami restrykcyjnymi (4.11) fragmentu DNA otrzymanego w wyniku reakcji PCR (4.9), do DNA wektora plazmidowego trawionego odpowiednimi restryktazami wynosił molarnie 3:1. Reakcję prowadzono w temperaturze 16°C przez 3 h.

4.12.1. Klonowanie produktów PCR w wektorze pCRZeroBlunt

W celu szybkiego klonowania produktów reakcji PCR, oczyszczano produkty bezpośrednio z mieszaniny poreakcyjnej (4.6.4). bądź rozdzielano elektroforetycznie w żelu agarozowym (4.8) i oczyszczano z prążka agarozy (4.6.3). Następnie postępowano zgodnie z zaleceniami producenta zestawu pCR-ZeroBlunt Cloning Kit

4. MATERIAŁY I METODY

(Invitrogen) otrzymując odpowiedni plazmid rekombinantowy zawierający klonowany insert.

4.12.2. Klonowanie fragmentów DNA

Fragmenty DNA uzyskane po trawieniu enzymami restrykcyjnymi oczyszczano (4.6.4) i klonowano w DNA odpowiednio przygotowanych wektorów stosując standardowe warunki ligacji fragmentów DNA.

4.12.3. Biblioteka DNA

Reakcję ligacji DNA w przypadku konstrukcji biblioteki DNA prowadzono w objętości 25 μ l, przy użyciu 4 U ligazy faga T4, w 1x stężonym buforze reakcyjnym, z dodatkiem roztworu ATP (końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 3,75 mM). Używano 5 μ g genomowego DNA do trawienia enzymami restrykcyjnymi (4.11), które potem oczyszczano na drodze precypitacji etanolowej (4.13) i całość wykorzystywano w reakcji ligacji (4.12) z ok. 4 μ g przygotowanego DNA wektora. Reakcję prowadzono w temperaturze 16°C przez 1 h.

4.13. Precypitacja DNA

Odczynniki do precypitacji DNA

- 3 M roztwór buforowy $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$ (pH = 5,2);
- wzmacniacz precypitacji (A&A Biotechnology, Polska);
- 99,7% izopropanol;
- 80% etanol;
- TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH = 8,0).

DNA zagęszczano stosując precypitację. Do danej objętości próbki DNA dodawano 0,1 jej objętości 3 M roztworu buforowego $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$ oraz 1 objętość zmrożonego 99,7% izopropanolu o temperaturze -20°C . Mieszaninę pozostawiano na 1 - 2 h w temperaturze -20°C , a następnie wirowano przez 10 min przy 13500xg. Supernatant odrzucano, a do osadu dodawano 0,5 ml 80% etanolu o temperaturze -20°C i wirowano (3 min, 13500xg). Następnie DNA suszono w temperaturze pokojowej i zawieszano w odpowiedniej ilości roztworu buforowego TE lub jałowej wody destylowanej.

4. MATERIAŁY I METODY

Do wszystkich operacji wirowania używano wirówki Sigma 1–15 (Sigma).

4.14. Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli*.

Komórki kompetentne *E. coli* przygotowywano według procedury opisanej w książce protokołów laboratoryjnych⁸⁵.

4.15. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* plazmidowym DNA

Transformację komórek kompetentnych *E. coli* wykonywano według metody opisanej w książce protokołów laboratoryjnych⁸⁵.

4.16. Otrzymanie plazmidów rekombinantowych pSach424- α -gal22b, pSach424-STA2-gal22b oraz pSach424-PHO5-gal22b

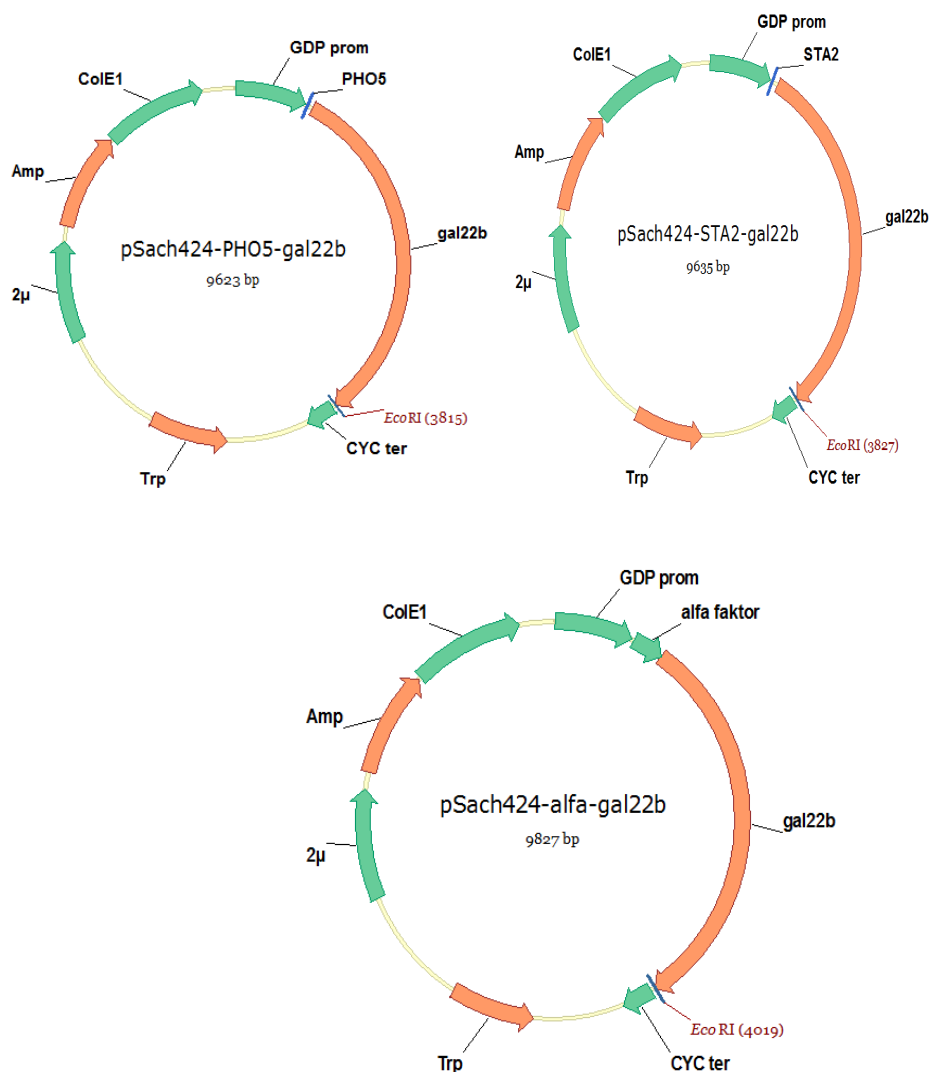
W celu konstrukcji plazmidów rekombinantowych pSach424 (4.2) zawierających pod kontrolą promotora konstytutywnego pGDP gen β -D-galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b z fuzją translacyjną sekwencji sekrecyjnej (alfa-faktor *S. cerevisiae*, PHO5 *S. cerevisiae* lub STA2 *S. cerevisiae*) na N końcu polipeptydu, przeprowadzono reakcję PCR (4.9) na matrycy DNA plazmidu rekombinantowego pET22beta (4.2) z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów oligonukleotydowych na podstawie zdeponowanych w bazie NCBI sekwencji nukleotydowych:

- sekwencja sekrecyjna alfa faktor – Genbank: AAD34862,
- sekwencja sekrecyjna STA2 - Genbank: P29760,
- sekwencja sekrecyjna PHO5 – Genbank: NP_009651,
- gen β -D-galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b – Genbank: AY498873.

Ze względu na znaczną długość sekwencji liderowej STA2 oraz alfa faktora przeprowadzono dwie reakcje PCR, gdzie w pierwszej przyłączano jedynie fragment sekwencji liderowej. Otrzymane finalne produkty PCR klonowano w DNA wektora pSach424 w miejsca restrykcyjne *Sma*I i *Eco*RI (4.11). W ten sposób otrzymano odpowiednie plazmidy rekombinantowe, zawierające pod kontrolą promotora konstytutywnego pGDP gen β -D-galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b z fuzją translacyjną sekwencji sekrecyjnej PHO5, STA2 i α -faktora na N końcu polipeptydu,

4. MATERIAŁY I METODY

odpowiednio pSach424-PHO5-gal22b, pSach424-STA2-gal22b i pSach424-alfa-gal22b (Rys. 6).



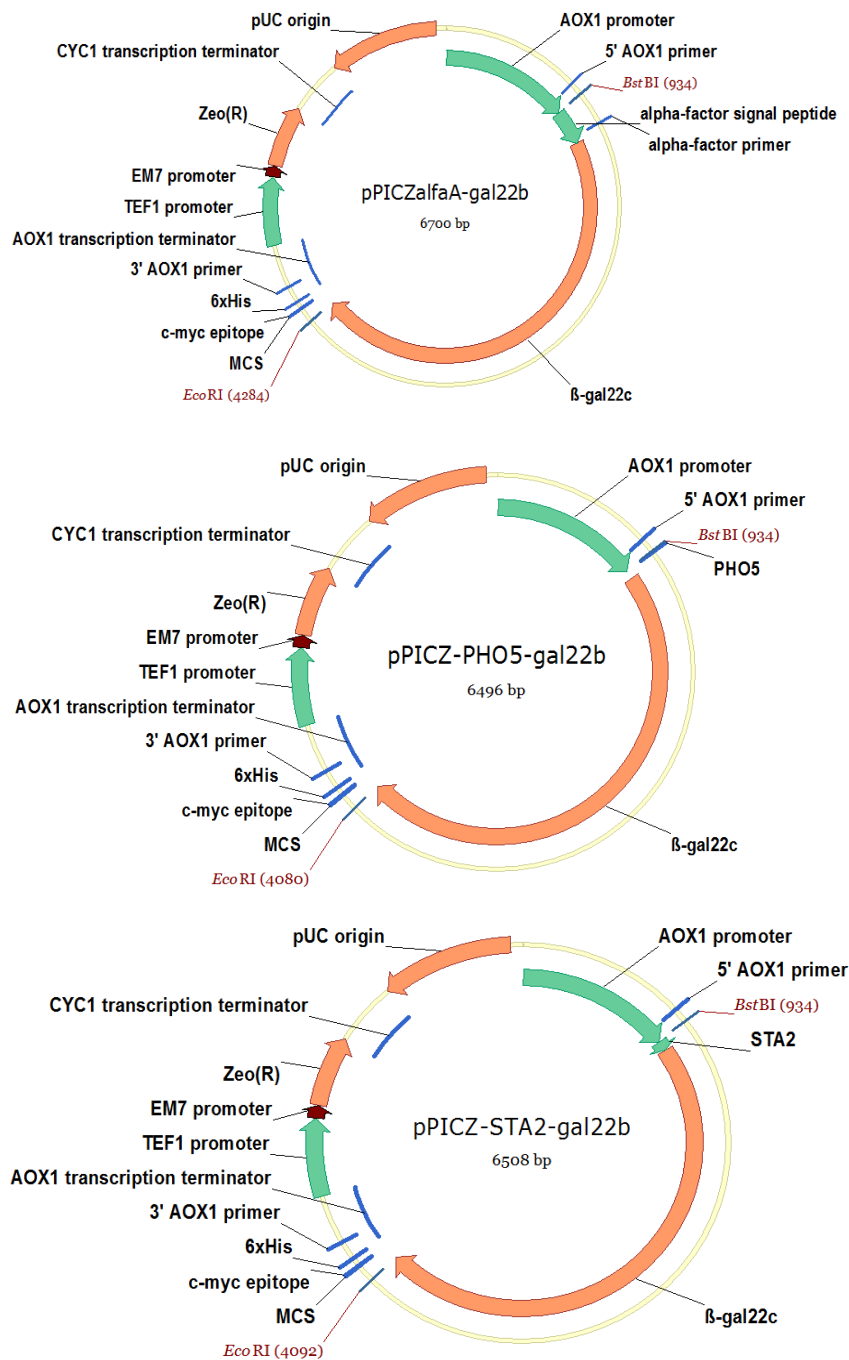
Rys. 6. Mapy plazmidów rekombinantowych pSach424-PHO5-gal22b, pSach424-STA2-gal22b i pSach424-alfa-gal22b.

4.17. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych pPICZalfa-gal22b, pPICZ-STA2-gal22b oraz pPICZ-PHO5-gal22b

W celu konstrukcji plazmidów rekombinantowych pPICZ-„sekwencja sygnałna” zawierających pod kontrolą promotora konstytutywnego AOX1 gen β -D-galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b z fuzją translacyjną sekwencji sekrecyjnej (alfa-faktor *S. cerevisiae*, PHO5 *S. cerevisiae* lub STA2 *S. cerevisiae*) na N końcu polipeptydu, przeprowadzono reakcje PCR (4.9) na matrycy DNA odpowiedniego

4. MATERIAŁY I METODY

plazmidu rekombinantowego pSach424-PHO5-gal22b, pSach424-STA2-gal22b lub pSach424-alfa-gal22b (4.16) z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów oligonukleotydowych. Produkty PCR klonowano w DNA wektora pPICZalfaA (4.2) w miejsca restrykcyjne *Bsp119I* oraz *EcoRI* (4.10) otrzymując plazmidy rekombinantowe pPICZalfa-gal22b, pPICZ-STA2-gal22b oraz pPICZ-PHO5-gal22b, rys. 7.



Rys. 7. Mapy plazmidów rekombinantowych pPICZalfa-gal22b, pPICZ-STA2-gal22b oraz pPICZ-PHO5-gal22b.

4. MATERIAŁY I METODY

4.18. Transformacja komórek kompetentnych *S. cerevisiae* plazmidowym DNA

Komórki kompetentne *S. cerevisiae* BMA64-1A, *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1, przygotowano przy użyciu zestawu S.c. EasyComp™ Transformation Kit (Invitrogen), według procedury zalecanej przez producenta. Transformację kompetentnych komórek drożdżowych plazmidowym DNA w formie liniowej lub kolistej wykonano z zastosowaniem tego samego zestawu. Komórki wysiewano na odpowiednie podłoże i inkubowano w cieplarni, w temperaturze 30°C przez 3 dni.

4.19. Transformacja komórek kompetentnych *P. pastoris* plazmidowym DNA

Komórki kompetentne *Pichia pastoris* GS115 przygotowano przy użyciu zestawu *Pichia* EasyComp™ Kit (Invitrogen), według procedury zalecanej przez producenta. Transformację kompetentnych komórek drożdżowych plazmidowym DNA w formie liniowej wykonano z zastosowaniem tego samego zestawu. Komórki wysiewano na podłoże YPDS z dodatkiem zeocyny (100 µg/ml) i inkubowano w cieplarni, w temperaturze 30°C przez 3 dni.

4.20. Izolacja szczepów psychrotrofowych z gleby antarktycznej produkujących β-D-galaktozydazę

5g gleby naważano i zawieszano w 50 ml roztworu soli morskiej w stężeniu 1% wagowo. Następnie worteksowano zawiesinę przez 1 min i dekantowano. 100µl supernatantu wysiewano na podłoże LAS zawierające X-gal (20µg/ml) i inkubowano w temperaturze 18°C przez 3 dni. Kolonie zabarwione na kolor niebieski wielokrotnie przesiewano redukcynnie na identyczne podłoże, do uzyskania czystej kultury bakterii.

4.21. Izolacja białek natywnych z komórek bakterii psychrotrofowych

Bakterie psychrotrofowe hodowano w pożywce LOS (4.3) w temperaturze 18°C w wytrząsarce powietrznej przez 48 h. Następnie oddzielano komórki od płynu pohodowlanego na drodze wirowania przy 4000xg, przez 10 min. Supernatant odrzucano, osady zawieszano w buforze fosforanowym pH=7,0 (KH₂PO₄-K₂HPO₄). Na zawiesiny komórek działano lizozymem (10 mg/ml) i inkubowano przez 20 min w

4. MATERIAŁY I METODY

temperaturze 30°C. Następnie intensywnie worteksowano zawiesinę i przeprowadzano jeden cykl dezintegracji przy amplitudzie drgań 5 µm przez 1 min.

4.22. Określenie aktywności biochemicznej szczepu 32c

W celu określenia zdolności szczepu 32c do metabolizmu różnych substratów będących w zainteresowaniu nowoczesnej biotechnologii, szczep ten przesiewano na podłoże AMYL – aktywność amylolityczna, LAS – aktywność β-D-galaktozydazy, LASara – aktywność izomerazy arabinozowej, PROT – aktywność proteolityczna, CEL – aktywność celulozolityczna.

4.23. Charakterystyka wzrostu szczepu psychrotrofowego 32c

Bakterie psychrotrofowe hodowano w pożywce LOS w temperaturze 18°C w wytrząsarce powietrznej przez 24 h, po czym 1 ml hodowli zaszczepiano 50 ml pożywki LOS i prowadzono hodowlę przez kolejne 72 h, pobierając codziennie próbki celem oznaczenia gęstości optycznej (OD₆₀₀).

4.24. Hybrydyzacja 2 produktów PCR celem wykształcenia lepkiego końca

Przeprowadzono dwie reakcje PCR na tej samej matrycy DNA z wykorzystaniem par starterów, gdzie starter komplementarny do 5' końca genu zawierał lub nie dodatkowe nukleotydy dobrane tak aby w wyniku hybrydyzacji jednoniciowych cząsteczek dwóch różnych reakcji PCR było możliwe wykształcenie lepkiego końca pozostawianego przez dany enzym restrykcyjny.

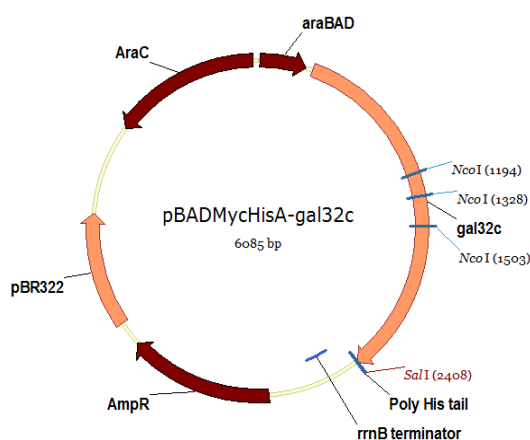
Otrzymane produkty PCR oczyszczano na drodze precypitacji etanolowej (4.13) i zawieszano w roztworze TE. Następnie mieszano produkty ze sobą w stosunku 1:1 stosując jednokrotnie stężony roztwór buforowy Y⁺ (4.10). Mieszaninę ogrzewano denaturując dsDNA w 96°C przez 3 min, a następnie powoli (0,2°C/s) oziębano do temperatury pokojowej.

