

Magdalena Miklaszewska

Promotor: Prof. dr hab. Antoni Banaś

Specyficzność substratowa wybranych reduktaz kwasów tłuszczowych i syntaz wosków

Woski, czyli estry kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych, są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Główne funkcje wosków to magazynowanie energii, ochrona przed wysychaniem, promieniowaniem UV i patogenami oraz udział w komunikacji chemicznej, echolokacji i kontroli zanurzenia. W przemyśle woski znalazły zastosowanie jako składniki smarów, kosmetyków, farb, emulsji i leków, a uzyskuje się je głównie na drodze syntezy chemicznej bądź z nasion *Simmondsia chinensis* (jojoba), w których są one gromadzone jako tłuszcze zapasowe. Obie te metody wiążą się z wysokimi kosztami, dlatego obecnie badane są możliwości produkcji wosków w organizmach jednokomórkowych i roślinach, które po odpowiednich modyfikacjach z użyciem metod inżynierii genetycznej mogą stać się atrakcyjnym źródłem tych substancji.

W końcowy etap biosyntezy wosków zaangażowane są dwa typy enzymów: reduktazy kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acyl-CoA reductase*, FAR) oraz syntazy wosków (ang. *wax synthase*, WS). Reduktazy kwasów tłuszczowych przeprowadzają redukcję kwasów tłuszczowych połączonych z koenzymem A do odpowiadających im alkoholi. Syntazy wosków katalizują estryfikację kwasów tłuszczowych połączonych z koenzymem A wykorzystując alkohole wytworzone przez reduktazę.

Ze względu na to, że właściwości wosków, takie jak temperatura topnienia czy odporność na utlenianie, są determinowane przez strukturę chemiczną budujących je kwasów i alkoholi tłuszczowych, istotnym etapem projektowania biotechnologicznego procesu ich produkcji jest wybór enzymów FAR i WS o odpowiedniej specyficzności substratowej.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej określono specyficzność substratową wybranych reduktaz kwasów tłuszczowych i syntaz wosków. Badane enzymy FAR i WS pochodziły z *Arabidopsis thaliana* (AtFAR5), *Simmondsia chinensis* (SchFAR, SchWS), *Mus musculus* (MmFAR1, MmWS) i *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (MhWS2). Geny kodujące wybrane enzymy FAR i WS wprowadzono do dwóch szczepów *Saccharomyces cerevisiae*: szczepu dzikiego BY4742 oraz szczepu H1246, w którym wyłączono są geny odpowiedzialne za syntezę estrów steroli oraz triacylogliceroli. Specyficzność substratową badanych enzymów określano zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*, wykorzystując, w tym

ostatnim przypadku, frakcje mikrosomalne wyizolowane z transgenicznych drożdży. Enzymy testowano pod względem ich specyficzności w stosunku do substratów o różnej długości łańcucha węglowego i o różnym stopniu nasycenia. Badano również wpływ na aktywność enzymów występowania dodatkowych grup (np. hydroksylowych) w łańcuchu węglowym wybranych substratów.

Reduktaza kwasów tłuszczowych z *M. musculus* wykazywała najwyższą aktywność wobec nasyconych 16- i 18-węglowych substratów. Roślinne reduktazy (SchFAR i AtFAR5) charakteryzowały się raczej wąską specyficznością substratową, produkując głównie alkohol stearylowy (18:0-OH).

Syntazy wosków z *M. musculus* i *M. hydrocarbonoclasticus* efektywnie wytwarzały woski z wykorzystaniem szerokiego spektrum substratów z wyraźną preferencją wobec kwasów tłuszczowych i alkoholi tłuszczowych o długości C12-C18. Najwyższą ilość wosków produkowanych przez syntazę SchWS z *S. chinensis* zaobserwowano dla niektórych kombinacji kwasów i alkoholi tłuszczowych o długości C14-C18. Enzym wykazywał również stosunkowo wysoką aktywność wobec 20:1-CoA.

Analiza danych dotyczących aktywności i specyficzności substratowej badanych enzymów wskazuje, że mogą być one wykorzystywane do produkcji wosków o różnych właściwościach, dopasowanych do konkretnych zastosowań przemysłowych.