

## **Termodinamička svojstva nove invertaze proizvedene s pomoću dvostruko mutiranoga kvasca *Kluyveromyces marxianus***

### **Sažetak**

Promjenom različitih varijabla procesa optimirana je kinetika proizvodnje intracelularne invertaze u 23-litarskom fermentoru s pomoću dvostruko mutiranoga kvasca *Kluyveromyces marxianus*. Maksimalni protok ( $Q_P$ ) i prinos invertaze, dobivene s pomoću mutanta M15 na podlozi od melase (150 g/L ukupnih fermentirajućih šećera), pri 50 °C i pH=5,5 bili su: 1222 U/(L·h) i 160 U/g podloge, tj. dvostruko veći nego s roditeljskim sojem. Za razliku od prijašnjih istraživanja na drugim kvascima i filamentoznim plijesnima, u kojima su šećeri uzrokovali kataboličku represiju enzima, u ovom ispitivanju glukoza ili saharoza (u koncentracijama od 100, 150 ili 170 g/L) nisu potaknule kataboličku represiju invertaze pri optimiranim uvjetima fermentacije. Invertaze dobivene s pomoću divljeg i mutiranog soja kvasca pročišćene su taloženjem pomoću amonijeva sulfata i razdvojene kromatografijom na stupcu, te su ispitana njihova kinetička i termodinamička svojstva. Dobivene invertaze nisu imale izraženi pad aktivnosti u kiselom području, a usporedbom vrijednosti  $pK_a$  i energije ionizacije utvrđeno je da su karboksilne skupine enzima sudjelovale u prijenosu protona tijekom aktivne katalize. Iz omjera  $K_{cat}/K_m$  i  $v_{max}/K_m$  vidljivo je da je invertaza dobivena s pomoću mutiranog soja kvasca specifična za hidrolizu sukroze, te da je stabilna u različitim puferima pH-vrijednosti od 3 do 10 i pri temperaturi od 50 do 70 °C, što se vidi iz dugog poluvremena njezina raspada. Ta je invertaza imala kudikamo niže vrijednosti entalpije ( $\Delta H^*$ ) i entropije ( $\Delta S^*$ ), termodinamički je bila stabilnija, a to se vidi iz porasta Gibbsove slobodne energije pri višim temperaturama. Stoga je zaključeno da je invertaza dobivena s pomoću mutiranog soja kvasca *Kluyveromyces marxianus* otporna na kataboličku represiju te se može upotrijebiti u proizvodnji fruktoznoga sirupa ili etanola s velikim udjelom alkohola.

*Ključne riječi:* entalpija/entropija, invertaza, *Kluyveromyces marxianus*, optimiranje podloge za uzgoj, pročišćavanje enzima, termodinamička stabilnost