4.25. Konstrukcja plazmidu rekombinantowego pBADMycHisA-gal32c

W celu konstrukcji układu ekspresyjnego do biosyntezy β-D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c, ze względu na obecność miejsca rozpoznania dla restryktazy NcoI wewnątrz sekwencji kodującej białko *Arthrobacter* sp. 32c, przeprowadzono 2

4. MATERIAŁY I METODY

reakcje PCR, tak aby po hybrydyzacji (4.24) otrzymanych produktów reakcji PCR możliwe było wygenerowanie takiego lepkiego końca jak pozostawiany jest po trawieniu enzymem *NcoI*. W tym celu przeprowadzono reakcje PCR na matrycy plazmidu bibliotecznego pBAD- β -gal32c (5.2.3) z wykorzystaniem starterów oligonukleotydowych odpowiednio zaprojektowanych na podstawie zdeponowanego w bazie NCBI (FJ609657) genu β -D-galaktozydazy, (4.9). Otrzymane produkty reakcji PCR oczyszczano (4.6.4) i mieszano ilościowo ze sobą w stosunku 1:1. Następnie fragmenty DNA hybrydyzowano (4.24). Tak otrzymane fragmenty DNA trawiono enzymem restrykcyjnym *SalI* (4.10) i klonowano (4.12.2) w DNA wektora pBADmycHISA (4.2) trawionego enzymami restrykcyjnymi *NcoI* i *SalI* (4.10). Fragmenty DNA ligowano (4.12) i mieszaniną ligacyjną transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP10F' (4.15). Uzyskane rekombinanty hodowano w pożywce LB zawierającej dodatek ampicyliny, a następnie izolowano plazmidowe DNA (4.6.2). W ten sposób otrzymano plazmid rekombinantowy pBADMycHisA-gal32c pozwalający na biosyntezę enzymu w układzie arabinozowym *E. coli*, Rys. 8.



Rys. 8. Mapa plazmidu rekombinantowego pBADMycHisA-gal32c.

4.26. Ekspresja genu β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c

Plazmidowym DNA pBADMycHisA-gal32c transformowano komórki kompetentne *E. coli* LMG194 plynN (4.15). Powstałe rekombinanty *E. coli* LMG194 plynN pBAD β gal32c używano do biosyntezy β -D-galaktozydazy. 20 ml hodowli nocnej *E. coli* plynN pBAD- β -D-gal32c zaszczipiano 980 ml pożywki LB zawierającej dodatek antybiotyków ampicyliny (100 μ g/ml) i chloramfenikolu (34 μ g/ml). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C w wytrząsarce powietrznej przy 220 rpm do

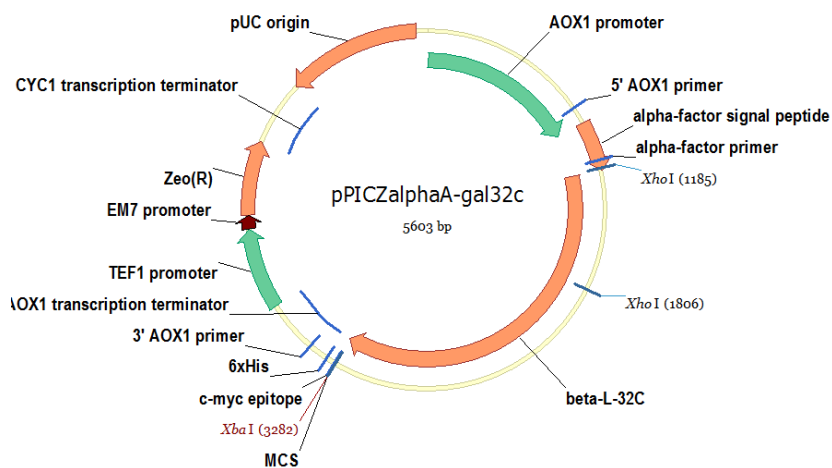
4. MATERIAŁY I METODY

osiągnięcia przez bakterie OD_{600} ok. 0,5. Następnie indukowano ekspresję genu β -D-galaktozydazy dodając arabinozy do końcowego stężenia w pożywce 0,2%. Hodowle prowadzono jeszcze przez 4 h, po czym oddzielano komórki od płynu pochodzącego na drodze wirowania $4000\times g$, przez 10 min. Osad zawieszano w 20 ml 20 mM buforu fosforanowego (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) pH=7,0 i zamrażano w $-20^\circ C$. Następnie rozmrażano zawiesinę komórek w temperaturze pokojowej przez 30 min, po czym przeprowadzano jeden cykl dezintegracji, przy amplitudzie drgań $5\ \mu m$, przez 1 min. Frakcje nierozpuszczalne oddzielano na drodze wirowania przy $17000\times g$, przez 10 min, w temperaturze $4^\circ C$ (Sigma 1-30K). Supernatant wykorzystywano do oczyszczania β -D-galaktozydazy.

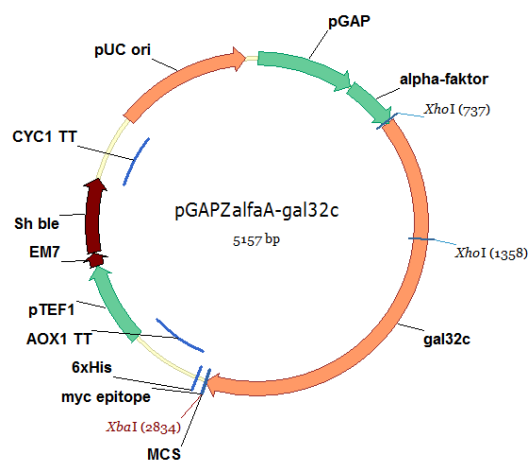
4.27. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych pPICZalfa-gal32c i pGAPZalfa-gal32c

W celu konstrukcji plazmidów rekombinantowych, na podstawie sekwencji genu zdeponowanej w bazie NCBI (FJ609657) zaprojektowano odpowiednie startery oligonukleotydowe. Przy wykorzystaniu zaprojektowanych starterów otrzymano produkt PCR, który klonowano (4.12.2) w miejsca *XhoI* i *XbaI* (4.10) wektora pPICZalphaA i pGAPZalphaA (4.2). Ze względu na obecność miejsca restrykcyjnego *XhoI* w obrębie genu enzymu należało wykształcić lepki koniec pozostawiany po trawieniu enzymem *XhoI*. Postępowano podobnie jak opisano w punkcie 4.24. Otrzymane plazmidy rekombinantowe pPICZalphaA-gal32c (Rys. 9) i pGAPZalphaA-gal32c (Rys. 10) wykorzystywano w transformacji komórek kompetentnych *P. pastoris* GS115 (4.19).

4. MATERIAŁY I METODY



Rys. 9. Mapa plazmidu rekombinantowego pPICZalphaA-gal32c.



Rys. 10. Mapa plazmidu rekombinantowego pGAPZalphaA-gal32c.

4.28. Produkcja β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c przez drożdże *P. pastoris* GS115

Komórki drożdży *P. pastoris* transformowanych DNA plazmidów pPICZ α A-32c β -gal hodowano w 100 ml pożywki płynnej BMGY (4.3) przez 18 h, w temp. 30°C, w wytrząsarce powietrznej. Następnie hodowle wirowano (5 min, 1500 obr./min, Sigma 6K-18), a uzyskane osady komórkowe zawieszano w 50 ml pożywki BMMY (4.3). Zawiesinami zaszczepiano po 950 ml pożywki BMMY. 1000 ml hodowli dzielono na 4 porcje po 250 ml i hodowano przez 4 doby w temperaturze 30°C, dodając raz na dobę 100% metanolu, do końcowego stężenia w pożywce 0,5%. Komórki drożdży oddzielano od płynu hodowlanego poprzez wirowanie (10 min, 5000 obr./min, Sigma 6K-18). W przypadku hodowli komórek *P. pastoris*

4. MATERIAŁY I METODY

transformowanych DNA plazmidu rekombinantowego, do dalszych badań wykorzystywano osad komórkowy jak i pożywkę pohodowlaną.

Komórki drożdży *P. pastoris* transformowanych DNA plazmidu pGAPZ α A-32c β -gal hodowano w 100 ml pożywki płynnej YPD (4.3) przez 18 h, w temp. 30°C, w wytrząsarce powietrznej. Następnie całą hodowlę dodawano do 900 ml świeżej pożywki YP (4.3) z dodatkiem 2%, 4% glukozy lub 2%, 4% glicerolu odpadowego lub SER i zawiesinę dzielono na 4 porcje po 250 ml. Drożdże hodowano przez kolejne 2 doby w temperaturze 30°C. Następnie dodawano glukozy/glicerolu odpadowego do hodowli w pożywce YP do stężenia końcowego w pożywce 2% lub 4% i prowadzono hodowlę przez kolejne 2 doby. W przypadku pożywki SER hodowlę prowadzono przez 4 doby. Po upływie tego czasu zawiesinę komórek wirowano (10 min, 5000 obr./min, 6K-18). Do dalszych badań wykorzystywano osad komórkowy jak i pożywkę pohodowlaną, uzyskany osad przechowywano w -20°C.

4.28.1. Optymalizacja produkcji β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c przez drożdże *P. pastoris* GS115 w układzie konstytutywnym

Otrzymany szczep rekombinantowy *P. pastoris* GS115 pGAPZ α A-gal32c hodowano w 50 ml pożywki YPG_{1/2} (4.3) przez 24 h w temperaturze 30°C. Następnie hodowlą nocną drożdży zaszczipiano 500 ml pożywki SER lub YPG. W celu optymalizacji produkcji zewnątrzkomórkowej stosowano różne stężenia glicerolu i glicerolu odpadowego jako dodatku do hodowli po 2 dobach hodowli, w przypadku pożywki YPG. Pożywki YPG zawierały dodatek 5 mM CaCl₂, natomiast nie było potrzeby dodawania CaCl₂ w przypadku pożywki SER, gdyż jony wapniowe występują w serwatce. Hodowlę prowadzono przez 4 doby, a następnie oddzielano masę komórkową z płynu pohodowlanego. β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp.32c obecną w supernatancie oznaczano na podstawie pomiaru aktywności (4.29)

4.29. Oznaczenie aktywności β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c

Odczynniki do oznaczania aktywności β -D-galaktozydazy

- 5 mM ONPG (*o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozyd) (Sigma);

4. MATERIAŁY I METODY

- 1 M Na₂CO₃
- Bufory:
 - 20 mM bufor cytrynianowo-fosforanowo-potasowy pH=4,5
 - 20 mM bufor cytrynianowo-fosforanowo-potasowy pH=5,5
 - 20 mM bufor fosforanowo-potasowy pH=6,5
 - 20 mM bufor fosforanowo-potasowy pH=7,0
 - 20 mM bufor fosforanowo-potasowy pH=7,5
 - 20 mM Tris-HCl pH=8,5
 - 20 mM NaOH-Gly pH=9,5

β -D-galaktozydaza katalizuje reakcję hydrolizy wiązania β -1,4-glikozydowego w *o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydzie (ONPG), co prowadzi do powstania barwnego produktu *o*-nitrofenolu (żółty), wykazującego maksimum absorpcji przy $\lambda = 420$ nm.

Oznaczenie aktywności β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c wykonano według następującej procedury:

1. umieszczono probówki z odciętymi wieczkami o pojemności 0,2 ml w termobloku termocyklera gradientowego,
2. do każdej probówki dodano 0,1mg β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp.32c,
3. doprowadzono temperaturę termobloku do zadanej,
4. analizowano zakres temperatury od 0,1 do 60,0 °C,
5. reakcję zapoczątkowano przez dodanie 0,1 ml roztworu ONPG (0,8 mg/ml roztworu buforowego o danym pH),
6. mieszaninę reakcyjną inkubowano w danej temperaturze przez 10 min,
7. reakcję zatrzymywano przez dodanie 1 ml zimnego 1 M roztworu węglanu sodu do mieszaniny reakcyjnej,
8. następnie zmierzono absorpcję mieszaniny poreakcyjnej przy $\lambda = 405$ nm.

Pomiary spektrofotometryczne wykonano za pomocą czytnika mikroplętek VictorV3 (Chembiofarm, PG, Gdansk, Polska).

Jedna jednostka aktywności β -D-galaktozydazy określana jest jako taka ilość białka, która uwalnia 1 nmol *o*-nitrofenolu z ONPG w ciągu 1 min w warunkach prowadzenia reakcji [96]. Stężenie uwolnionego *o*-nitrofenolu (ONP) wyznaczano na

4. MATERIAŁY I METODY

podstawie krzywej wzorcowej $A_{405} = f([\text{ONP}])$. Stężenie białka oznaczano metodą Bradford (2.32).

W celu oznaczenia aktywności β -D-galaktozydazy w obecności dwuwartościowych jonów metali, do roztworu ONPG w 20 mM buforze fosforanowym (pH = 6,5) dodawano soli metali w takiej ilości, aby stężenie jonów K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} , w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 5 mM. Stosowano chlorki odpowiednich metali, a w przypadku miedzi użyto siarczynu. Następnie oznaczano aktywność enzymu według procedury opisanej w punkcie 2.29. W ten sam sposób postępowano w przypadku odczynników zawierających grupy tiolowe (końcowe stężenie 2-merkaptoetanolu, cysteiny i glutationu w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 5 mM) i EDTA oraz mocznika. Oznaczano również aktywność białka w obecności etanolu w stężeniu od 0 do 20 %.

4.30. Liofilizacja

Roztwór białka zamrażano w temperaturze -86°C przez 1 h, po czym poddawano suszeniu ze stanu zamrożenia pod zmniejszonym ciśnieniem.

4.31. Oczyszczanie β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c

Złoże do oczyszczania β -D-galaktozydazy

- *p*-aminobenzyl 1-thio- β -D-galactopyranoside-agarose (Sigma).

Roztwory buforowe do oczyszczania β -D-galaktozydazy

- **bufor A** (10 mM bufor fosforanowy o pH = 6,5): KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , woda destylowana 190 ml;
- **bufor A1**: 10 mM bufor fosforanowy (pH = 6,5), 10 mM NaCl;
- **bufor A2**: 10 mM bufor fosforanowy (pH = 6,5), 20 mM NaCl;
- **bufor A3**: 10 mM bufor fosforanowy (pH = 6,5), 40 mM NaCl;
- **bufor A4**: 10 mM bufor fosforanowy (pH = 6,5), 60 mM NaCl;
- **bufor E1**: 100 mM czteroboran sodu (pH = 10,0).

Oczyszczanie β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c metodą chromatografii powinowactwa

β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c otrzymaną z 1000 ml hodowli komórek rekombinowanych szczepów *E. coli* oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa według opisanej poniżej procedury:

1. 10 ml złoża agarozowego ze związonym p-aminobenzyl-1-tio- β -D-galaktopiranozydem przemywano buforem A (10 mM bufor fosforanowy o pH = 6,5). Stosowano 40 ml buforu.
2. Nanoszono na kolumnę 20 ml lizatu komórkowego *E. coli*,
3. Złoże przemywano buforami: A, A1, A2, A3 i A4 (po 30 ml każdego z buforów).
4. β -galaktozydazę eluowano 50 mM czteroboranem sodu o pH = 10 (3 razy po 10 ml buforu).

Po zastosowaniu złoże przemywano jałową wodą destylowaną i zawieszano w 20% roztworze etanolu.

Dializę prowadzono wobec 10 mM buforu fosforanowego (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) o pH = 6,5, woda destylowana do 2000 ml, przez 24 h, w temperaturze 4°C, przy delikatnym mieszaniu buforu za pomocą mieszadełka magnetycznego. Proces powtarzano dwukrotnie, używając po 2 litry buforu.

4.32. Oczyszczanie β -D-galaktozydazy z płynu pohodowlanego metodą wysalania białek

Płyn pohodowlany otrzymany po biosyntezie β -D-galaktozydazy wirowano przy 14000xg, przez 10 min w celu oddzielenia masy komórkowej. Supernatant wykorzystywano do dalszych badań, natomiast osad komórkowy odrzucano. β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c precypitowano w temperaturze 4°C stosując mieszanie, dodając siarczanu amonu w ilościach 5% w/vol/min do końcowego stężenia 60% w/vol w supernatancie. Mieszaninę pozostawiano w warunkach chłodniczych przez 20 min stosując mieszanie roztworu. Następnie precypitat białkowy wirowano w temperaturze 4°C, przy 21 000xg, przez 30 min. Supernatant odrzucano, natomiast osad białek rozpuszczano w wodzie w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór dializowano wobec 20 mM buforu fosforanowego o

4. MATERIAŁY I METODY

pH = 6,5 ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$), przez 24 h, w temperaturze 4°C. Proces powtarzano dwukrotnie używając po 2 litry roztworu buforowego.

4.33. Bradford

Odczynniki do oznaczania stężenia białka

- 75% kwas ortofosforowy;
- 96% etanol;
- Coomassie Brilliant Blue G (Sigma);
- BSA 10 mg/ml (New England BioLabs, Inc., Beverly, Massachusetts, USA);

➤ skład stężonego roztworu odczynnika Bradford:

- | | |
|------------------------------|--------|
| - 96% etanol | 10 ml, |
| - 75% kwas ortofosforowy | 20 ml, |
| - Coomassie Brilliant Blue G | 35 mg; |

➤ skład „roboczego” roztworu odczynnika Bradford:

- | | |
|---------------------------------------|---------|
| - stężony roztwór odczynnika Bradford | 30 ml, |
| - 75% kwas ortofosforowy | 30 ml, |
| - 96% etanol | 15 ml, |
| - woda destylowana | 425 ml. |

Stężenie białka oznaczano metodą Bradford [95]. Do 2 ml „roboczego” roztworu odczynnika Bradford dodawano 200 µl badanego preparatu i inkubowano 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie mierzono absorpcję mieszaniny przy $\lambda = 595$ nm. Stężenie białka wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla różnych stężeń BSA (albumina surowicy wołowej).

4.34. Sączenie molekularne

Wzorzec masy cząsteczkowej białek (Sigma)

- MW-GF-1000 Kit for Molecular Weights 29000 – 700000 zawierający:
 - dekstran o masie cząsteczkowej 2000 kDa;
 - białka:
 - tyroglobulina o masie cząsteczkowej 669 kDa,
 - apoferrytyna o masie cząsteczkowej 443 kDa,

4. MATERIAŁY I METODY

- β -amylaza o masie cząsteczkowej 223 kDa,
- dehydrogenaza alkoholowa o masie cząsteczkowej 150 kDa,
- albumina (BSA) o masie cząsteczkowej 66 kDa,

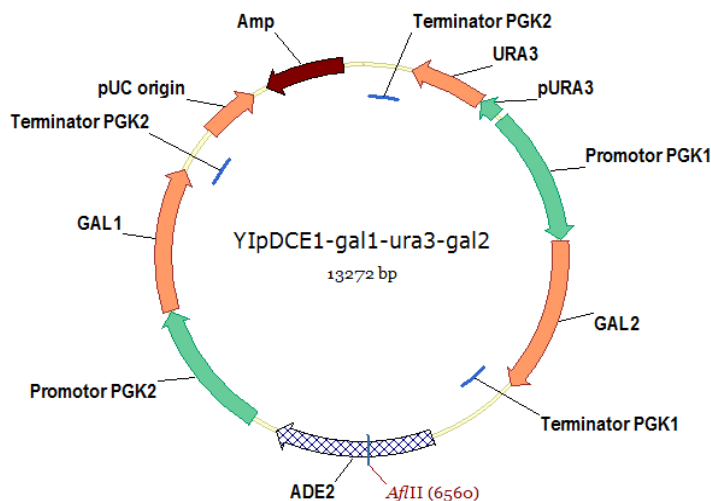
Masę cząsteczkową psychrotrofowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c dzikiego typu wyznaczano metodą analitycznej filtracji żelowej (sączenia molekularnego), na kolumnie Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Szwecja). Jako fazę ruchomą stosowano bufor fosforanowy o pH = 6,5 (10mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , 0,5M KCl). Prędkość przepływu buforu wynosiła 0,5 ml/min. Objętość nanoszonych na kolumnę prób wynosiła 200 μl .

