

FTB 49 (3) 329-335.

(FTB-2754)

## **Optimalni uvjeti za proizvodnju biomase i rekombinantne glicerol kinaze s pomoću kvasca *Pichia pastoris***

### **Sažetak**

Gen za ekstracelularnu glicerol kinazu iz *Saccharomyces cerevisiae* (*GUT1*) kloniran je u ekspresijski vektor pPICZα A i integriran u genom metilotrofnog kvasca *Pichia pastoris* X-33. Prisutnost *GUT1* potvrđena je PCR analizom. Izdvojena su četiri klona, u kojima je ispitana funkcionalnost rekombinantnog enzima. Jedan je od ispitanih klonova imao aktivnost glicerol kinaze od 0,32 U/mL i specifičnu aktivnost proteina od 0,0025 U/mg. Podloga za maksimalnu proizvodnju biomase na tresilici s pomoću rekombinantnog kvasca *Pichia pastoris* optimirana je uporabom glicerola, volumnog udjela od 2,31 %, kao izvora ugljika. Za optimiranje je upotrijebljena metoda odzivnih površina. U preliminarnim su ispitivanjima, primjenom Plackett-Burmanovog dizajna, određeni najvažniji čimbenici što utječu na proizvodnju biomase, a to su: volumni udio glicerola ( $\varphi(\text{Gly})$ ) i vrijeme uzgoja ( $t$ ). Daljnji su eksperimenti provedeni radi optimiranja proizvodnje biomase, a pratili su centralno složeni dizajn kao funkciju volumnog udjela glicerola i vremena. Volumni je udio glicerola imao pozitivni linearni utjecaj na proizvodnju biomase. Vrijeme uzgoja je također bitno utjecalo (na razini linearno pozitivnih i kvadratnih zavisnosti) na proizvodnju biomase. Eksperimentalni su se podaci dobro uklapali u konveksnu funkciju koja opisuje polinom drugoga reda, u kojem je biomasa funkcija obaju faktora ( $R^2=0,946$ ). Prinos i specifična aktivnost glicerol kinaze ponajprije su ovisili o dodatku glicerola i metanola podlozi. Sastav optimirane podloge za proizvodnju enzima bio je: 1 % kvašćeva ekstrakta, 1 % peptona, 100 mM fosfatnog pufera (pH=6,0), 1,34 % podloge s kvascem i dušikom,  $4 \cdot 10^{-5}$  % biotina, 1 % metanola i 1 % glicerola, pomoću kojih je dobivena aktivnost glicerol kinaze od 0,89 U/mL i koncentracija ukupnih proteina od 14,55 g/L u podlozi nakon 48 sati uzgoja.

*Ključne riječi:* *Pichia pastoris*, rekombinantna glicerol kinaza, izvor ugljika, biomasa, metoda odzivnih površina