

FTB 47 (1) 90-95.

(FTB-1981)

Heterologna ekspresija ksilanaze II iz plijesni *Aspergillus usamii* u kvascu *Pichia pastoris*

Sažetak

Da bi se uspješno proizvela ksilanaza za primjenu u prehrambenoj industriji, gen koji kodira ksilanazu II (Xyn II) iz plijesni *Aspergillus usamii* kloniran je u vektor pPIC9K i elektroporacijom integriran u genom kvasca *Pichia pastoris* KM71. Rekombinantni sojevi *P. pastoris* (*His⁺Mut^s*) uzgojeni su na podlogama s minimalnom količinom dekstroze te izdvojeni pomoću PCR metode. Procjenom aktivnosti i molekularne mase enzima (SDS-PAGE metodom) utvrđeno je da je dodatak metanola inducirao ekstracelularnu ekspresiju Xyn II u kvascu *P. pastoris*. U pokusu na tresilici izmjerena je najveća aktivnost ksilanaze od 1760 U/mL i specifična aktivnost od 3846,83 U/mg. Optimalna pH-vrijednost za aktivnost rekombinantne Xyn II bila je 4, a optimalna temperatura 50 °C. Ksilanaza je bila stabilna na temperaturama nižim od optimalne, te u rasponu pH=3-5. Pomoću SDS-PAGE metode procijenjena je molekularna masa enzima od 21 kDa. Michaelisova konstanta iznosila je $K_m=4,55$ mg/mL, maksimalna brzina reakcija bila je $v_{max}=15,15$ mM/s, a kinetička konstanta $k_{cat}=455$ s⁻¹. Aktivnost enzima potaknuta je dodatkom EDTA i Ca²⁺ iona, a inhibirana ionima Mn²⁺ i Fe²⁺. U radu je prvi put opisana mogućnost masovne proizvodnje proteina iz *A. usamii* s pomoću kvasca *P. pastoris*.

Ključne riječi: *Aspergillus usamii*, karakterizacija, ekspresija, ksilanaza, *Pichia pastoris*