4.35. Konstrukcja plazmidu YIpDCE1-gal1-ura3-gal2

W celu otrzymania plazmidu YIpDCE1-gal1-ura3-gal2 w pierwszej kolejności otrzymano fragment DNA zawierający sekwencję markera selekcyjnego URA3. Przeprowadzając reakcję PCR (4.9) na matrycy pYes2/CT (4.2) stosując odpowiednio zaprojektowane startery oligonukleotydowe otrzymano produkt, który klonowano (4.12.2) w DNA wektora YIpDCE1 (4.2) w miejsca restrykcyjne *PfoI* i *EheI* (4.10). Następnie klonowano otrzymany produkt reakcji PCR (4.9) przeprowadzonej na matrycy genomowego DNA drożdży *S.cerevisiae* BMA64-1A (4.3) z zastosowaniem starterów oligonukleotydowych zaprojektowanych na podstawie sekwencji genu *gal1* (NCBI: NM_001178368). Fragment DNA klonowano w miejsca *Acc65I* i *XmaII*. W trzecim etapie klonowano fragment DNA zawierający sekwencję genu *gal2* *S.cerevisiae* w miejsca restrykcyjne *SacI* i *SalI*. Fragment DNA otrzymano przeprowadzając reakcję PCR na matrycy genomowego DNA *S.cerevisiae* z zastosowaniem odpowiednio zaprojektowanych na podstawie sekwencji genu *gal2* (NCBI: NM_001181968) starterów oligonukleotydowych.

Mapę otrzymanego plazmidowego DNA przedstawiono na rysunku 11.

4. MATERIAŁY I METODY



Rys. 11. Mapa plazmidu YIpDCE1-gal1-ura3-gal2.

4.36. Test fermentacyjny szczepu zaadaptowanego do jednoczesnego metabolizmu glukozy i galaktozy

Otrzymany szczep drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2 hodowano w pożywce płynnej YPDG zawierającej w sumie 2% cukrów prostych (glukozy i galaktozy, lecz w różnych proporcjach). Stosowano 0,5% glukozy i 1,5% galaktozy, 1% glukozy i 1% galaktozy oraz 1,5% glukozy i 0,5% galaktozy. Fermentacje prowadzono w temperaturze 30°C w warunkach beztlenowych przez 4 dni.

4.37. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych pSach424-sekw.sygn-gen-β-D-galaktozydazy do zewnątrzkomórkowej produkcji β-D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c przez *S. cerevisiae*

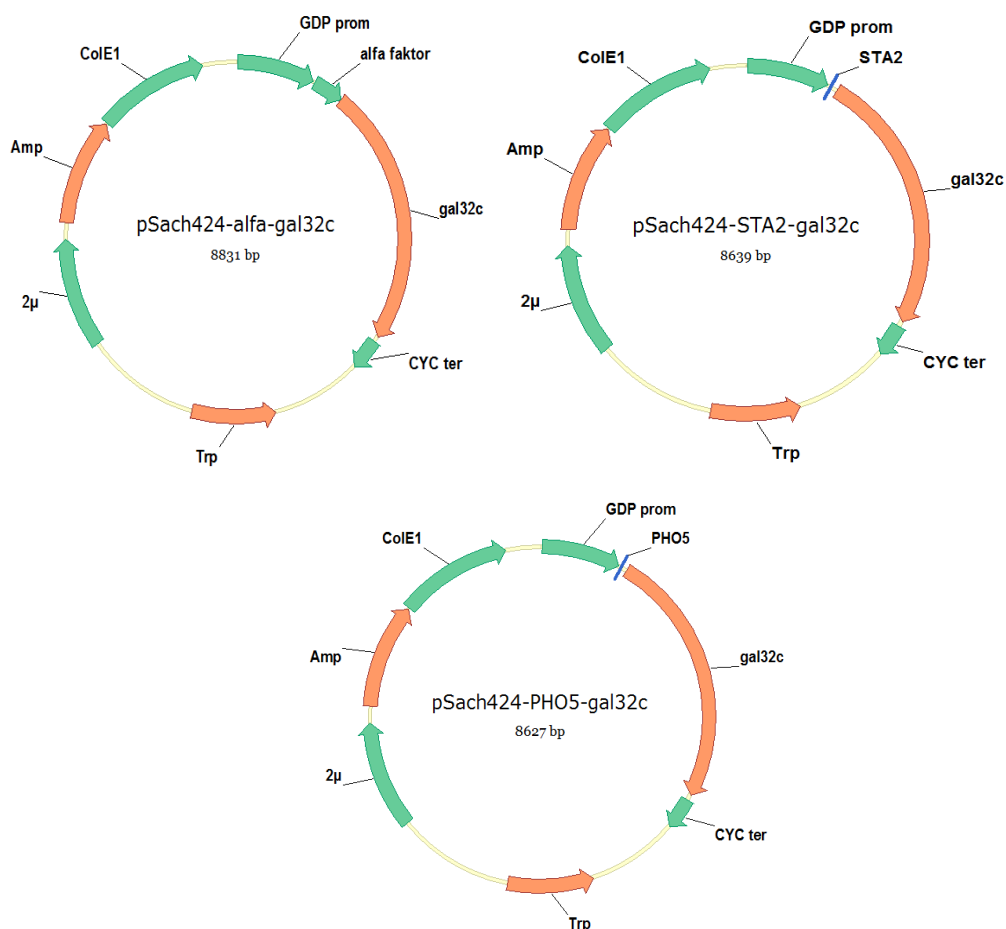
W celu konstrukcji plazmidów rekombinantowych pSach424 zawierających pod kontrolą promotora konstytutywnego pGDP gen β-D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c z fuzją translacyjną sekwencji sekrecyjnej (alfa-faktora *S. cerevisiae*, PHO5 *S. cerevisiae* lub STA2 *S. cerevisiae*) na N końcu polipeptydu, przeprowadzono reakcję PCR (4.9) na matrycy DNA plazmidu rekombinantowego pBADMyHisA-gal32c (5.2.4.1) z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów oligonukleotydowych na podstawie zdeponowanych w bazie NCBI sekwencji nukleotydowych:

- sekwencja sekrecyjna alfa faktora – Genbank: AAD34862,

4. MATERIAŁY I METODY

- sekwencja sekrecyjna STA2 - Genbank: P29760,
- sekwencja sekrecyjna PHO5 – Genbank: NP_009651,
- gen β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c – Genbank: FJ609657.

Ze względu na znaczną długość sekwencji liderowej STA2 oraz alfa faktora przeprowadzono dwie reakcje PCR, gdzie w pierwszej przyłączano jedynie fragment sekwencji liderowej. Otrzymane końcowe produkty PCR klonowano w DNA wektora pSach424 w miejsca restrykcyjne *Sma*I i *Eco*RI (4.11). W ten sposób otrzymano odpowiednie plazmidy rekombinantowe zawierające pod kontrolą promotora konstytutywnego pGDP gen β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c z fuzją translacyjną sekwencji sekrecyjnej PHO5, STA2 i α -faktora na N końcu polipeptydu, odpowiednio pSach424-PHO5-gal32c, pSach424-STA2-gal32c i pSach424-alfa-gal32c (Rys. 12).



Rys. 12. Mapy plazmidów rekombinantowych pSach424-PHO5-gal32c, pSach424-STA2-gal32c i pSach424-alfa-gal32c.

4.38. Hodowla rekombinantowych szczepów *S. cerevisiae* na pożywce YDO-TRP

Szczepy rekombinantowych drożdży hodowano w 50 ml pożywki YDO-TRP (4.3) w wytrząsarce powietrznej w temperaturze 30°C przez 96 h, przy 250 rpm.

4.39. Analiza frakcji wewnątrz i zewnątrzkomórkowej po ekspresji genu β -D-galaktozydazy w rekombinantowych drożdżach *S. cerevisiae*

W celu potwierdzenia zdolności produkcji β -D-galaktozydazy przez rekombinantowe drożdże *S. cerevisiae* analizowano frakcję wewnątrz oraz zewnątrzkomórkową na obecność enzymu.

Frakcję zewnątrzkomórkową zagęszczano na filtrach o punkcie odcięcia 50 000 MWCO 5-krotnie. Uzyskany supernatant analizowano ze względu na aktywność hydrolizy ONPG (4.29).

Frakcję wewnątrzkomórkową uzyskano w wyniku ucierania masy komórkowej drożdży z aluminą w moździerzu. Stosowano 4-krotną ilość wagowo w stosunku do masy osadu komórkowego. Mieszaninę ucierano przez 20 min w moździerzu. Następnie zawieszano w 0,1 M roztworze fosforanu potasu pH=6,5. Substancje nierozpuszczalne oddzielano na drodze wirowania przy 12 000xg. Obecność enzymu w supernatancie potwierdzano w reakcji hydrolizy ONPG (4.29).

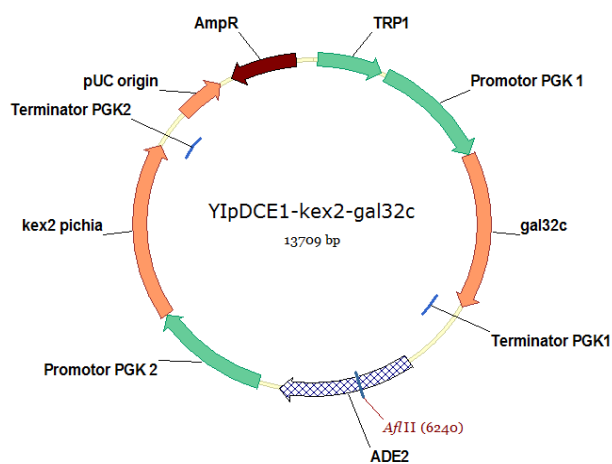
4.40. Konstrukcja plazmidu YIpDCE1-kex2-gal32c

W celu konstrukcji DNA plazmidu rekombinantowego YIpDCE1-kex2-gal32c, zawierającego pod kontrolą promotorów konstytutywnych PGK1 gen β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c oraz gen endopeptydazy sygnałnej Kex2 *P. pastoris*, oraz marker selekcyjny TRP1 *S. cerevisiae* wykonano trzy reakcje klonowania.

W pierwszym etapie klonowano otrzymany na drodze reakcji PCR fragment DNA zawierający sekwencję genu TRP1 wraz z sekwencją promotorową i terminatorową. W tym celu na matrycy wektora pYES3.0/CT (4.2) przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem odpowiednio zaprojektowanych na podstawie sekwencji DNA starterów oligonukleotydowych. Produkt PCR zawierał sekwencję rozpoznania dla

4. MATERIAŁY I METODY

enzymu *PfoI* i *EheI*. Klonując produkt PCR w te miejsca restrykcyjne w DNA plazmidu YIpDCE1 otrzymano plazmid YIpDCE1-trp1. W kolejnym etapie, na matrycy wyizolowanego genomowego DNA *P. pastoris* GS115, przy zastosowaniu odpowiednio zaprojektowanych starterów oligonukleotydowych, przeprowadzono reakcję PCR. Startery zaprojektowano na podstawie sekwencji genu endopeptydazy Kex2 *P. pastoris* GS115 zdeponowanej w banku genów NCBI (NCBI: XM_002491154). Otrzymany produkt PCR zawierał miejsca rozpoznania dla enzymu *Acc65I* oraz *XmaI* (4.11). Produkt PCR klonowano w DNA plazmidu YIpDCE1-trp1 w miejsca restrykcyjne *Acc65I* i *XmaI* (4.11), otrzymując plazmid YIpDCE1-kex2. W ramach klonowania w DNA plazmidu YIpDCE1-kex2 produktu PCR otrzymanego na matrycy plazmidu bibliotecznego pBAD- β -gal32c (5.2.3) otrzymano plazmid YIpDCE1-kex2-gal32c. Produkt PCR otrzymano z wykorzystaniem starterów oligonukleotydowych zawierających na niekomplementarnym do matrycowego DNA 5'końcach sekwencje rozpoznania dla enzymu restrykcyjnego *Sall* lub *BgIII*. Produkt PCR klonowano w miejsca *Sall* i *BamHI*, rys. 13.



Rys. 13. Mapa plazmidu YIpDCE1-kex2-gal32c.

4.41. Test płytkowy sekrecji β -D-galaktozydazy

W celu analizy zdolności rekombinantowych drożdży *S. cerevisiae* do metabolizmu laktozy stosowano podłoże YDO-TRP1 zawierające jako dodatek 1% laktozę oraz X-gal (4.4). W przypadku pozytywnego wyniku kolonie ulegały zabarwieniu na kolor niebieski.

4.42. Ferementacja alkoholowa:

4.42.1. z wykorzystaniem szczepów rekombinantowych *S. cerevisiae* konstytutywnie produkujących zewnątrzkomórkowo β -D-galaktozydazę *Arthrobacter sp. 32c*

Szczepy rekombinantowe *S. cerevisiae* BMA64-1A G1-G2, *S. cerevisiae* BMA64-1A G1G2-kex2-gal32c oraz szczep laboratoryjny drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A hodowano w pożywce YPD w objętości 10 ml przez 24h w wytrząsarce powietrznej przy 300 rpm w temperaturze 30°C. Następnie 10 ml hodowli zaszczipiano 500 ml pożywki YPL i prowadzono hodowlę w warunkach beztlenowych przez 120h w temperaturze 30°C. Powstałą ilość etanolu, a także zawartość cukrów laktozy, glukozy i galaktozy badano wykorzystując chromatografię HPLC (4.43).

4.42.2. z wykorzystaniem konsorcjum mikroorganizmów *S. cerevisiae* oraz *P. pastoris* pGAPZ α A β -gal32c

W pierwszej kolejności prowadzono hodowlę szczepu rekombinantowego *P.pastoris* pGAPZ α A-gal32c w 30ml pożywki YPD w temperaturze 30°C w wytrząsarce powietrznej przy 300 rpm, przez 48h. Po upływie 24h, podobnie jak podano w punkcie 4.42.1 szczepy rekombinantowe *S. cerevisiae* BMA64-1A G1-G2, *S. cerevisiae* BMA64-1A G1G2-kex2- gal32c oraz szczep laboratoryjny drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A hodowano w pożywce YPD w objętości 10 ml przez 24h w wytrząsarce powietrznej przy 300 rpm w temperaturze 30°C. Następnie 500 ml pożywki YPL zaszczipiano 10ml hodowli drożdży *S. cerevisiae* oraz *P. pastoris*. Hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych przez 120h w temperaturze 30°C. Powstałą ilość etanolu, a także zawartość cukrów laktozy, glukozy i galaktozy badano wykorzystując chromatografię HPLC (4.43).

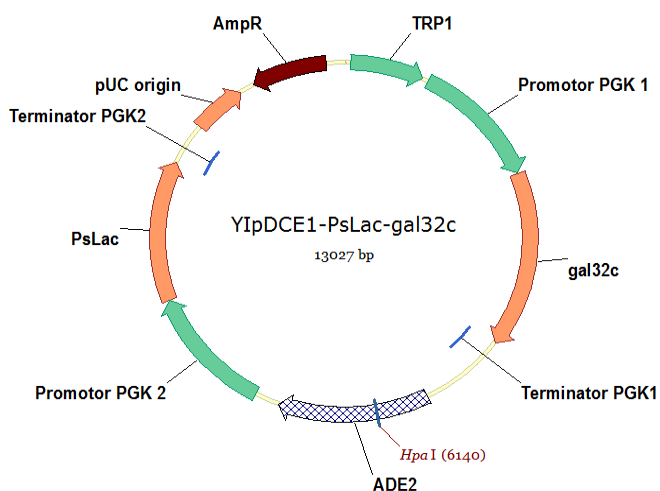
4.43. Analiza HPLC

Produkty fermentacji alkoholowej jak i ilość rozłożonej laktozy analizowano chromatograficznie stosując kolumnę Aminex HPX-87H (Biorad, USA). Stosowano jako fazę ruchomą 0,005 M roztwór kwasu siarkowego VI w wodzie. Jako wzorce stosowano 1% roztwory cukrów i etanolu w fazie ruchomej.

4.44. Konstrukcja plazmidu YIpDCE1 PsLac-gal32c

W celu konstrukcji plazmidu YIpDCE1-PsLac-gal32c wykonano dwuetapowe klonowanie odpowiednich fragmentów DNA.

W pierwszej kolejności otrzymano na drodze reakcji PCR z zastosowaniem odpowiednio zaprojektowanych na podstawie sekwencji genu permeazy laktozowej *Pichia stipitis* (NCBI: AAVQ01000002 REGION: 1253014..1254681) pary starterów. Otrzymany produkt PCR posiadał sekwencje rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych Acc65I oraz XmaII. Fragment DNA był klonowany w te miejsca restrykcyjne plazmidu YIpDCE1-trp1 (4.40), dzięki czemu otrzymano plazmid YIpDCE1-PsLac. Następnie podobnie jako opisano w punkcie 4.40 otrzymano produkt PCR zawierający sekwencję genu β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c, który klonowano w miejsca restrykcyjne *Eco*ICRI (Ecl136II) i *Bam*HI. Mapę plazmidu rekombinantowego YIpDCE1-trp1-gal32c przedstawiono na rysunku 14.



Rys. 14. Mapa plazmidu YIpDCE1-PsLac-gal32c.

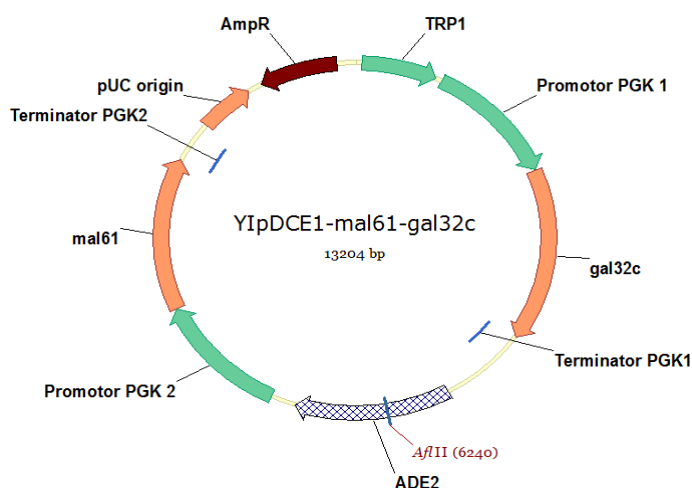
4.45. Konstrukcja plazmidu YIpDCE1-mal61-gal32

W celu konstrukcji plazmidu YIpDCE1-mal61-gal32 wykonano dwuetapowe klonowanie odpowiednich fragmentów DNA.

W pierwszej kolejności otrzymano na drodze reakcji PCR z zastosowaniem odpowiednio zaprojektowanych na podstawie sekwencji genu permeazy maltozy *S. cerevisiae* (NCBI: X17391) pary starterów. Otrzymany produkt PCR posiadał sekwencje rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych Acc65I oraz XmaII. Fragment

4. MATERIAŁY I METODY

DNA był klonowany w te miejsca restrykcyjne plazmidu YIpDCE1-trp1 (4.40), dzięki czemu otrzymano plazmid YIpDCE1-mal61. Następnie podobnie jako opisano w punkcie 4.40 otrzymano produkt PCR zawierający sekwencję genu β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c, który klonowano w miejsca restrykcyjne *Eco*ICRI (*Ecl*136II) i *Bam*HI. Mapę plazmidu rekombinantowego YIpDCE1-mal61-gal32c przedstawiono na rysunku 15.



Rys. 15. Mapa plazmidu YIpDCE1-mal61-gal32c.

