SANTRAUKA

Metilotrofinės *Pichia pastoris* mielės yra plačiai naudojamos įvairių rekombinantinių baltymų sintezei. Naudojant šių mielių raiškos sistemas, gaunamos didelės tikslinių baltymų išeigos, *P. pastoris* producentai pasižymi greitu ląstelių augimu ir nesudėtingu kultivavimu. Šios mielės yra dažnai naudojamos toksiškų ląstelei-šeimininkui baltymų sintezei, nes šie baltymai yra sekretuojami į terpę. Esant neoptimalioms producento kultivavimo ir baltymo sintezės indukcijos sąlygoms, gaunamos labai mažos produkto išeigos, rekombinantiniai baltymai yra užteršiami dideliais endogeninių baltymų kiekiais, ypač proteazėmis, kurios gali skaldyti rekombinantinį baltymą ir apsunkinti produkto gryninimą.

Šiame darbe nagrinėjama rekombinantinės mutantinės DNazės I raiška *P. pastoris* mielių ląstelėse. Darbo tikslas – optimizuoti producento auginimo sąlygas (įvertinti terpės komponentų, pH, temperatūros įtaką) bei parinkti indukcijos metanoliu sąlygas, norint gauti kuo didesnes sekretuojamo rekombinantinio baltymo išeigas.

Darbo metu buvo parinktos optimalios producento auginimo ir indukcijos metanoliu sąlygos. Nustatyta, kad didžiausią įtaką mutantinės DNazės I producento biomasės augimui ir baltymo sekrecijai turi kompleksiniai, azoto turintys, terpės komponentai. Žemesnė auginimo temperatūra ir terpės pH neturi žymios įtakos tikslinio baltymo sekrecijai bei nesumažina pašalinių baltymų kiekio terpėje. Iš eksperimentų nustatyta, kad mutantinės DNazės I baltymo sekrecija priklauso nuo metanolio kiekio bei biomasės koncentracijos indukcijos metu. Šiame darbe buvo nustatytos indukcijos sąlygos, kuriomis gaunamos didžiausios mutantinės DNazės I išeigos ir mažiausi pašalinių baltymų kiekiai terpėje.

Optimization of the conditions for recombinant protein secretion in *P. pastoris* yeast

Rokas Kireilis

Bachelor Thesis

SUMMARY

Methylotrophic *Pichia pastoris* yeast are widely used for different recombinant protein synthesis. By using these yeast expression systems you can get greater amount of the protein of interest, *P. pastoris* microorganisms have the ability to grow fast and they are easy to cultivate. These yeast are often used for toxic cell-host protein synthesis, because these proteins are secreted to the growth medium. When the conditions of the cultivation of this microorganism and the induction of protein synthesis are not optimal the product quantity is very low, recombinant proteins are contaminated by endogenous proteins especially proteases, which can degrade recombinant protein and make product purification process more difficult.

In this work the expression of recombinant mutant DNase I in *P. pastoris* cells is being investigated. The purpose of this work is to optimize the growth conditions of the microorganism (evaluating growing medium components, pH and temperature impact) and find the best methanol induction conditions, with intended final result to be the highest possible synthesized recombinant protein production level.

With this work the optimal growing conditions of the microorganism and the methanol induction conditions have been established. It has been found that the greatest impact for the growth and the protein secretion of microorganism, which produce mutant DNase I, have complex components containing nitrogen in the growth medium. The lower growing temperature and pH do not have significant importance for the secretion of the protein of interest and do not reduce the quantity of endogenous protein in the growth medium. Whilst conducting the experiments it was established that mutant DNase I protein secretion depends on the amount of methanol and the concentration of cells biomass during the induction. With this work the induction conditions, which lead to the greatest mutant DNase I protein production and the lowest endogenous protein quantities in the growth medium, have been established.