4.46. Fermentacja alkoholowa laktozy z zastosowaniem dodatku β -D-galaktozydaz

W ramach przeprowadzanej fermentacji alkoholowej laktozy z dodatkiem β -D-galaktozydaz hodowano w 100 ml pożywki YPD szczepy *S. cerevisiae* BMA64-1A i *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2 w temperaturze 30°C, w wytrząsarce powietrznej. Hodowlę nocną wirowano przy 3000xg i zawieszano w pożywce YPL zawierającej dodatek 1:1000 β -D-galaktozydazy przemysłowej Lactozym lub identyczną ilość co do aktywności preparatu enzymatycznego β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c. Hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych przez 80 h. Po czasie 0, 12, 24, 36, 48, 60 i 80 h pobierano próbki. Po 24 h i 48 h dodano identyczną ilość preparatu enzymatycznego do mieszanin fermentacyjnych. W trakcie pobierania prób doprowadzano pH pożywki do wartości 6,0, dodając odpowiednią ilość 1 M roztworów fosforanu potasu i fosforanu dipotasu. Próbki analizowano z

4. MATERIAŁY I METODY

wykorzystaniem chromatografii HPLC pod kontem zawartości glukozy, galaktozy, laktozy, octanu, glicerolu i etanolu jak podano w punkcie 4.43.

4.47. Przygotowanie złoza chitozanowego do immobilizacji

Odczynniki do immobilizacji

- Chitozan o stopniu deacetylacji 85% (Sigma);
- 25% roztwór aldehydu glutarowego (Sigma);
- 0,1 M bufor fosforanowy (pH = 6,6): 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 62,5 ml, 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 37,5 ml, woda destylowana 100 ml;
- 1 M roztwór NaOH zawierający 26% etanolu;
- 1% kwas octowy.

Przygotowanie złoza

W celu przygotowania złoza do immobilizacji β -galaktozydazy, 3 g chitozanu (Sigma) całkowicie rozpuszczono w 200 ml 1% kwasu octowego. Roztwór chitozanu wkroplono następnie do 500 ml 1 M roztworu NaOH zawierającego 26% etanolu. Po uformowaniu kuleczek, przemywano je wodą destylowaną do uzyskania neutralnego pH, a następnie zawieszono w 0,1 M buforze fosforanowym o pH = 6,6. Złoże przechowywano w 4°C.

4.48. Immobilizacja β -D-galaktozydaz

20 g kuleczek chitozanowych zmieszano z 80 ml 0,1% roztworu aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym (pH = 6,6). Kuleczki inkubowano w roztworze aldehydu przez 2 h, po czym odsączono i przemyto wodą destylowaną. Złoże umieszczano w 20 ml roztworu β -D-galaktozydazy Lactozym (40000 U) lub w 40 ml roztworu β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c i pozostawiono na 24 h w 4°C. Następnie odsączano kuleczki i przemywano roztworem buforowym w celu usunięcia niezwiązanego z chitozanem enzymu. Biokatalizatory stanowiące unieruchomione na złożu chitozanowym enzymy przechowywano w 0,1 M buforze fosforanowym (pH = 6,5), w temperaturze 4°C.

4.49. Fermentacja alkoholowa laktozy z wykorzystaniem immobilizowanych β -D-galaktozydaz

W ramach przeprowadzanej fermentacji alkoholowej laktozy z dodatkiem biokatalizatorów stanowiących unieruchomione enzymy na chitozanie hodowano w 100 ml pożywki YPD (4.3) szczepy *S. cerevisiae* BMA64-1A i *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2 w temperaturze 30°C w wytrząsarce powietrznej. Hodowlę nocną wirowano przy 3000xg i zawieszano w pożywce YPL (4.3) zawierającej dodatek 5 g biokatalizatora Lactozym lub 15 g biokatalizatora *Arthrobacter* sp. 32c. Hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych przez 80 h. Po czasie 0, 12, 24, 36, 48, 60 i 80 h pobierano próbki. Po 24h i 48h dodano identyczną ilość preparatu enzymatycznego do mieszanin fermentacyjnych. W trakcie pobierania prób doprowadzano pH pożywki do wartości 6,0, dodając odpowiednią ilość 1M roztworów fosforanu potasu i fosforanu dipotasu. Próbki analizowano z wykorzystaniem chromatografii HPLC pod kątem zawartości glukozy, galaktozy, laktozy, octanu, glicerolu i etanolu jak podano w punkcie 4.43.

5. Wyniki

Uzyskiwanie energii z alternatywnych źródeł jest promowane przez politykę państw prawie całego świata⁸⁶. Laktoza zawarta w serwatce stanowi potencjalnie drogocenne źródło węgla. Mimo to, że obecnie serwatka jest przetwarzana na wiele sposobów, wciąż około 50% światowej produkcji pozostaje niewykorzystana. Potencjalnie zawarta w niej laktoza mogłaby zostać przetworzona do etanolu o zastosowaniu jako biopaliwo. Wiele szczepów bakteryjnych i drożdżowych wykazuje zdolność produkcji etanolu, lecz niewiele z nich jest w stanie sprostać wymaganiom technologicznym i ekonomicznym procesu fermentacji. Wśród tych, charakteryzujących się wysoką zdolnością produkcji etanolu z cukrów prostych (glukoza, fruktoza), wyróżnia się jedynie bakterie *Escherichia coli* i *Zymomonas mobilis* oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Jedynie *E. coli* wykazuje zdolność do metabolizmu laktozy. Nie mniej jednak rekombinantowe szczepy *E. coli* zaadaptowane do przeprowadzania fermentacji alkoholowej są niestabilne genetycznie⁸⁷, przez co proces technologiczny jest trudny do przeprowadzenia w sposób powtarzalny. Wśród szczepów, które są zdolne do przeprowadzania fermentacji laktozy do etanolu wyróżnić można jeszcze drożdże *Kluyveromyces marxianum* i *Kluyveromyces lactis*. Jednak ze względu na ograniczoną osmotolerancję i tolerancję na stężenie alkoholu proces produkcji przy wykorzystaniu tych szczepów jest nieopłacalny (3.3).

W celu uzyskania wydajnej produkcji etanolu należy brać pod uwagę szereg cech mikroorganizmu takich jak: kompatybilne z surowcem optymalne pH wzrostu, tolerancja na stężenie alkoholu, szybkość wzrostu, produktywność, osmotolerancję, specyficzność produkcji, wydajność produkcji, stabilność genetyczną. Niewątpliwie *S. cerevisiae* wyprzedza rywali jeśli chodzi o spełnianie powyżej wymienionych cech, przegrywa natomiast jeśli chodzi o zdolność do metabolizmu laktozy. *S. cerevisiae* nie posiada enzymu pozwalającego na rozkład laktozy do cukrów prostych: glukozy i galaktozy, natomiast wykazuje zdolność do dwufazowego metabolizmu glukozy i galaktozy do etanolu.

Rozwiązanie problemu metabolizmu laktozy przez drożdże piekarnicze wydaje się zagadnieniem łatwym do rozwiązania. Najprostszym rozwiązaniem jest prehydroliza laktozy poprzez zastosowanie preparatu enzymatycznego β -D-

galaktozydazy lub formy immobilizowanej. Jest to zarazem rozwiązanie technologicznie najdroższe z możliwych. Konkurencyjnym rozwiązaniem mogłoby być wprowadzenie genu kodującego enzym β -D-galaktozydazę, który byłby produkowany na zewnątrz komórki lub też produkcja wewnątrzkomórkowa enzymu wraz z koekspresją genu permeazy transportującej laktozę do wnętrza komórki.

W ramach pracy doktorskiej podjęto próbę przystosowania szczepu drożdży *S. cerevisiae* do metabolizmu laktozy do etanolu.

5.1. Konstrukcja szczepów *S. cerevisiae* ekspresyjających gen β -D-galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b

W pierwszej kolejności sprawdzono możliwość zewnątrzkomórkowej produkcji enzymu β -D-galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b przez szczep *S. cerevisiae*. Enzym ten, scharakteryzowany już wcześniej, wykazuje optymalne parametry katalityczne w warunkach kompatybilnych z tymi jakie przejawia serwatka technologiczna^{43; 44}. W tym celu otrzymano (4.16) i wprowadzono (4.18) do komórek drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A plazmidy rekombinantowe pSach424-alfa-gal22b, pSach424-PHO5-gal22b oraz pSach424-STA2-gal22b (4.16), zawierające pod kontrolą konstytutywnego promotora pGDP gen β -D-galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b z fuzją translacyjną sekwencji sekrecyjnej na N końcu polipeptydu.

Uzyskane rekombinanty charakteryzowano ze względu na zdolność produkcji oraz sekrecji β -D-galaktozydazy na zewnątrz komórki. Otrzymując odpowiednie plazmidy rekombinantowe (4.17) pozwalające na modyfikację (4.19) drożdży *Pichia pastoris* sprawdzono kontrolnie możliwość produkcji enzymu przez ten szczep, gdyż jest on uważany za dobrego producenta enzymów na zewnątrz komórki. Wyniki przedstawia tabela 8.

Tabela 8. Zdolność produkcji β -D-galaktozydazy *Pseudoalteromonas* sp. 22b przez drożdże *S. cerevisiae* oraz *P. pastoris*.

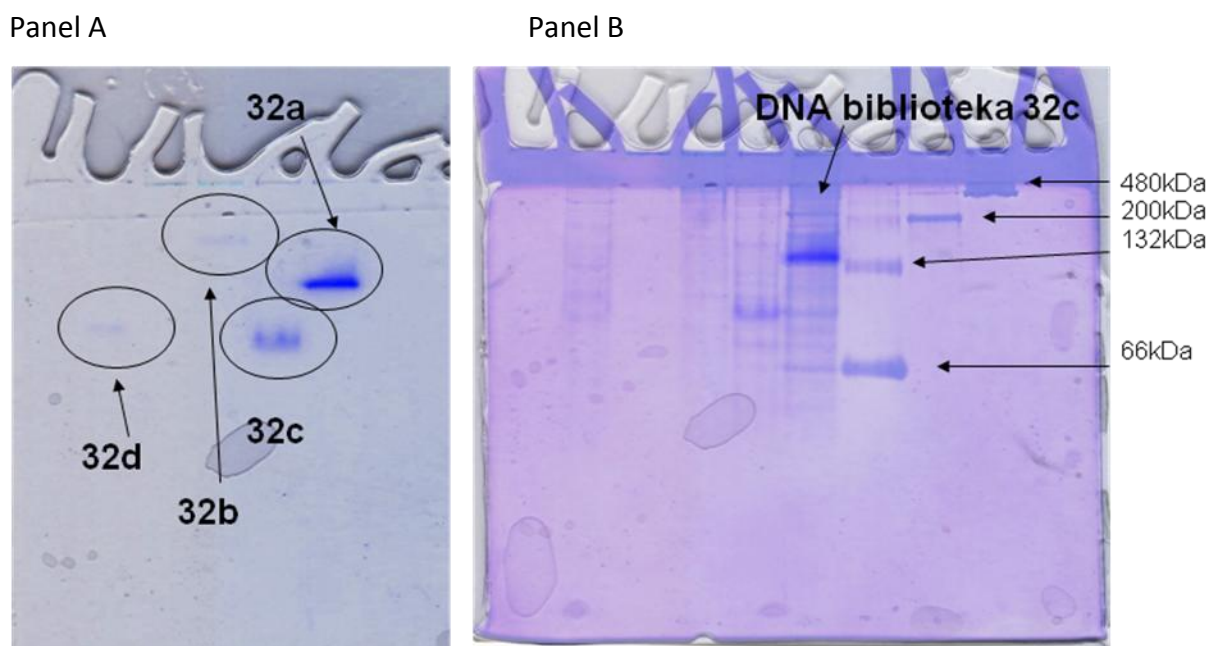
Sekwencja sygnałna	alfa-faktor		STA2		PHO5	
	na zewnątrz	wewnątrz	na zewnątrz	wewnątrz	na zewnątrz	wewnątrz
<i>S. cerevisiae</i>	-	+	-	+	-	+
<i>P. pastoris</i>	-	+	-	+	-	+

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że β -D-galaktozydaza *Pseudoalteromonas* 22b, będąca tetramerem o wielkości ok. 490 kDa, jest zbyt dużym białkiem aby produkcja zewnątrzkomórkowa była możliwa.

5.2. Poszukiwanie nowej β -D-galaktozydazy

5.2.1. Izolacja szczepów psychrotrofowych z gleby antarktycznej produkujących β -D-galaktozydazę

W celu izolacji czystych kultur szczepów psychrotrofowych lub psychrofilnych z gleby antarktycznej (próbki gleby otrzymano od pani Profesor M. Turkiewicz, Politechnika Łódzka) biosyntetyzujących β -D-galaktozydazę, postępowano jak opisano w punkcie 4.20. Otrzymane szczepy psychrotrofowe hodowano w pożywce LOS (4.3) w celu izolacji natywnych białek (4.21). Ekstrakty bezkomórkowe rozdzielano elektroforetycznie w natywnym 8% żelu poliakrylamidowym (4.8.2.1). W kolejnym etapie znakowano położenie β -D-galaktozydazy, inkubując żel w roztworze zawierającym ONPG i dokumentowano. Następnie stosowano barwienie kumasyną i wykorzystując oprogramowanie Adobe Photoshop nakładano dwa obrazy żelu na siebie (Rys.16).



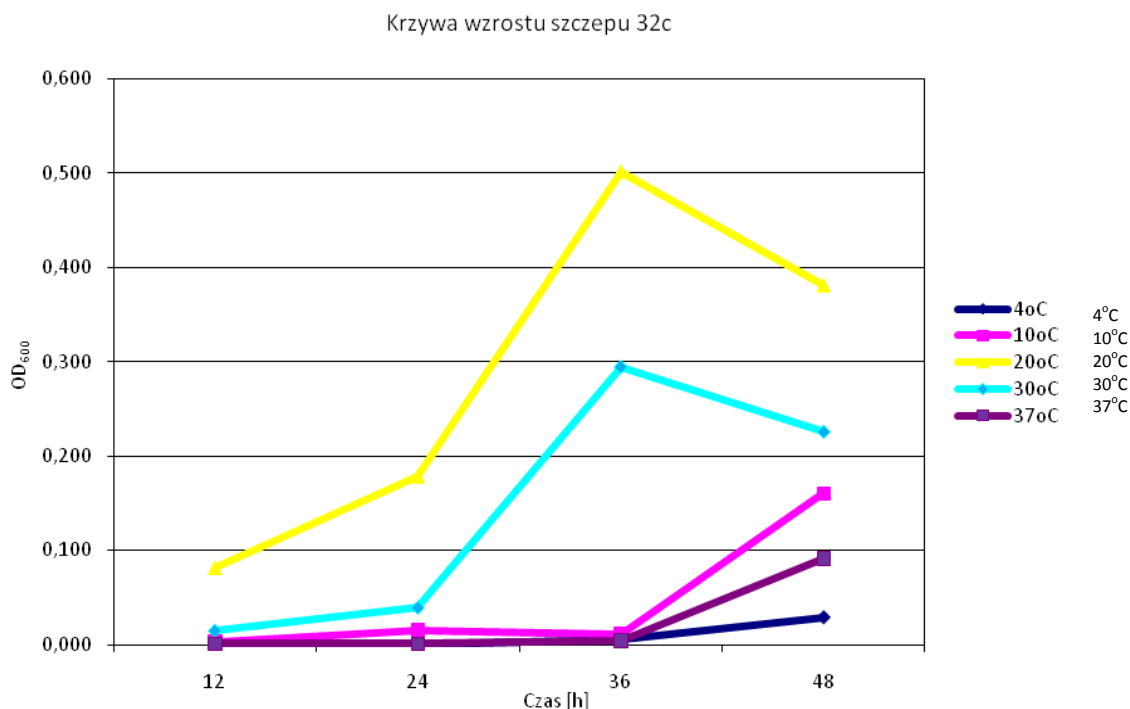
Rys. 16. Wynik rozdzielania elektroforetycznego ekstraktów bezkomórkowych w warunkach natywnych (8.3.2). Obraz jest wynikiem nałożenia zdjęcia żelu uzyskanego po inkubacji w roztworze ONPG i po barwieniu kumasyną. **Panel A** – przedstawiono rozdzielone β -D-galaktozydazy produkowane przez wyizolowane szczepy psychrotrofowe. **Panel B.** przedstawiono wynik rozdzielania ekstraktów bezkomórkowych szczepów bibliotecznych wykazujących aktywność hydrolizy X-galu.

Na tej podstawie stwierdzono, że szczepy oznaczone jako 32c i 32d produkują β -D-galaktozydazy charakteryzujące się niską masą molekularną w postaci natywnej. W dalszych badaniach wykorzystano szczep 32c, gdyż w przypadku tego szczepu produkowany enzym był najmniejszy.

5.2.2. Charakterystyka oraz oznaczenie przynależności gatunkowej szczepu 32c

W celu wykonania ogólnej charakterystyki szczepu 32c, poddano go testom metabolicznym. Stwierdzono zdolność hydrolizy laktozy, skrobi oraz arabinozy. Ponadto, wykazano aktywność proteolityczną (4.22). Określono również zdolność do wzrostu szczepu w różnej temperaturze (4.23) (Rys. 17).

5. WYNIKI



Rys. 17. Krzywa wzrostu szczepu 32c w zależności od temperatury

W celu określenia przynależności taksonomicznej wyizolowanego z gleby antarktycznej szczepu oznaczonego 32c produkującego β -D-galaktozydazę analizowano sekwencję genu 16s rDNA (4.10), rys. 18.

```

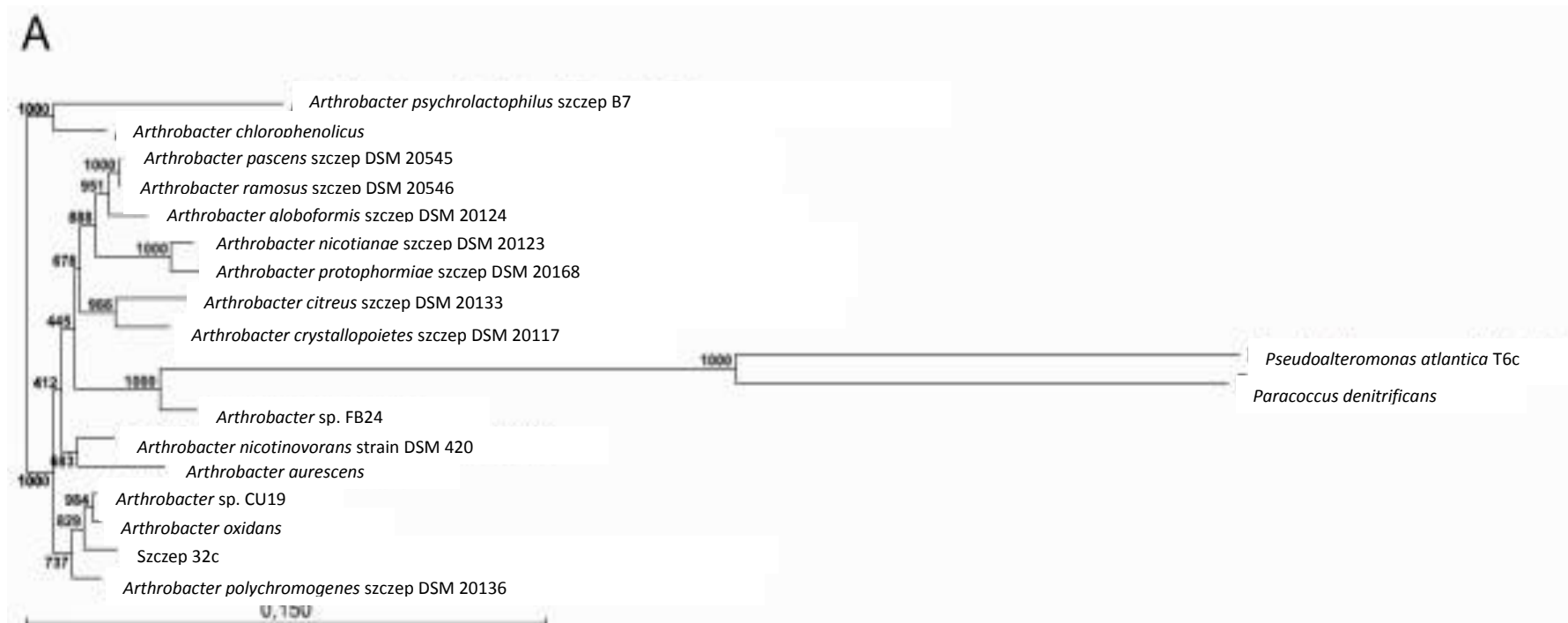
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGATCCCAGCTTGCTGGGGGATTAGTGGC
GAACGGGTGAGTAACACGCTGAGTAACCTGCCCCTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACTCCTCATCGCA
TGGTGGGGGGTGGAAAGCTTTTTGTGGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGACG
GGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCATTGGGGAATATTGCACAAT
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGT
ACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAG
CTCGTAGGCGGTTTTGTCGCTGTCGCGTGAAGTCCGGGCTCAACTCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGATGTAGGGGA
GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCATTAAGTACGCTGA
GGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTT
TTCCGCGCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGAACCGGTAATACCTGGAGACAGGTGCCCGCT
TGCGGTGGTTTTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTA
TGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTT
ATGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTC
GGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACCGTTCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGT
ACACACCGCCCGTCAAGTCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCTAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGC
GATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT
    
```

Rys. 18. Sekwencja 16S rDNA szczepu 32c.

5. WYNIKI

Na podstawie analizy sekwencji 16S rDNA przy wykorzystaniu serwisu NCBI Blast, stwierdzono, że szczep należy do rodzaju *Arthrobacter*. Drzewo filogenetyczne przedstawiono poniżej (Rys. 19). Sekwencja 16S rDNA szczep 32c wykazuje powyżej 98% identyczności z sekwencjami 16s rDNA szczepów *Arthrobacter* zdeponowanymi w bazie NCBI.

5. WYNIKI



Rys. 19. Drzewo filogenetyczne.

5.2.3. Izolacja genu kodującego β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c

W celu izolacji genu kodującego β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c z genomowego DNA otrzymano odpowiednią bibliotekę genomową (4.12.3). Fragmenty DNA klonowano w miejsca restrykcyjne *Bam*HI i *Sall* wektora pBADMyHisA (4.1). Inset otrzymanego plazmidu bibliotecznego pBAD- β -gal32c, zawierającego gen kodujący β -D-galaktozydazę, sekwencjonowano (4.10). Otrzymane wyniki zdeponowano w bazie NCBI (FJ609657).

5.2.4. Produkcja rekombinantowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c

5.2.4.1. Konstrukcja układów do produkcji rekombinantowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c

W celu dokonania charakterystyki rekombinantowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c skonstruowano układy do nadprodukcji enzymu w oparciu o bakteryjnego (*E. coli*) i drożdżowego gospodarza (*P. pastoris*).

5.2.4.1.1. Układ bakteryjny

W wyniku klonowania genu kodującego β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c w DNA wektora pBADMyHisA (4.2) otrzymano plazmid rekombinantowy pBADMyHisA-gal32c pozwalający na biosyntezę enzymu w układzie arabinozowym *E. coli* (4.26).

5.2.4.1.2. Układ drożdżowy

W pierwszej kolejności badano zdolność sekrecji β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c przez komórki *Pichia pastoris* GS115, gdyż w przypadku tych drożdży uzyskano już wcześniej w Katedrze Mikrobiologii pozytywne wyniki w przypadku sekrecji β -D-galaktozydazy termostabilnej *Pyrococcus woesei*⁸⁸.

Skonstruowano dwa plazmidy rekombinantowe: pozwalający na konstytutywną (pGAPZalfaA-gal32c) oraz indukowaną (pPICZalfaA-gal32c) ekspresję genu β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c (4.27).

5.2.4.2. Ekspresja genu beta-D-galaktozydazy

5.2.4.2.1. Układ bakteryjny

Szczep *E. coli* LMG 194 plysN transformowany plazmidowym DNA pBADMycHisA-gal32c używano do biosyntezy β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c. Postępowano jak podano w punkcie (4.27). Najlepsze rezultaty produkcji uzyskano w wyniku indukcji ekspresji arabinozą do stężenia końcowego 0,2% w/vol przy $OD_{600}=0,5$ prowadząc biosyntezę przez 4 h, w 37°C. W wyniku produkcji β -D-galaktozydazy otrzymano 8000 U (4.29) z 1 litra hodowli (Tabela 9).

5.2.4.2.2. Układ drożdżowy

a) Układ indukowany metanolem

Szczep rekombinantowy *P. pastoris* transformowany plazmidem pPICZalfa-gal32c wykorzystywano do produkcji zewnątrzkomórkowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c stosując jako induktor ekspresji metanol (4.28). W wyniku przeprowadzenia biosyntezy otrzymano ok. 98000 U (4.29) enzymu z 1 litra hodowli, prowadząc produkcję przez 4 doby w temperaturze 30°C, Tabela 9.

b) Układ konstytutywny

Szczep rekombinantowy *P. pastoris* transformowany plazmidem pGAPZalfa-gal32c wykorzystywano do produkcji zewnątrzkomórkowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c w układzie konstytutywnym (4.28). W wyniku przeprowadzenia biosyntezy otrzymano ok. 84000 U (4.29) enzymu z 1 litra hodowli, prowadząc produkcję przez 4 doby, w temperaturze 30°C, Tabela 9.

c) Optymalizacja produkcji enzymu przy wykorzystaniu konstytutywnego układu ekspresyjnego

W celu optymalizacji produkcji zewnątrzkomórkowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c przez drożdże *P. pastoris* GS115 w układzie konstytutywnym stosowano różne stężenia glicerolu i glicerolu odpadowego jako dodatku do hodowli po 2 dobach hodowli, w przypadku pożywki YPG. Pożywki YPG zawierały dodatek 5mM CaCl₂, natomiast nie było potrzeby dodawania CaCl₂ w przypadku pożywki SER,

gdyż jony wapniowe występują w serwatce. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Wydajność produkcji β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c w oparciu o układ konstytutywnej biosyntezy enzymu w komórkach drożdży metylotroficznych *P. pastoris*.

Substrat	Ilość substratu węglowego 0h [% w/vol]	Dodatek substratu węglowego po 48h [% w/vol]	Wydajność produkcji [mg/L]
glicerol	2%	0%	71
		1%	83
		2%	97
		3%	90
		4%	64
glicerol odpadowy	2%	0%	65
		1%	76
		2%	88
		3%	91
		4%	59
Laktoza w pożywce SER	około 4%	0	73

Najlepszą wydajność produkcji β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp.32c otrzymano w przypadku stosowania pożywki YPG zawierającej 2% glicerolu i stosując dodatek glicerolu w ilości 2% w/vol po upływie 48 h ekspresji. Ponadto, wykazano przydatność stosowania glicerolu odpadowego jak i serwatki w formie substratów do biosyntezy tego enzymu, jako korzystne ekonomicznie alternatywne źródła węgla.

5.3. Ekspresja i oczyszczanie β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c w zależności od układu ekspresyjnego – porównanie otrzymanych wyników

Skonstruowano trzy układy ekspresyjne pozwalające na produkcję β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c: 1 bakteryjny (w oparciu o układ arabinozowy ekspresji w *E. coli* oraz 2 drożdżowe w oparciu o gospodarza ekspresyjnego *P. pastoris* GS115 - układ indukowany metanolem oraz układ konstytutywnej biosyntezy enzymu. β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c produkowano w oparciu o bakteryjnego gospodarza jak podano w punkcie 5.2.4.2.1 w indukowanym układzie drożdżowym jak podano w punkcie 5.2.4.2.2. Przez dłuższy okres czasu

5. WYNIKI

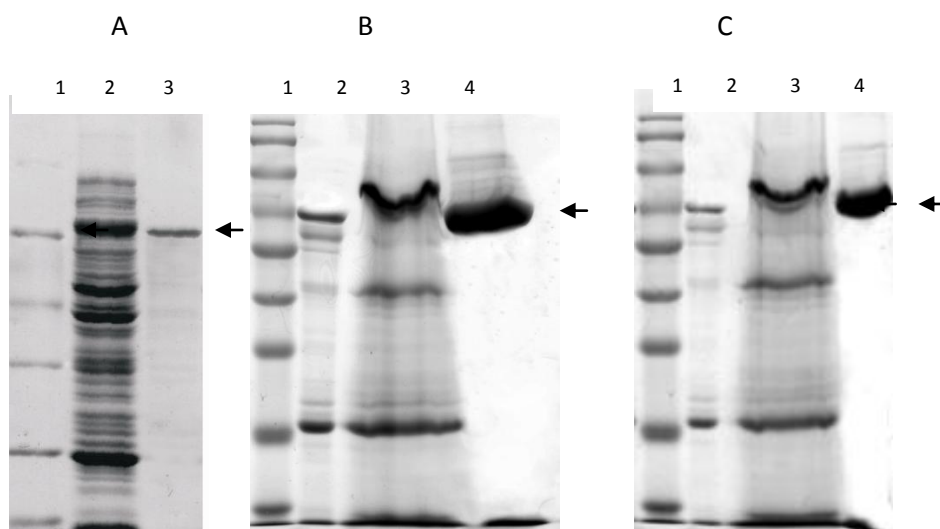
przechowywano białko w postaci liofilizatu (4.30). W przypadku prowadzenia biosyntezy enzymu w oparciu o szczep rekombinantowy drożdży *P. pastoris* pGAPZ α A-gal32c, pozwalający na konstytutywną, zewnątrzkomórkową produkcję β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c postępowano jak podano w punkcie 5.2.4.2.2 stosując najlepszy wariant ekspresji.

W przypadku produkcji enzymu wewnątrzkomórkowo przez bakterie rekombinantowe *E. coli* LMG p β ADMyHisA-gal32c, β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c izolowano i oczyszczano stosując jedynie chromatografię powinowactwa (4.31). W przypadku zewnątrzkomórkowej produkcji białka stosowano w pierwszym etapie wysalanie białek (4.32), a następnie chromatografię powinowactwa (4.31).

Podczas każdego etapu oczyszczania określano całkowitą ilość białek metodą Bradford (4.33) oraz określano aktywność preparatu wobec substratu ONPG (4.29). Wyniki oczyszczania zestawiono w Tabeli 10 i przedstawiono na Rysunku 20.

Tabela 10. Oczyszczanie rekombinantowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c.

Etap oczyszczania	Objętość (ml)	Białko (mg)	Aktywność		Oczyszczenie (stopień)	Procent odzysku (%)
			właściwa (U mg ⁻¹)	Całkowita aktywność (U)		
<i>E. coli</i> LMG plysN pBADMyHisA-gal32c						
Ekstrakt bezkomórkowy	30	580	13.8	8004	1.0	100
Chromatografia powinowactwa	32	27	155.9	4209	21.0	53
<i>P. pastoris</i> GS115 pPICZ α A-gal32c						
Pożywka	1000	3400	28.7	97580	1.0	100
Precypitacja	54	340	136.1	46274	10.0	47
Chromatografia powinowactwa	11	137	154.7	21194	2.5	22
<i>P. pastoris</i> GS115 pGAPZ α A-gal32c						
Pożywka	1000	5200	16.2	84240	1.0	100
Precypitacja	46	450	102.7	46215	11.6	55
Chromatografia powinowactwa	10	97	153.1	14851	4.6	18



Rys. 20. Wynik rozdzielania elektroforetycznego SDS-PAGE (4.8.2). Panel A: oczyszczanie β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c w przypadku bakteryjnego układu ekspresyjnego; Panel B: oczyszczanie β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c w przypadku konstytutywnego układu ekspresji *P. pastoris*; Panel C: oczyszczanie β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c w przypadku indukowanego układu ekspresji *P. pastoris*; Panel A 1. Marker wielkości białek SigmaWeightMarker (4.8.2), 2 - lizat bezkomórkowy 10 μ l, 3 – preparat β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c po oczyszczeniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa 10 μ l. Panel B i C: 1 – marker wielkości białek Protein Ruler (4.8.2); 2 – płyn pochodzący 20

5. WYNIKI

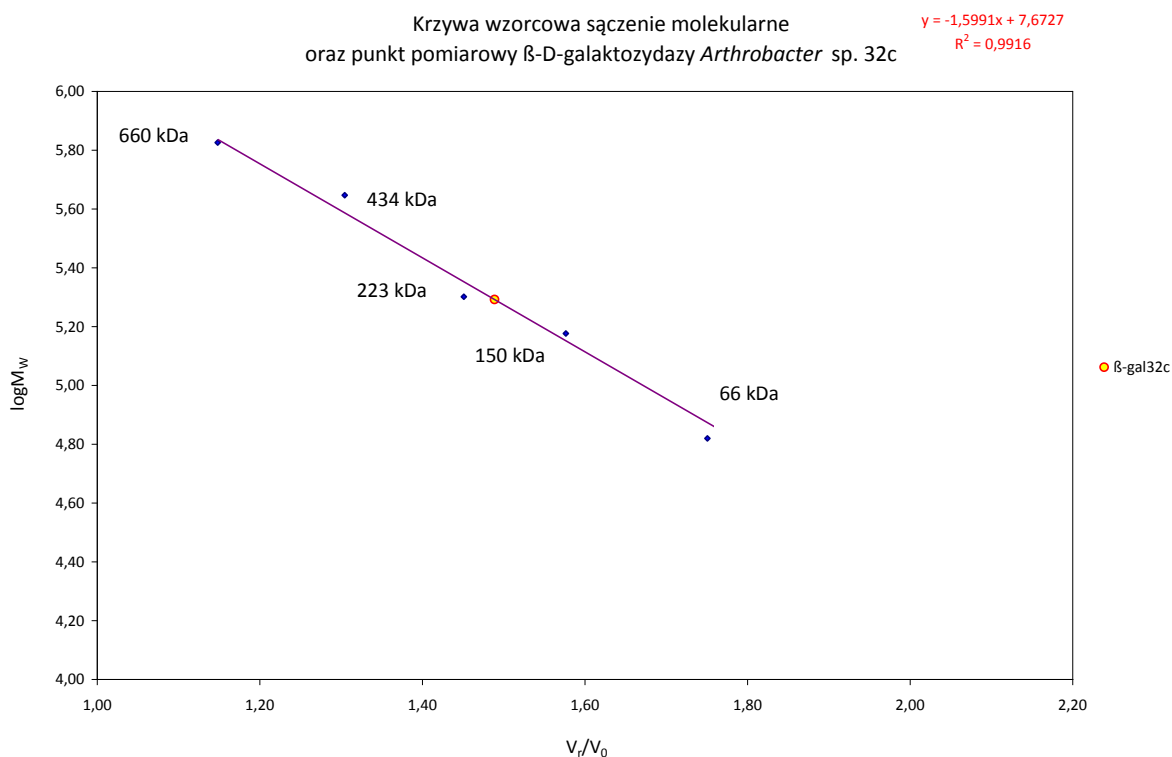
μl , 3 – precypitat białkowy rozpuszczony w wodzie 20 μl , preparat enzymu po oczyszczeniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa 20 μl .

5.4. Charakterystyka biochemiczna β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c

5.4.1. Sączenie molekularne

Masę cząsteczkową białka β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp 32c wyznaczono metodą analitycznej chromatografii żelowej (4.34).

W pierwszym etapie sporządzono krzywą kalibracyjną z wykorzystaniem białek o masach cząsteczkowych: 669, 434, 232, 150 i 66 kDa. Objętość martwą złoża kolumny chromatograficznej wyznaczono na podstawie objętości retencji dekstranu o średniej masie cząsteczkowej 2000 kDa. Następnie preparat białka poddano sączeniu molekularnemu i obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej masę cząsteczkową białka. Uzyskany wynik przedstawiono w postaci wykresu (Rys. 21).



Rys. 21. Krzywa wzorcowa sączenia molekularnego (4.34) oraz punkt pomiarowy β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c.

Na podstawie przeprowadzonej analizy filtracji żelowej stwierdzono, że β -D-galaktozydaza *Arthrobacter* sp. 32c jest trimierem.

5.4.2. Badanie aktywności

Do badań właściwości enzymatycznych rekombinantowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter sp.* 32c wybrano preparat oczyszczonego enzymu dzikiego typu produkowanego w komórkach *E. coli* LMG194 pLysN transformowanych DNA plazmidu pBADMyHisA-gal32c.

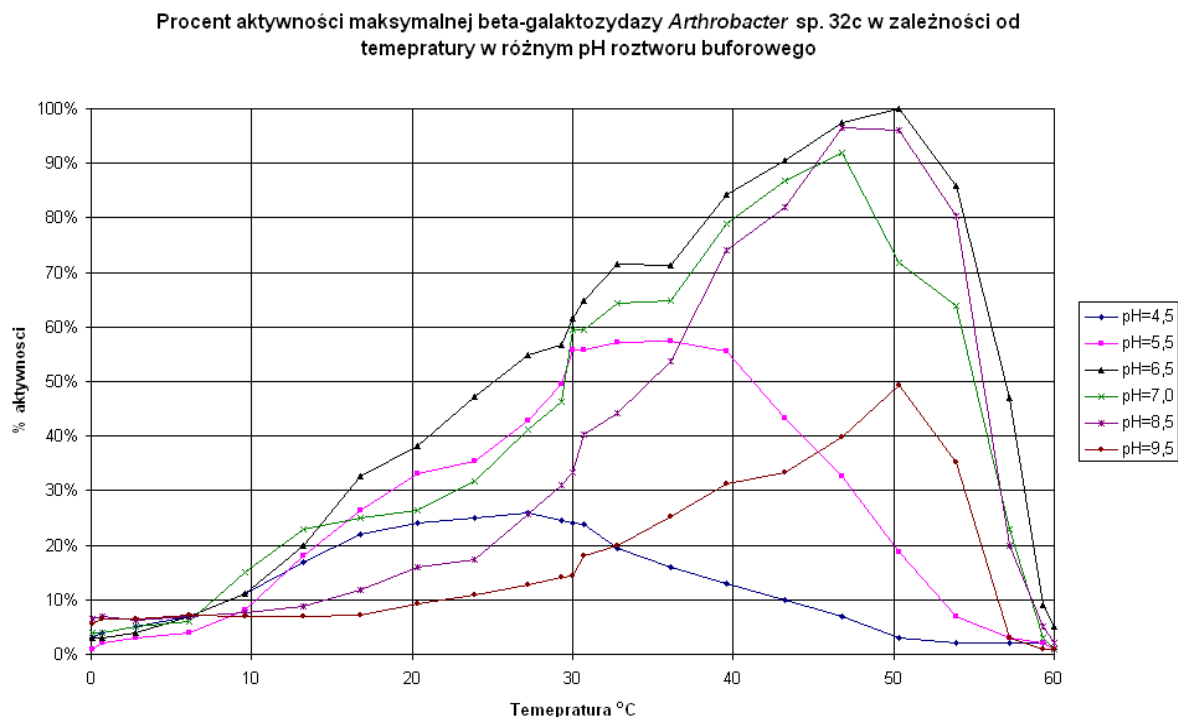
W celu scharakteryzowania właściwości enzymatycznych rekombinantowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter sp.* 32c przeprowadzono następujące doświadczenia:

- badanie wpływu temperatury i pH środowiska reakcji na aktywność hydrolityczną enzymu,
- badanie wpływu dwuwartościowych jonów metali i EDTA na aktywność enzymu,
- badanie wpływu związków posiadających grupy tiolowe na aktywność enzymu,
- badanie wpływu stężenia etanolu na aktywność enzymu,
- badanie parametrów kinetycznych enzymu.

5.4.2.1. Badanie wpływu temperatury i pH środowiska reakcji na aktywność hydrolityczną enzymu

Reakcję hydrolizy ONPG prowadzono w roztworach buforowych przy pH 4,5; 5,5; 6,5; 7,0; 7,5; 8,5 i 9,5. Reakcję prowadzono w temperaturze od 0 do 60°C, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.29. Wyniki przeprowadzonych badań wpływu pH i temperatury reakcji zilustrowano w postaci wykresu na Rysunku 22. Wartości aktywności przedstawiono jako aktywności względne, przyjmując najwyższą z uzyskanych wartości aktywności enzymu w reakcji z ONPG za 100%.

5. WYNIKI



Rys. 22. Wykres zależności aktywności względnej od temperatury reakcji i pH środowiska reakcji.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż β -D-galaktozydaza *Arthrobacter* sp. 32c osiąga maksymalną aktywność hydrolityczną w reakcji z ONPG, w buforze o pH = 6,5. Korzystnie enzym przejawia ponad 60% aktywności w temperaturze prowadzenia fermentacji alkoholowej 30°C. Ponadto enzym zachowuje ponad 10% aktywności w temperaturze 10°C.

5.4.2.2. Badanie wpływu jonów metali i EDTA na aktywność hydrolityczną enzymu

Oznaczenia aktywności hydrolitycznej enzymu w obecności dwuwartościowych jonów metali prowadzono według procedury opisanej w punkcie 4.29. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 11. Za 100% przyjęto wartość aktywności uzyskanej w reakcji z ONPG w 20 mM buforze fosforanowym o pH = 6,5, nie zawierającym dodatkowych związków chemicznych.

Tabela 11. Aktywność względna enzymu w obecności jonów metali.

Jon metalu	Aktywność względna [%]
brak	100
Na ⁺	97
K ⁺	100
Ni ²⁺	38
Mg ²⁺	90
Fe ²⁺	25
Co ²⁺	87
Cu ²⁺	0
Mn ²⁺	11
Zn ²⁺	0
Ca ²⁺	88
EDTA	94

Wykazano, że obecność jonów K⁺ w mieszaninie reakcyjnej nie wpływa na aktywność β-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c. Obecność jonów wapnia nieznacznie wpływa negatywnie na aktywność enzymu, co czyni enzym potencjalnie przydatnym do prowadzenia hydrolizy laktozy w produktach przetwórstwa mleczarskiego.

5.4.2.3. Badanie wpływu związków tiolowych na aktywność hydrolityczną enzymu

Oznaczenia aktywności hydrolitycznej enzymu w obecności związków zawierających grupy tiolowe prowadzono według procedury opisanej w punkcie 4.29. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 12. Za 100% przyjęto wartość aktywności uzyskanej w reakcji z ONPG w 20 mM buforze fosforanowym o pH = 6,5.

Tabela 12. Wpływ związków zawierających grupy tiolowe na aktywność hydrolityczną β-D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c.

Związek chemiczny	Aktywność względna [%]
Brak	100
2-merkaptoetanol	92
glutation zredukowany	6
cysteina	95

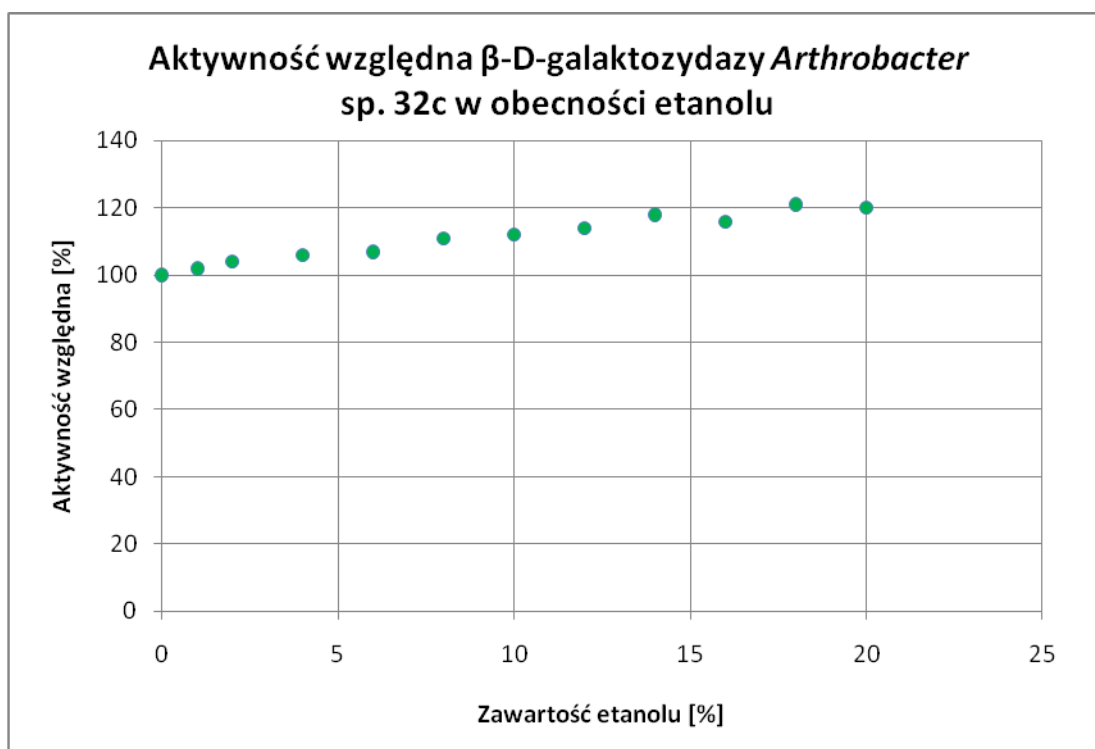
5. WYNIKI

Badania wykazały, że obecność 2-merkaptoetanolu i cysteiny w mieszaninie reakcyjnej nieznacznie obniża aktywność β -galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c, natomiast zredukowany glutation powoduje silną dezaktywację enzymu.

5.4.2.4. Badanie wpływu stężenia etanolu na aktywność enzymu

Oznaczenia aktywności hydrolitycznej enzymu w obecności etanolu prowadzono według procedury opisanej w punkcie 4.29. Za 100% przyjęto wartość aktywności uzyskanej w reakcji z ONPG w 20 mM buforze fosforanowym o pH = 6,5 bez dodatku etanolu.

Białko wykazuje zwiększoną aktywność hydrolizy ONPG w obecności etanolu w stężeniu od 1% vol/vol do 20% vol/vol. Aktywność ulega zwiększeniu o ok. 20%.



Rys. 23. Aktywność enzymu w obecności etanolu.

5.4.2.5. Określenie parametrów kinetycznych otrzymanej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c reakcji rozkładu laktozy i ONPG,

Do badań właściwości enzymatycznych rekombinantowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c wybrano preparat oczyszczonego enzymu dzikiego typu produkowanego w komórkach *E. coli* LMG194 pLysN transformowanych DNA plazmidu pBAD β gal32c, otrzymany jak podano wcześniej. Z otrzymanych wcześniej

5. WYNIKI

badań wynika, że enzym przejawia najlepsze właściwości katalizy hydrolizy ONPG w temperaturze bliskiej 50°C. Podwyższenie lub obniżenie temperatury skutkuje obniżeniem aktywności enzymu. Rekombinantowa β -D-galaktozydaza *Arthrobacter* sp. 32c zachowuje 15% aktywności nawet w 0°C oraz przejawia około 60% aktywności w temperaturze 25°C. Optymalne warunki pH katalizowanej reakcji hydrolizy obserwowano przy pH=6,5 w 20 mM buforze potasowo-fosforanowym.

Określono również specyficzność substratową rekombinantowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c. Porównano aktywność enzymu w zależności od stosowanego chromogennego substratu (ONPG, PNPG, ONPGlu i PNPGlu) (4.25). W przypadku stosowania substratu PNPG obserwowano 4-krotnie wyższą aktywność niż w przypadku ONPG, natomiast aktywność względem PNPGlu oraz ONPGlu była zdecydowanie niższa, odpowiednio 1,4% i 0,5% względem aktywności w stosunku do ONPG, Tabela 13.

Tabela 13. Aktywność β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c wobec chromogennych substratów.

Substrat	Procent aktywność wobec chromogennych substratów [%]
ONPG	100
PNPG	413
ONPGlu	0,5
PNPGlu	1,4

W celu określenia parametrów kinetycznych reakcji hydrolizy wiązania 1,4- β -O-glikozydowego, katalizowanej przez rekombinantową β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c stosowano dwa różne substraty: ONPG oraz laktozę. Reakcję przeprowadzano i analizowano produkty reakcji jak podano w punkcie 4.29. W opracowaniu wyników wykorzystano analizę kinetyki reakcji Michaelisa-Menten dla reakcji o kinetyce pierwszego rzędu. Wyniki zestawiono w tabeli nr 14.

Tabela 14. Parametry kinetyczne katalizy reakcji hydrolizy ONPG oraz laktozy przez β -D-galaktozydaze *Arthrobacter* sp. 32c.

Substrat	Temperatura [°C]	K_m [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}mM^{-1}$]
ONPG	10	5,75	52,4	9,12
	20	4,86	81,0	16,67
	30	3,46	123,9	35,81
	40	3,15	169,9	53,92
	50	2,62	212,4	81,07
	55	5,11	71,2	13,93
laktoza	10	77,54	1,76	0,023
	20	67,82	2,36	0,035
	30	52,67	4,81	0,091
	40	44,31	5,73	0,129
	50	39,73	6,98	0,176

Obliczono wartości parametru efektywności reakcji hydrolizy k_{cat}/K_M dla reakcji z ONPG i laktozą jako substratem. Największą wartość aktywności z ONPG obserwowano w temperaturze 50°C, 212,4s⁻¹. Współczynnik Michaelisa K_M określający stężenie substratu, przy którym enzym wykazuje 50% aktywności był największy w temperaturze 10°C i najmniejszy w temperaturze 50°C. Współczynnik ten w miarę wzrostu temperatury powyżej 50°C wzrastał do wartości 5,11mM w temperaturze 55°C. Największą efektywność katalizy obserwowano w temperaturze 50°C (81,7 s⁻¹mM⁻¹). Identyczne parametry kinetyczne określono również dla laktozy (4.29), niemniej jednak w tym przypadku stałe Michaelisa-Menten były zdecydowanie wyższe, szybkości reakcji dużo niższe, a efektywność katalizy bardzo mała. W celu określenia przyczyny takich wyników przeprowadzono reakcję w obecności izomerazy glukozy, przekształcającej powstającą w reakcji hydrolizy laktozy, glukozę we fruktozę (4.29). Galaktoza nie była usuwana z mieszaniny reakcyjnej. W tym przypadku efektywność katalizy hydrolizy laktozy była dużo większa i po 12 h reakcji w temperaturze 30°C (zalecanej przez producenta izomerazy glukozy) ponad 30% laktozy znajdującej się w stężeniu 5% w/v uległo hydrolizie. Po 72 h reakcji stwierdzono 75% rozkład laktozy. Podobne rezultaty

otrzymano również w przypadku hodowli szczepu rekombinantowego *P. pastoris* pGAPZalfaA-gal32c gdy szczep ten był hodowany w pożywce SER (4.3).

5.5. Konstrukcja szczepu drożdży *S. cerevisiae* w celu produkcji etanolu z laktozy zawartej w serwatce

W celu otrzymania szczepów drożdży *S. cerevisiae* zdolnych do metabolizmu laktozy do etanolu konieczne jest rozwiązanie problemów:

- nadanie zdolności hydrolizy laktozy do cukrów prostych;
- przystosowanie drożdży do jednoczesnego metabolizmu glukozy i galaktozy powstałych z laktozy w celu uniknięcia dwufazowości wzrostu.

Hydroliza laktozy może odbywać się na drodze:

- wstępnej obróbki substratu poprzez prehydrolizę z zastosowaniem preparatu enzymatycznego β -D-galaktozydazy, bądź stosując biokatalizator z unieruchomionym enzymem,
- adaptacji drożdży do zewnątrzkomórkowej produkcji enzymu hydrolizującego laktozę,
lub
- adaptacji drożdży do wewnątrzkomórkowej produkcji enzymu hydrolizującego laktozę przy jednoczesnym nadaniu drożdżom zdolności do aktywnego pobierania disacharydu.

Przystosowanie drożdży do jednoczesnego metabolizmu glukozy i galaktozy wymaga ingerencji w szlak metaboliczny enzymów rozkładających monocukier. Na podstawie już poznanej wiedzy o szlakach metabolicznych, w przypadku zewnątrzkomórkowej obecności obu monocukrów konieczne jest utrzymanie na stałym poziomie permeazy transportującej galaktozę oraz jej fosfatazy. Natomiast obecność obu monocukrów wewnątrz komórki, wynikająca z wewnątrzkomórkowego rozkładu laktozy, nie wymaga produkcji permeazy galaktozy przez drożdże.

5. WYNIKI

W celu sprawdzenia możliwości zastosowania enzymu β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c do opracowania technologii produkcji etanolu z laktozy skonstruowano szereg rekombinantowych drożdży *S.cerevisiae* oraz określono możliwość wykorzystania enzymu jako biokatalizator.

Otrzymano szczepy rekombinantowe charakteryzujące się:

- zdolnością do jednoczesnego metabolizmu glukozy i galaktozy znajdujących się w zbliżonym stężeniu na zewnątrz komórki (4.35, 4.36),
- zdolnością sekrecji β -D-galaktozydazy na zewnątrz komórki (4.40, 4.42.1),
- zdolnością sekrecji enzymu na zewnątrz komórki oraz do konstytutywnej produkcji enzymów galaktokinazy oraz permeazy galaktozy *S. cerevisiae* (4.40, 4.42.1),
- zdolnością wewnątrzkomórkowej produkcji β -D-galaktozydazy oraz permeazy disacharydu (4.43, 4.46),
- zdolnością wewnątrzkomórkowej produkcji β -D-galaktozydazy, a także permeazy disacharydu i konstytutywnej biosyntezy galaktokinazy oraz urydylotransferazy *S. cerevisiae*.(4.45, 4.46).

5.5.1. Konstrukcja szczepu *S. cerevisiae* zaadaptowanego do jednoczesnego metabolizmu galaktozy i glukozy z pożywki

W celu konstrukcji szczepu *S. cerevisiae* BMA64-1A zdolnego do jednoczesnego metabolizmu glukozy i galaktozy będących w medium hodowlanym skonstruowano plazmid rekombinantowy YlpDCE1-G1-URA3-G2 (4.35) zawierający pod kontrolą konstytutywnych promotorów geny *gal1* i *gal2* *S. cerevisiae*. DNA plazmidu rekombinantowego transformowano komórki drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A (4.18) (otrzymując szczep *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2). Szczep hodowano w warunkach beztlenowych w pożywce YPDG (4.36). Stwierdzono, że szczep ten charakteryzuje się najwydajniejszą produkcją etanolu w przypadku równo molowej ilości cukrów glukozy i galaktozy, o 15% niższą przy stosunku wagowym glukozy do galaktozy 1:3 oraz o 70% niższą wydajnością produkcji etanolu przy stosunku glukozy do galaktozy wynoszącym 3:1. Wprowadzając pod kontrolą konstytutywnego

promotora geny *gal1* i *gal2* *S. cerevisiae*, zaadaptowano komórki drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A do wydajnego metabolizmu cukrów glukozy i galaktozy.

5.5.2. Wybór sekwencji liderowej do zewnątrzkomórkowej produkcji β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c

W ramach doboru właściwej sekwencji liderowej kierującej biosyntetyzowany enzym na zewnątrz komórki otrzymano plazmidy rekombinantowe pSach424-sek.syg.- β -gal32c zawierające w postaci fuzji translacyjnej gen β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c wraz z sekwencją liderową α -faktora, PHO5 lub STA2 (4.37). Otrzymanymi DNA plazmidów rekombinantowych transformowano drożdże *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2 (4.18). W celu określenia zdolności sekrecyjnych rekombinantów, hodowle prowadzono w pożywce YDO-TRP w wytrząsarce powietrznej (4.38) i analizowano frakcje zewnątrz i wewnątrzkomórkowe (4.39). W każdym przypadku zaobserwowano obecność białka wewnątrz komórek drożdży, lecz nie potwierdzono obecności białka w płynie pochodowlanym.

Z tego względu, że otrzymano szczep drożdży *P. pastoris* zdolny do efektywnej sekrecji β -D-galaktozydazy, wprowadzono do komórek drożdży *S. cerevisiae* gen kodujący β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c w postaci fuzji translacyjnej z sekwencją alfa-faktora wraz z genem kodującym endopeptydazę sygnałną Kex2 *P. pastoris*. W tym celu otrzymano plazmid YlpDCE1-kex2-gal32c (4.40) zawierający pod kontrolą promotorów konstytutywnych wspomniane geny. DNA plazmidu rekombinantowego transformowano drożdże *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2 (4.18). Otrzymany szczep rekombinantowych drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2-K2-gal32c wykazywał zdolność rozkładu związku X-gal w teście płytkowym (4.41).

5.5.2.1. Ocena przydatności szczepów *S. cerevisiae* BMA64-1A, *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2 oraz *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2-K2-gal32c do produkcji etanolu z laktozy

W ramach testu utylizacji laktozy do etanolu obok hodowli homogennej badano również zasadność stosowania hodowli mieszanej mikroorganizmów: szczepu *P. pastoris* GS115 pGAPZ α -32c β -gal, zdolnego do produkcji zewnątrzkomórkowej enzymu z surowca węglowego laktozy/glicerolu/glukozy (4.42.2) oraz drożdży

S. cerevisiae BMA64-1A-G1-G2 lub drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2-K2-gal32c (4.42.1). Zawartość etanolu i cukrów analizowano jak podano w punkcie (4.43).

Stosowanie mieszanej hodowli bezwzględniego tlenowca oraz drożdży piekarniczych miało na celu spowodowanie szybszego przejścia między fazą tlenową a fazą beztlenową wzrostu drożdży piekarniczych, jak również dostarczenie enzymu rozkładającego laktozę.

Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli nr 15.

Tabela 15. Wynik testów fermentacyjnych

Szczep	Wydajność produkcji etanolu [% vol/vol]	
	Hodowla homogenna	Hodowla mieszana
S.c. BMA64-1A	0	0,16
S.c. BMA64-1A-G1-G2	0	0,17
S.c. BMA64-1A-G1-G2-K2-gal32c	0,04	0,15

Szczep drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2-K2-gal32c wykazywał ograniczoną zdolność do wzrostu nawet w pożywce zawierającej jako substrat węglowy glukozę. Na podstawie wyników stwierdza się, że ilość produkowanego przez rekombinantowe drożdże *S. cerevisiae* enzymu jest niewystarczająca do przeprowadzenia efektywnie fermentacji alkoholowej z laktozy.

5.5.1. Konstrukcja szczepu *S. cerevisiae* produkującego wewnątrzkomórkowo β -D-galaktozydazę *Arthrobacter* sp. 32c oraz permeazę disacharydu

W celu modyfikacji drożdży *S. cerevisiae* do produkcji wewnątrzkomórkowej β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c oraz permeazy disacharydu wprowadzono do komórek drożdży DNA plazmidów rekombinantowych:

- YlpDCE1-TRP1-PSlac-gal32c (4.43), niosącego pod kontrolą promotorów konstytutywnych geny: permeazy laktozowej *P. stipitis* oraz β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c

5. WYNIKI

- YlpDCE1-TRP1-mal61-gal32c (4.45), niosącego pod kontrolą promotorów konstytutywnych geny: permeazy maltozy *S. cerevisiae* oraz β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c.

Uzyskane szczepy rekombinantowe wykorzystywano w teście fermentacyjnym laktozy do etanolu (4.46). Wyniki przedstawiające poziom uzyskanego etanolu pokazano w tabeli nr 16.

Tabela 16. Steżenie laktozy i etanolu w czasie fermentacji laktozy przez szczepy drożdży.

	S.c. BMA64-1A		S.c. BMA64-1A Pslac-gal32c		S.c. BMA64-1A mal61-gal32c	
	0	120	0	120	0	120
	Czas fermentacji [h]					
	0	120	0	120	0	120
	Zawartość [% w/w]					
laktoza	15	15	15	15	15	14,59
etanol	0	0	0	0	0	0,21

S.c. – *Saccharomyces cerevisiae*

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdza się, że permeaza laktozy *P. stipitis* nie wykazuje zdolności do transportu laktozy do wnętrza rekombinantowych drożdży *S. cerevisiae*. Modyfikacja drożdży w kierunku konstytutywnej biosyntezy permeazy maltozy *mal61* pozwala na uzyskanie jedynie śladowych ilości etanolu.

5.6. Analiza wydajności produkcji etanolu z laktozy z wykorzystaniem preparatu enzymatycznego β -D-galaktozydazy *K. lactis* oraz szczepów rekombinantowych.

Uzyskany rekombinant *S. cerevisiae* BMA64-1A G1-G2 badano pod kątem przydatności w procesie produkcji etanolu z prehydroлизованej laktozy do monocukrów przy zastosowaniu komercyjnie dostępnego preparatu enzymatycznego. Szczep laboratoryjny *S. cerevisiae* BMA64-1A stanowił szczep kontrolny (4.1). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli nr 17.

Tabela 17. Stężenia związków chemicznych w płynie pofermentacyjnym.

Stężenie [g/l]							
<i>S. cerevisiae</i> BMA64-1A							
Czas [h]	0	12	24	36	48	60	80
laktoza	50,4	37,0	37,0	34,3	27,8	2,5	2,1
glukoza	11,4	13,4	11,1	8,7	9,3	15,2	13,9
galaktoza	12,0	16,5	16,4	15,1	14,9	35,4	36,4
octany	2,2	2,0	2,0	1,9	1,8	1,9	2,1
glicerol	1,0	1,5	1,8	2,4	2,7	4,2	4,6
etanol	0,6	3,8	6,7	8,0	7,5	10,7	12,7
<i>S. cerevisiae</i> BMA64-1A G1G2							
laktoza	79,2	67,3	41,5	20,4	14,0	9,0	5,0
glukoza	1,4	4,2	14,0	12,3	10,0	6,4	2,4
galaktoza	3,2	4,8	17,5	16,0	14,0	10,5	8,5
octany	2,3	2,2	2,2	2,3	2,2	2,2	2,4
glicerol	1,2	1,4	1,4	1,6	1,7	3,5	6,3
etanol	1,4	6,9	11,0	27,2	31,6	37,8	53,1

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdza się, że drożdże *S.cerevisiae* BMA64-1A G1G2 wykazują zdolność do przeprowadzania wydajnie fermentacji alkoholowej z hydrolizowanej w trakcie procesu laktozy. W wyniku wprowadzenia genów *gal1* i *gal2* uzyskano ponad 4-krotnie większą wydajność produkcji etanolu w porównaniu do szczepu wyjściowego.

5.7. Otrzymanie β -D-galaktozydaz w postaci unieruchomionych na chitozanie

β -D-galaktozydazy: *Arthrobacter* sp.32c oraz *K. lactis* (Lactozym) immobilizowano (4.48) na wcześniej przygotowanym chitozanie (4.47). Otrzymane biokatalizatory analizowano na podstawie przejawianej aktywności wobec ONPG (4.29). Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 18.

Tabela 18. Wynik testów aktywności preparatów enzymatycznych

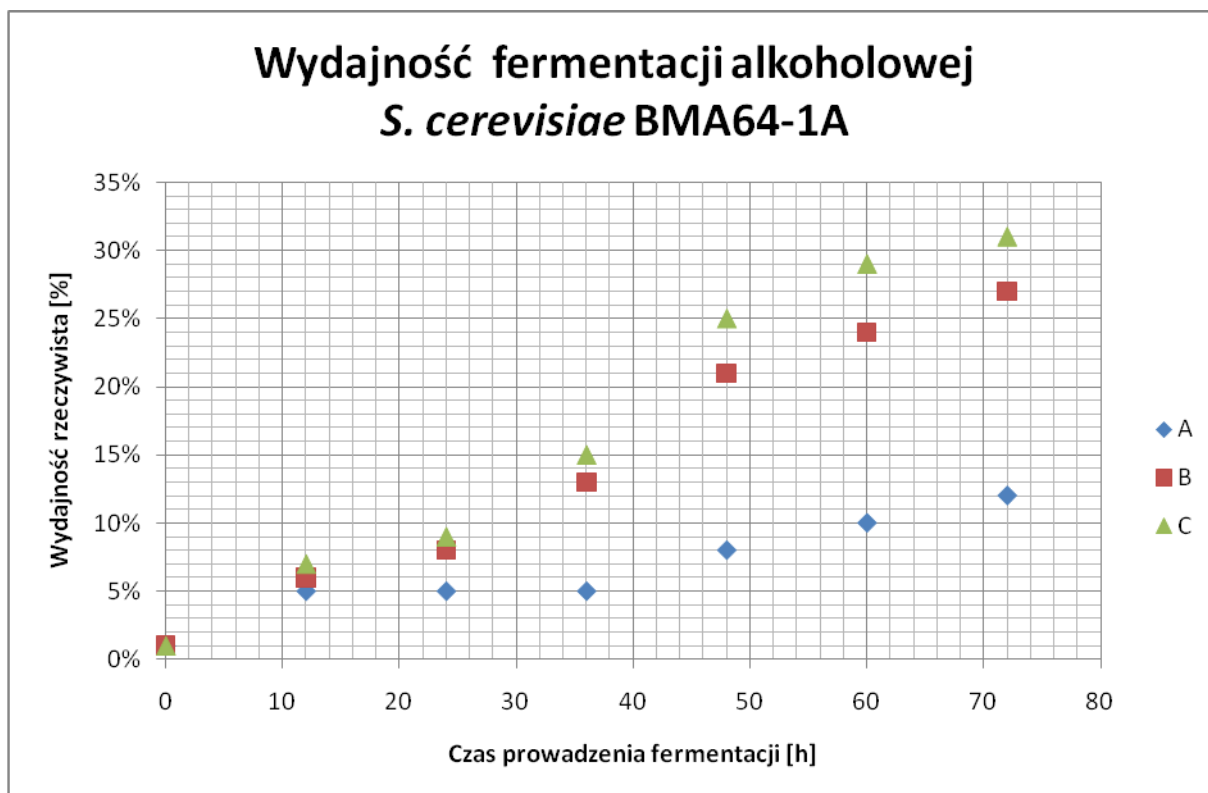
	Wiązanie kowalencyjne z zastosowaniem aldehydu glutarowego	
	<i>Arthrobacter sp. 32c</i>	<i>Lactozym</i>
Aktywność całkowita wolnego enzymu [U]	15200	40000
Aktywność całkowita przesącza po immobilizacji [U]	3496	11415
Związana aktywność* [U]	11704	28585
Związana aktywność [%]	77%	71%
Aktywność całkowita immobilizowanego enzymu [U]	3300	9400
Aktywność właściwa immobilizowanego enzymu [U/g złoża]	1650	4700
Zachowana aktywność po immobilizacji [%]	28%	33%

W wyniku immobilizacji enzymów na chitozanie uzyskano efektywność wiązania od 71 do 77%, natomiast poziom zachowanej aktywności enzymatycznej wyniósł od 28 do 33%. Inhibicja enzymu wynika z nieukierunkowanego wiązania aldehydem glutarowym do złoża.

5.8. Fermentacja alkoholowa z wykorzystaniem imobilizowanych enzymów

Uzyskany rekombinant *S. cerevisiae* BMA64-1A G1-G2, a także laboratoryjny szczep drożdży *S. cerevisiae* BMA64-1A hodowano w pożywce YPL (4.3) wraz z dodaniem immobilizowanych enzymów otrzymanych jak opisano w punkcie 5.7 i postępowano jak podano w punkcie 4.49. Stosowano równe ilości biokatalizatora pod kontem aktywności wobec ONPG. Produkty fermentacji analizowano po upływie czasu 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 i 84 h stosując chromatografię HPLC (4.43). Uzyskane wyniki przedstawiono na wykresach poniżej. Wyniki zostały uśrednione dla 3 pomiarów.

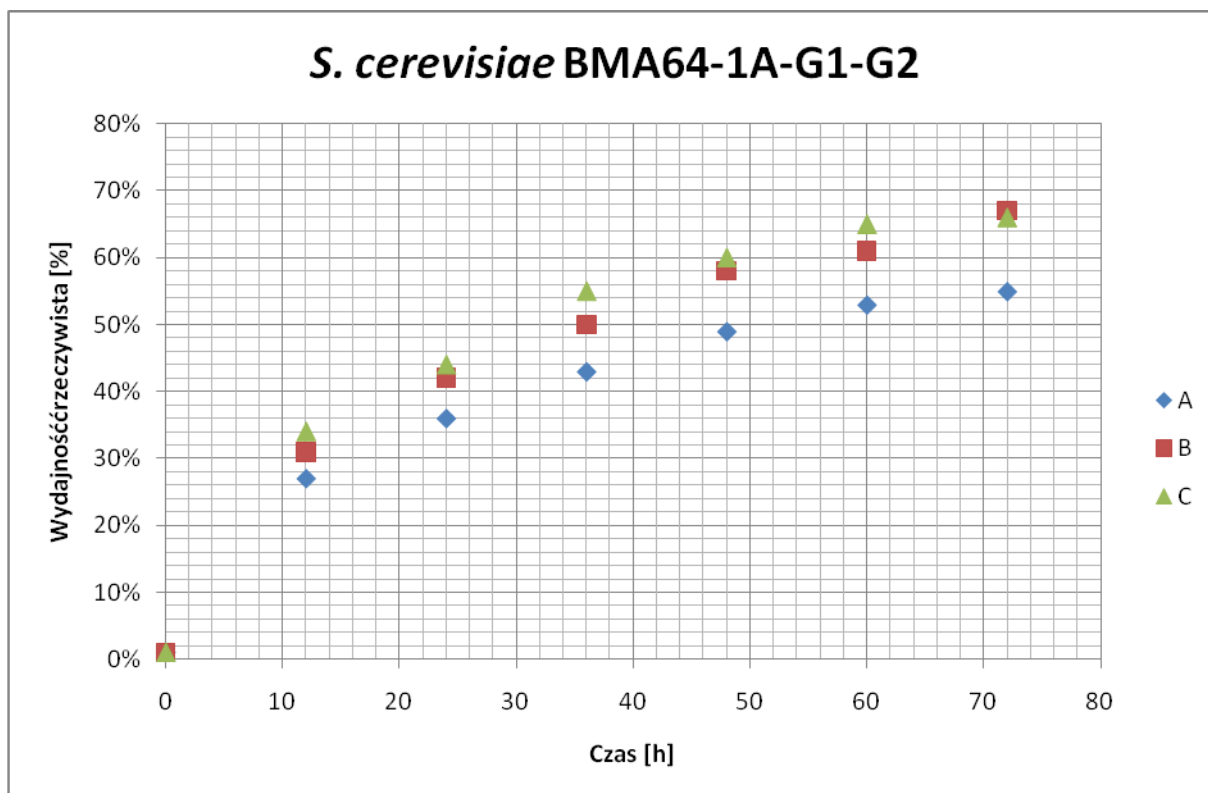
5. WYNIKI



Rys. 23. Wykres przedstawiający wydajność produkcji etanolu (procent wartości teoretycznej) uzyskanej dla wariantu stosowania w mieszaninie fermentacyjnej preparatu płynnego **A**. β -D-galaktozydazy (Lactozym), **B**-zimmobilizowana β -D-galaktozydaza *Arthrobacter* sp. 32c, **C** – zimmobilizowana β -D-galaktozydazy *K. lactis* (Lactozym), w przypadku szczepu laboratoryjnego *S. cerevisiae* BMA64-1A.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdza się, że Lactozym ulega inaktywacji w trakcie prowadzonego procesu fermentacji. Immobilizacja enzymu pozwala na stabilizację i w efekcie zwiększenie wydajności produkcji etanolu. Zarówno zimmobilizowana β -D-galaktozydaza przemysłowa jak i otrzymana w ramach badań pozwalają na uzyskanie podobnych wydajności produkcji etanolu.

5. WYNIKI



Rys. 24. Wykres przedstawiający wydajność produkcji etanolu (procent wartości teoretycznej) uzyskanej dla wariantu stosowania w mieszaninie fermentacyjnej preparatu płynnego **A.** β -D-galaktozydazy (Lactozym), **B-** zimmobilizowana β -D-galaktozydaza *Arthrobacter* sp. 32c, **C** – immobilizowana β -D-galaktozydaza *K. lactis* (Lactozym), w przypadku szczepu laboratoryjnego *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdza się, że wydajność produkcji etanolu z laktozy przez *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2 jest ok. 2-krotnie wyższa w przypadku stosowania immobilizowanych enzymów w porównaniu do szczepu wyjściowego. Wydajność produkcji etanolu z laktozy w przypadku stosowania preparatu enzymatycznego jest 4-krotnie wyższa co może wynikać z różnic w pH.

6. Podsumowanie

Zastosowana metodyka badawcza nie pozwoliła na realizację wszystkich wyznaczonych w tej pracy celów.

Wymiernym efektem prowadzonych badań jest izolacja i konstrukcja wydajnego układu do biosyntezy nowej β -D-galaktozydazy (*Arthrobacter* sp. 32c), o potencjalnie korzystnych właściwościach ze względu na aplikacje w przemyśle. Zaletą enzymu jest aktywność w niskiej temperaturze przejawiająca się w zachowaniu ponad 60% aktywności w temperaturze 30°C oraz powyżej 10% w temperaturze 10°C. Ponadto, enzym wykazuje najwyższą aktywność w pH=6,5, zbliżonym do pH mleka krowiego. Dodatkowo aktywność badanej β -D-galaktozydazy nie ulega zahamowaniu w obecności jonów wapnia jak i w obecności etanolu do stężenia 20%. Wadą enzymu jest fakt ulegania inhibicji przez produkt hydrolizy laktozy - glukozę. Enzym charakteryzuje się wysoką wydajnością hydrolizy laktozy w przypadku gdy produkty hydrolizy są odbierane. Enzym ten może być wykorzystany do wytwarzania galaktozy z laktozy - wydajność procesu powyżej 75% (Zgłoszenie patentowe PL390074).

Produkcja β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp. 32c jest stosunkowo wydajna przy wykorzystaniu rekombinantowych szczepów *P. pastoris* (ok. 100 mg enzymu z 1 litra hodowli w przeliczeniu na czysty preparat enzymatyczny), co jest porównywalne z wydajnością produkcji β -D-galaktozydazy *Kluyveromyces lactis*, enzymu posiadającego najszerze zastosowania w przemyśle. Metoda produkcji β -D-galaktozydazy *Arthrobacter* sp.32c w oparciu o glicerol odpadowy stanowi korzystną pod względem ekonomicznym alternatywę biosyntezy stosunkowo drogiego typu enzymu jakim jest β -D-galaktozydaza (ok. 80 zł/1litr preparatu enzymatycznego).

Próba konstrukcji drożdży *S. cerevisiae* zaadaptowanych do jednoczesnego metabolizmu glukozy i galaktozy zakończyła się sukcesem. Wprowadzenie genów *gal1* i *gal2* pozwoliło na adaptacje drożdży w kierunku jednoczesnego wykorzystania monocukrów z pożywki w przypadku ich równomolowego stężenia. Skonstruowany szczep *S. cerevisiae* BMA64-1A-G1-G2 charakteryzuje się co najmniej dwukrotnie większą wydajnością produkcji etanolu z laktozy w przypadku stosowania preparatu enzymatycznego lub biokatalizatora rozkładającego laktozę. Szczep ten z powodzeniem może być stosowany w procesie produkcji etanolu. Modyfikacja

6. PODSUMOWANIE

drożdży przemysłowych prawdopodobnie pozwoli na uzyskanie szczepów drożdży *S. cerevisiae* wydajniej produkujących etanol w warunkach przemysłowych z laktozy.

Nie udało się skonstruować drożdży *S. cerevisiae* wydajnie metabolizujących laktozę. W wyniku przeprowadzenia badań uzyskano drożdżowe szczepy rekombinantowe cechujące się zróżnicowaną zdolnością do produkcji zewnątrzkomórkowej enzymu (Tabela 19), wykazujące ograniczoną zdolność do pobierania laktozy z środowiska i produkcji etanolu (*S. cerevisiae* BMA64-1A Pslac-gal32c i *S. cerevisiae* BMA64-1A mal61-gal32c) oraz szczep wykazujący ograniczoną zdolność jednoczesnego rozkładu laktozy i produkcji etanolu (*S. cerevisiae* BMA64-1A G1-G2-K2-gal32c).

Tabela 19. Szczepy drożdży skonstruowane w ramach badań do produkcji zewnątrzkomórkowej β -D-galaktozydaz.

Szczep	Produkcja zewnątrzkomórkowa
<i>S.cerevisiae</i> BMA64-1A α -gal22c	-
<i>S.cerevisiae</i> BMA64-1A PHO5-gal22c	-
<i>S.cerevisiae</i> BMA64-1A STA2-gal22c	-
<i>S.cerevisiae</i> BMA64-1A α -gal32c	-
<i>S.cerevisiae</i> BMA64-1A PHO5-gal32c	-
<i>S.cerevisiae</i> BMA64-1A STA2-gal32c	-
<i>S.cerevisiae</i> BMA64-1A G1G2 kex2 α -gal32c	+
<i>P.pastoris</i> GS115 pPICZ α -gal22c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pPICZ-STA2-gal22c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pPICZ-PHO5-gal22c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pGAPZ α -gal22c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pGAPZ-STA2-gal22c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pGAPZ-PHO5-gal22c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pPICZ α -gal32c	+
<i>P.pastoris</i> GS115 pPICZ-STA2-gal32c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pPICZ-PHO5-gal32c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pGAPZ α -gal32c	+
<i>P.pastoris</i> GS115 pGAPZ-STA2-gal32c	-
<i>P.pastoris</i> GS115 pGAPZ-PHO5-gal32c	-

7. Dorobek naukowy

Publikacje:

- **Hildebrandt P**, Wanarska M, Kur J: A new cold-adapted β -D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties. *BMC Microbiol* 2009, 9:151.
- Wanarska M, **Hildebrandt P**, Kur J: A freeze-thaw method for disintegration of *Escherichia coli* cells producing T7 lysozyme used in pBAD expression systems. *Acta Biochim Pol* 2007, 54:671-72.
- Wanarska M, **Hildebrandt P**, Kur J: Drożdżowe systemy ekspresyjne jako narzędzie nowoczesnej mikrobiologii przemysłowej. *Post Mikrobiol* 2008, 47(3): 249-56.

Zgłoszenia patentowe:

- PL385358, **P. Hildebrandt**, M. Wanarska, J. Kur: Zaadaptowana do zimna β -D-galaktozydaza *Arthrobacter* sp. 32c, metoda produkcji i szczepy wykorzystywane w tym sposobie.
- PL384242, **P. Hildebrandt**, M. Wanarska, J. Kur: Mutant Proteinyzy K, metoda produkcji i szczepy wykorzystywane w tym sposobie.
- PL390074, M. Wanarska, **P. Hildebrandt**, J. Kur: Sposób otrzymywania D-galaktozy z laktozy z wykorzystaniem rekombinantowego szczepu drożdży *Pichia pastoris* produkującego β -D-galaktozydazę *Arthrobacter*.
- PL390075, M. Wanarska, **P. Hildebrandt**, J. Kur: Izomeraza arabinozowa *Arthrobacter* sp. 22c, sposób jej otrzymywania oraz sekwencje i szczepy wykorzystywane w tym sposobie.
- PL390076, M. Wanarska, **P. Hildebrandt**, J. Kur: Sposób wytwarzania D-tagatozy z laktozy z wykorzystaniem rekombinantowego szczepu drożdży *Pichia pastoris* wytwarzającego β -D-galaktozydazę *Arthrobacter chlorophenolicus* i izomerazy arabinozowej *Arthrobacter* sp. 22c.

Doniesienia zjazdowe:

- III Krajowy Kongres Biotechnologii, Poznań, 09-12 września 2007r. Plakat: **Piotr Hildebrandt**, Marta Wanarska, Radosław Pladzyk, Józef Kur, Termostabilne białko RecA *Deinococcus geothermalis* DSMZ 11302 – otrzymywanie, charakterystyka biochemiczna i zastosowanie w multipleksowej reakcji PCR.
- III Krajowy Kongres Biotechnologii, Poznań, 09-12 września 2007r. Plakat: Radosław Pladzyk, Marta Wanarska, **Piotr Hildebrandt**, Józef Kur, Otrzymywanie i charakterystyka termostabilnej kinazy pirogronianowej *Thermus thermophilus*.
- XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, 4-7 września 2008r. Hubert Cieśliński, Anna Długołęcka, **Piotr Hildebrandt**, Józef Kur, Biblioteki metagenomowego DNA – źródło nowych biokatalizatorów.
- III Ogólnopolska Konferencja: Biotechnologia Molekularna: "Biotechnologia- od badań podstawowych do wdrożeń": BioMillenium 2009: materiały konferencyjne, Gdańsk, 22-24 października 2009; Wanarska Marta, **Hildebrandt Piotr**, Strycharczyk Donata, Kur Józef; Thermostable RecA proteins from *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus* as potential tools of the molecular diagnostics.
- III Ogólnopolska Konferencja: Biotechnologia Molekularna: "Biotechnologia- od badań podstawowych do wdrożeń": BioMillenium 2009: materiały konferencyjne, Gdańsk, 22-24 października 2009; **Hildebrandt Piotr**, Wanarska Marta, Kur Józef; Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains simultaneously utilizing glucose and galactose to ethanol.
- III Ogólnopolska Konferencja: Biotechnologia Molekularna: "Biotechnologia- od badań podstawowych do wdrożeń": BioMillenium 2009: materiały konferencyjne, Gdańsk, 22-24 października 2009; Wierzbicka Anna, Cieśliński Hubert, **Hildebrandt Piotr**, Wanarska Marta, Kur Józef; Production, purification and characterization of B-D-galactosidase from *Paracoccus* sp. 32d.

Tematyka pracy doktorskiej była przedmiotem grantu promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Tematyka pracy doktorskiej była wspierana przez Urząd Marszałkowski w Gdańsku w ramach projektu Innodoktorant 2009 I edycja.

7. LITERATURA

8. Literatura

1. Mariano, A. P., Costa, C. B., Maciel, M. R., Maugeri Filho, F., Atala, D. I., de Angelis Dde, F. & Maciel Filho, R. (2010). Dynamics and control strategies for a butanol fermentation process. *Appl Biochem Biotechnol* **160**, 2424-48.
2. Connor, M. R., Cann, A. F. & Liao, J. C. (2010). 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1155-64.
3. Park, C. H., Okos, M. R. & Wankat, P. C. (1989). Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation in an immobilized cell trickle bed reactor. *Biotechnol Bioeng* **34**, 18-29.
4. Maddox, I. S. (1989). The acetone-butanol-ethanol fermentation: recent progress in technology. *Biotechnol Genet Eng Rev* **7**, 189-220.
5. Marlatt, J. A. & Datta, R. (1986). Acetone-butanol fermentation process development and economic evaluation. *Biotechnol Prog* **2**, 23-8.
6. Ezeji, T., Qureshi, N. & Blaschek, H. P. (2007). Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* **97**, 1460-9.
7. Hallenbeck, P. C. & Ghosh, D. (2009). Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends Biotechnol* **27**, 287-97.
8. Press, C. (2010). Bioelectricity for transport. <http://www.biofuelstp.eu/bioelectricity.html>
9. Hacatoglu, K., McLellan, P. J. & Layzell, D. B. (2010). Production of bio-synthetic natural gas in Canada. *Environ Sci Technol* **44**, 2183-8.
10. Patel-Predd, P. (2006). Overcoming the hurdles to producing ethanol from cellulose. *Environ Sci Technol* **40**, 4052-3.
11. Lange, J. P., Price, R., Ayoub, P. M., Louis, J., Petrus, L., Clarke, L. & Gosselink, H. (2010). Valeric Biofuels: A Platform of Cellulosic Transportation Fuels. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 4479-4483.
12. Grassi, G. (2001). LATIN AMERICA THEMATIC NETWORK ON BIOENERGY. *BIOFUEL FOR TRANSPORT*. http://www.eubia.org/fileadmin/template/main/res/pdf/publications/04_Brochures_Leaflets/LAMNET%20-%20biofuels%20for%20transport.pdf
13. Bothast, R. J. & Schlicher, M. A. (2005). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 19-25.
14. dos Santos Dda, S., Camelo, A. C., Rodrigues, K. C., Carlos, L. C. & Pereira, N., Jr. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process. *Appl Biochem Biotechnol* **161**, 93-105.
15. Rogers, P. L., Jeon, Y. J., Lee, K. J. & Lawford, H. G. (2007). *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **108**, 263-88.
16. Guo, X., Zhou, J. & Xiao, D. (2010). Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* **160**, 532-8.
17. Oda, Y. & Nakamura, K. (2009). Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. *FEMS Yeast Res* **9**, 742-8.
18. Longhi, L. G., Luvizetto, D. J., Ferreira, L. S., Rech, R., Ayub, M. A. & Secchi, A. R. (2004). A growth kinetic model of *Kluyveromyces marxianus* cultures on cheese whey as substrate. *J Ind Microbiol Biotechnol* **31**, 35-40.
19. Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality. (2005). Feasibility study on an effective and sustainable bio-ethanol production program. Dutch-Sustainable-Development-Group.
20. MRiRW, M. R. i. R. W. (2010). Notowania cen produktów - mleko. <http://ceny.rolnicy.com/ceny-mleko/ceny-mleka-spozywczego-11-10-10.html>

7. LITERATURA

21. da Silva, A. S., Inoue, H., Endo, T., Yano, S. & Bon, E. P. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresour Technol* **101**, 7402-7409.
22. Yang, B., Lu, Y., Gao, K. & Deng, Z. (1997). Study on the hydrolyzate of sugarcane bagasse to ethanol by fermentation. *Chin J Biotechnol* **13**, 253-61.
23. Jolly, L. (2003). Agriculture: a Source of Green Energy. *Symposium agriculture*.http://www.mchagric.org/images/pdf/l_jolly.pdf
24. OECD-FAO. (2008). OECD-FAO Agricultural Outlook 2008–2017 Highlights. <http://www.agri-outlook.org/dataoecd/54/15/40715381.pdf>
25. Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins—from 'gutter-to-gold'. *Int Dairy J* **18**, 695–704.
26. Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* **57**, 1-11.
27. Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Tech* **57**, 1-11.
28. Yang, S. T. & Silva, E. M. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J Dairy Sci* **78**, 2541-62.
29. Guimaraes, P. M., Teixeira, J. A. & Domingues, L. (2010). Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnol Adv* **28**, 375-84.
30. Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D. G., Santas, P., Santas, R. & Corleti, V. (2007). Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresour Technol* **98**, 296-301.
31. Brethauer, S. & Wyman, C. E. (2010). Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour Technol* **101**, 4862-74.
32. Miyamoto, K. (1997). Renewable biological systems for alternative sustainable energy production *FAO Agricultural Services Bulletin - 128*.
<http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e00.HTM>
33. Ramakrishnan, S. & Hartley, B. S. (1993). Fermentation of lactose by yeast cells secreting recombinant fungal lactase. *Appl Environ Microbiol* **59**, 4230-5.
34. Rubio-Teixeira, M. (2006). Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol Adv* **24**, 212-25.
35. Sreekrishna, K. & Dickson, R. C. (1985). Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7909-13.
36. Rubio-Teixeira, M., Castrillo, J. I., Adam, A. C., Ugalde, U. O. & Polaina, J. (1998). Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 827-37.
37. Becerra, S. D. P., E. Rodriguez-Belmote, M.E. Cerdan & M.I. Gonzalez Siso. (2002). Metabolic engineering for direct lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* **24**, 1391-1396.
38. Porro, D., Martegani, E., Ranzi, B.M., Alberghina, L. (1992). Lactose/whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol Bioeng* **39**, 799-805.
39. Nakagawa, T., Fujimoto, Y., Ikehata, R., Miyaji, T. & Tomizuka, N. (2006). Purification and molecular characterization of cold-active beta-galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 720-5.
40. Widmer, F. & Leuba, J. L. (1979). beta-Galactosidase from *Aspergillus niger*. Separation and characterization of three multiple forms. *Eur J Biochem* **100**, 559-67.

7. LITERATURA

41. Dickson, R. C., Dickson, L. R. & Markin, J. S. (1979). Purification and properties of an inducible beta-galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J Bacteriol* **137**, 51-61.
42. Jacobson, R. H., Zhang, X. J., DuBose, R. F. & Matthews, B. W. (1994). Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*. *Nature* **369**, 761-6.
43. Cieslinski, H., Kur, J., Bialkowska, A., Baran, I., Makowski, K. & Turkiewicz, M. (2005). Cloning, expression, and purification of a recombinant cold-adapted beta-galactosidase from antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b. *Protein Expr Purif* **39**, 27-34.
44. Turkiewicz, M., Kur, J., Bialkowska, A., Cieslinski, H., Kalinowska, H. & Bielecki, S. (2003). Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b as a source of cold-adapted beta-galactosidase. *Biomol Eng* **20**, 317-24.
45. Hoyoux, A., Jennes, I., Dubois, P., Genicot, S., Dubail, F., Francois, J. M., Baise, E., Feller, G. & Gerday, C. (2001). Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1529-35.
46. Fernandes, S., Geueke, B., Delgado, O., Coleman, J. & Hatti-Kaul, R. (2002). Beta-galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterization and application for lactose hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 313-21.
47. Skalova, T., Dohnalek, J., Spiwok, V., Lipovova, P., Vondrackova, E., Petrokova, H., Duskova, J., Strnad, H., Kralova, B. & Hasek, J. (2005). Cold-active beta-galactosidase from *Arthrobacter* sp. C2-2 forms compact 660 kDa hexamers: crystal structure at 1.9A resolution. *J Mol Biol* **353**, 282-94.
48. Hu, J. M., Li, H., Cao, L. X., Wu, P. C., Zhang, C. T., Sang, S. L., Zhang, X. Y., Chen, M. J., Lu, J. Q. & Liu, Y. H. (2007). Molecular cloning and characterization of the gene encoding cold-active beta-galactosidase from a psychrotrophic and halotolerant *Planococcus* sp. L4. *J Agric Food Chem* **55**, 2217-24.
49. Chen, Q. Z. K. Z. a. X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal* **9**, 33-40.
50. N. Albayrak, S.-T. Y. (2002). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 371-383.
51. Woudenberg-van Oosterom, M., van Belle, H. J. A., van Rantwijk, F. & Sheldon, R. A. (1998). Immobilised β -galactosidases and their use in galactoside synthesis. *J. Mol. Catal. A: Chemical* **134**, 267-274.
52. Weetall, H. H., Havewala, N. B., Pitcher Jr., W. H., Detar, C. C., Vann, W. P. & Yaverbaum, S. (1974). The preparation of immobilized lactase and its use in the enzymatic hydrolysis of acid whey. *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 295-313.
53. Ladero, M., Santos, A., Garcia, J. L. & Garcia-Ochoa, F. (2001). Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: kinetic modelling. *Enzyme Microb. Technol.* **29**, 181-193.
54. Giacomini, C., Irazoqui, G., Batista-Viera, F. & Brena, B. M. (2001). Influence of the immobilization chemistry on the properties of immobilized β -galactosidases. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **11**, 597-606.
55. Tanriseven, A. & Dogan, S. (2002). A novel method for the immobilization of β -galactosidase. *Proc. Biochem.* **38**, 27-30.
56. Illanes, A., Altamirano, C., Aillapan, A., Tomasello, G. & Zuniga, M. E. (1998). Packed-bed reactor performance with immobilized lactase under thermal inactivation. *Enzyme Microb. Technol.* **23**, 3-9.
57. Sheu, D.-C., Li, S.-Y., Duan, K.-J. & Chen, C. W. (1998). Production of galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated chitosan beads. *Biotechnol. Tech.* **12**, 273-276.

7. LITERATURA

58. Carpio, C., Gonzalez, P., Ruales, J. & Batista-Viera, F. (2000). Bone-bound enzymes for food industry application *Food Chem.* **68**, 403-409.
59. Kossevaa, M. R., Panesar, P. S., Kaur, G. & Kennedy, J. F. (2009). Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules* **45**, 437-447.
60. Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 126-139.
61. Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G. & Thorner, J. (1983). Yeast alpha factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* **32**, 839-52.
62. Miyajima, A., Bond, M. W., Otsu, K., Arai, K. & Arai, N. (1985). Secretion of mature mouse interleukin-2 by *Saccharomyces cerevisiae*: use of a general secretion vector containing promoter and leader sequences of the mating pheromone alpha-factor. *Gene* **37**, 155-61.
63. Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. & Matsuo, H. (1989). Characterization of KEX2-encoded endopeptidase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 305-11.
64. Rockwell, N. C. & Thorner, J. W. (2004). The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends Biochem Sci* **29**, 80-7.
65. Rothblatt, J. A. & Meyer, D. I. (1986). Secretion in yeast: reconstitution of the translocation and glycosylation of alpha-factor and invertase in a homologous cell-free system. *Cell* **44**, 619-28.
66. Rothblatt, J. A. & Meyer, D. I. (1986). Secretion in yeast: translocation and glycosylation of prepro-alpha-factor in vitro can occur via an ATP-dependent post-translational mechanism. *EMBO J* **5**, 1031-6.
67. Alexandar, I., Venkov, P., Del Giudice, A., Wolf, K., Massardo, D. R. & Del Giudice, L. (2001). Protein overexport in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant depends on mitochondrial genome integrity and function. *Microbiol Res* **156**, 9-12.
68. Sidhu, R. S., Mathewes, S. & Bollon, A. P. (1991). Selection of secretory protein-encoding genes by fusion with PHO5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **107**, 111-8.
69. Vanoni, M., Porro, D., Martegani, E. & Alberghina, L. (1989). Secretion of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal sequence from the glucoamylase-encoding STA2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 1331-8.
70. Chung, B. H., Nam, S. W., Kim, B. M. & Park, Y. H. (1996). Highly efficient secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal peptides. *Biotechnol Bioeng* **49**, 473-9.
71. Hitzeman, R. A., Chen, C. Y., Dowbenko, D. J., Renz, M. E., Liu, C., Pai, R., Simpson, N. J., Kohr, W. J., Singh, A., Chisholm, V. & et al. (1990). Use of heterologous and homologous signal sequences for secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol* **185**, 421-40.
72. Wheatley, J. L. & Holyoak, T. (2007). Differential P1 arginine and lysine recognition in the prototypical proprotein convertase Kex2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6626-31.
73. Nombela, C., Gil, C. & Chaffin, W. L. (2006). Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol* **14**, 15-21.
74. Zhou, Y., Guan, L., Freitas, J. A. & Kaback, H. R. (2008). Opening and closing of the periplasmic gate in lactose permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3774-8.
75. Cheng, Q. & Michels, C. A. (1989). The maltose permease encoded by the MAL61 gene of *Saccharomyces cerevisiae* exhibits both sequence and structural homology to other sugar transporters. *Genetics* **123**, 477-84.
76. Medintz, I., Wang, X., Hradek, T. & Michels, C. A. (2000). A PEST-like sequence in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces* maltose permease is required for glucose-induced proteolysis and rapid inactivation of transport activity. *Biochemistry* **39**, 4518-26.

7. LITERATURA

77. Jiang, H., Medintz, I., Zhang, B. & Michels, C. A. (2000). Metabolic signals trigger glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *J Bacteriol* **182**, 647-54.
78. Scott, A. & Timson, D. J. (2007). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose mutarotase/UDP-galactose 4-epimerase protein, Gal10p. *FEMS Yeast Res* **7**, 366-71.
79. Hawkins, K. M. & Smolke, C. D. (2006). The regulatory roles of the galactose permease and kinase in the induction response of the GAL network in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**, 13485-92.
80. Baker, S. M., Okkema, P. G. & Jaehning, J. A. (1984). Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL7 gene on autonomous plasmids. *Mol Cell Biol* **4**, 2062-71.
81. Wanarska, M., Hildebrandt, P. & Kur, J. (2007). A freeze-thaw method for disintegration of *Escherichia coli* cells producing T7 lysozyme used in pBAD expression systems. *Acta Biochim Pol* **54**, 671-2.
82. Mumberg, D., Muller, R. & Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-22.
83. Stearman, R., Dancis, A. & Klausner, R. D. (1998). YIpDCE1 - an integrating plasmid for dual constitutive expression in yeast. *Gene* **212**, 197-202.
84. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
85. Joseph Sambrook, P. M. C. I., Melbourne, Australia; David Russell. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
86. REN21. (2010). Renewables Global Status Report 2010.
http://www.ren21.net/globalstatusreport/REN21_GSR_2010_full.pdf
87. Alterthum, F. & Ingram, L. O. (1989). Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1943-8.
88. Wanarska, M. (2005). Termostabilna β -D-galaktozydaza *Pyrococcus woesei* – konstrukcja nowych systemów ekspresyjnych, oczyszczenie, charakterystyka i immobilizacja enzymu. Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska