

***Thermus aquaticus* YT-1 lizato skaidrinimas tangentinio mikrofiltravimo metodu**

D. Mažeika, R. Stupak, J. Liesienė, Z. Valančius

Kauno technologijos universitetas,

Radvilėnų pl. 19, LT-50254 Kaunas, Lietuva

El. paštas darius.mazeika@thermofisher.com

crossref <http://dx.doi.org/10.5755/j01.ct.59.1.1530>

Gauta 2012 m. vasario 8 d.; priimta spaudai 2012 m. kovo 5 d.

Darbe tirti *Thermus aquaticus* YT-1 bakterijų lizato skaidrinimo, naudojant tangentinio mikrofiltravimo sistemą, dėsningumai. Tarpusavyje lygintos komercinės 0,2 µm ir 0,65 µm skersmens porų membranos. Abiems membranoms parinktos optimalios proceso atlikimo sąlygos. Kiekvienai membranai nustatytas optimalus membranos savitasis našumas, įvertintos baltymų, nukleorūgščių, polisacharidų ir tikslinio produkto Taq DNR polimerazės išeigos, jų sulaukymo koeficientai bei praėjimo per membraną greičio konstantos. Nustatyta, kad membranos savitasis našumas yra didesnis naudojant 0,2 µm skersmens porų membraną, o produkto išeiga siekia 96,3 ± 3,7 %. Taip pat parodyta, kad medžiaga, iš kurios pagaminta membrana, turi įtakos proceso našumui. Apibendrinus visus rezultatus nustatyta, kad *T. aquaticus* YT-1 bakterijų lizatui skaidrinti, gaunant didžiausią Taq DNR polimerazės išeigą, reikia naudoti 0,2 µm skersmens porų membraną.

Įvadas

Vidulastelinių makromolekulių išgavimą galima išskirti į kelis etapus: pasirinkto mikroorganizmo auginimą, biomasės ardymą, suardytų ląstelių skaidrinimą ir tikslinio produkto gryninimą, naudojant įvairius didelės skiriamosios gebos metodus. Suardytos ląstelės dažniausiai skaidrinamos suspensiją centrifuguojant bei filtruojant [1]. Vienas iš alternatyvių metodų, kuris vis plačiau taikomas suardytoms ląstelėms skaidrinti, yra tangentinis mikrofiltravimas. Šis metodas patrauklus dėl mažų energijos sąnaudų, galimybės dirbti su skirtingais tirpalais naudojant tą pačią aparatūrą, nedenaūruojančių sąlygų ir sąlyginai saugaus naudojimo [2].

Tangentinis mikrofiltravimas dažnai naudojamas kaip pirma baltymų ir fermentų gryninimo stadija. Juo iš terpės, kurioje yra tikslinis produktas, atskiriamos ląstelės, jų nuolaužos po suardymo ir kitos netirpios medžiagos, kurių dydis 0,02–10 µm. Filtravimo proceso varmoji jėga yra slėgių skirtumas abipus membranos, todėl procesas yra efektyvus net tais atvejais, kai tankis tarp dalelių ir terpės praktiškai nesiskiria [3].

Paprastai biologinius tirpalus yra labai sudėtinga nufiltruoti, nes tai yra neniutoniniai tirpalai, arba todėl, kad membranos paviršiuje susiformuoja spūdis ir membraną blokuojantis sluoksnis [4]. Dėl šio susidariusio sluoksnio filtravimo metu mažėja membranos savitasis našumas ir didėja slėgių skirtumas abipus membranos. Todėl suardytų ląstelių skaidrinimas yra sudėtingas procesas, kuriam būtina parinkti optimalias sąlygas.

Literatūroje yra daug duomenų apie suardytų gramneigiamų *E. coli* bakterijų skaidrinimą tangentinio mikrofiltravimo metodu [5–7]. Yra parodyta, kad suardytų *E. coli* ląstelių mikrofiltravimo efektyvumas priklauso nuo siurblio našumo, ląstelių santalkos, flokuliantų naudojimo.

Tačiau duomenų apie tangentinio mikrofiltravimo eksperimentus, atliktus su kitais suardytais mikroorga-

nizmais, yra labai nedaug. Yra parodyta, kad suardytų mielių skaidrinimas yra efektyvesnis periodiškai naudojant atgalinį plovimą mikrofiltravimo metu [8]. Taip pat aprašytas sekretuojamos invertazės gryninimas iš mielių lizato, naudojant 0,45 µm porų skersmens membraną [9]. Gana išsamiai buvo išnagrinėtas suardytų *Nocardia corallina* ląstelių skaidrinimo priklausomumas nuo suardymo metodo [10]. Tačiau duomenų yra per mažai, kad būtų galima pasakyti, jog tangentinis mikrofiltravimas gali būti naudojamas įvairiems suardytiems mikroorganizmams skaidrinti, kokios membranos yra tinkamos šiam procesui. Daugiau duomenų apie suardytų skirtingų bakterijų skaidrinimą tangentinio mikrofiltravimo metodu leistų ieškoti bendrų dėsningumų, palengvintų proceso optimizavimą bei suteiktų daugiau žinių apie skirtingų ląstelių įtaką procesui.

Thermus aquaticus YT-1 yra gramneigiama termofilinė lazdelinė bakterija, kurios optimali augimo temperatūra yra 70–75 °C. Pagrindinis produktas, gaminamas iš šio mikroorganizmo, yra Taq DNR polimerazė. Šis fermentas pasižymi dideliu stabilumu aukštoje temperatūroje bei katalitiniu aktyvumu, todėl yra vienas plačiausiai naudojamų fermentų biotechnologijoje taikomų polimerazės grandininėje reakcijoje (PGR) ir DNR pirminei struktūrai nustatyti (sekoskaitoje) [11].

Šio darbo tikslas yra parinkti optimalias sąlygas suardytoms *T. aquaticus* YT-1 ląstelėms skaidrinti, atsižvelgiant į proceso našumą bei produkto Taq DNR polimerazės išeigą.

Naudotos medžiagos ir tyrimų metodika

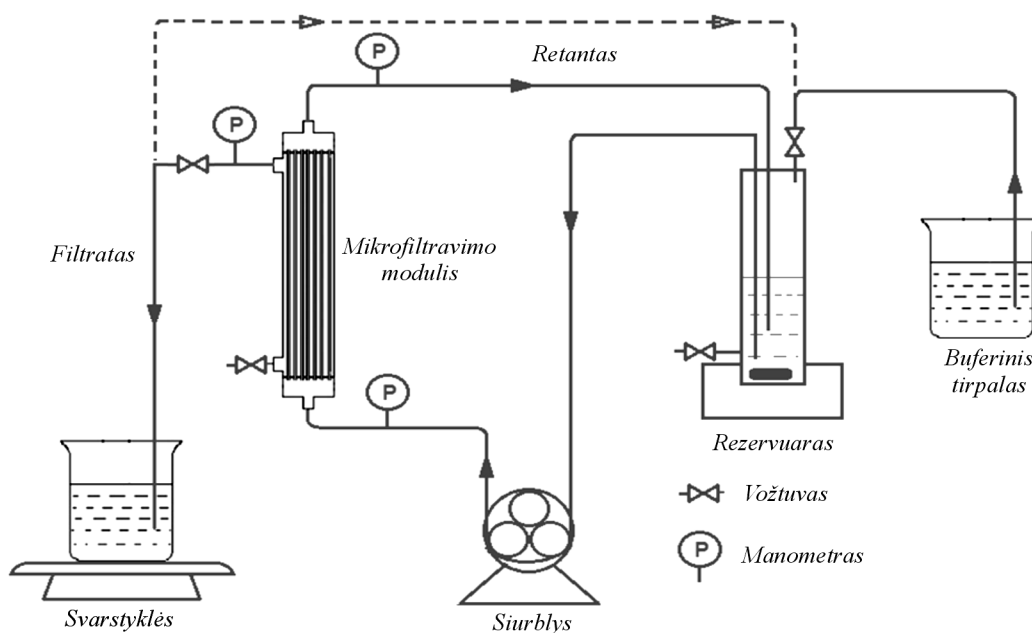
MEDŽIAGOS. Citrinų rūgštis (Applichem), natrio hidroksidas (Applichem), etilendiaminetetraacto rūgštis, EDTA (Amresco), fenilmetilsulfofluoridas, FMSF (Applichem), Nonidet P-40 (Sigma), Folin-Ciocalteu fenolinis reagentas (Merck), trichloracto rūgštis (Merck), JSA standartai (Pierce), fenolis (Merck), koncentruota sieros

rūgštis (Merck), gliukozė (Merck), perchlorato rūgštis, HClO₄ (Merck), vario(II) sulfatas (Applichem), 37 MBq/ml [³H]-dTTP (Amersham), 0,15 M NaCl vandeninis tirpalas (UAB „Fermentas“).

T. AQUATICUS YT-1 LAŠTELIŲ ARDYMAS. Nucentrifuguota *T. Aquaticus YT-1* biomasė buvo gauta iš UAB „Fermentas“ ir laikoma -20 °C temperatūroje. Kiekvieną kartą atliekant eksperimentą buvo pasveriami 60 g biomasės ir suspenduojama *Ultra-Turrax T25* homogenizatoriumi buferiniame tirpale A (20 mM natrio citratinis buferis, pH 6,0; 15 mM EDTA; 1 mM FMSF) svorių santykiu 1 : 3. Suspenduota biomasė ardyta

didelio slėgio homogenizatoriumi (APV, LAB 2000) trimis pasažais: pirmasis pasažas, esant 500–600 bar slėgiui, o antrasis ir trečiasis – 1250 bar. Proceso metu suspensija visą laiką aušinta iki 10–14 °C.

TANGENTINIS MIKROFILTRAVIMAS. Mikrofiltravimo eksperimentai atlikti naudojant tangentinio filtravimo sistemą, kurios principinė schema pavaizduota 1 paveiksle. Tyrimams naudotos komercinės 0,65 μm PVDF (polivinilidenfluoridinė) ir 0,2 μm PES (polietersulfoninė) membranos. Membranų charakteristikos pateiktos 1 lentelėje.



1 pav. Tangentinio mikrofiltravimo principinė schema

1 lentelė. Membranų charakteristikos

Parametras	Membrana I (M I)	Membrana II (M II)
Gamintojas	Pall corporation	GE Healthcare
Tipas	Plaušai	Plaušai
Medžiaga	PVDF	PES
Porų dydis	0,65 μm	0,2 μm
Plotas	0,1 m ²	0,042 m ²
Modulio aukštis	546 mm	300 mm
Plaušo vidinis skersmuo	1,1 mm	1 mm

Suardytų ląstelių suspensija buvo praskiesta iki 120 g/l koncentracijos buferiniu tirpalu A ir į ją pridėta paviršinio aktyvumo medžiagos Nonidet P40 iki 0,025 % galutinės koncentracijos. Į buferinį tirpalą A taip pat pridėta Nonidet P40. Patikrinus vandens savitąjį našumą per membraną ir išitikinus, kad membrana yra švari, sistema užpildyta buferiniu tirpalu A, kuris cirkuliuojamas sistemoje ne mažiau kaip 10 min, esant 0,1–0,15 bar trans-

membraniniam slėgiui (TMS). Į paruoštą sistemą įpilta 0,5 l praskiestos suardytų *T. aquaticus YT-1* ląstelių suspensijos. Suspensija cirkuliuojama sistemoje 7,4 m/s greičiu, atidarius permeato linijos vožtuvą, kuriuo sistemoje palaikomas atitinkamas transmembraninis slėgis.

Optimaliam transmembraniniam slėgiui, esant tam tikram siurblio našumui, nustatyti permeato linijos vožtuvas buvo atidaromas kas 10–15 min ir tokiu būdu padidinamas slėgių skirtumas abipus membranos (transmembraniniam slėgiui – TMS). Visi kiti eksperimentai atlikti, esant nustatytam optimaliam transmembraniniam slėgiui. Visi su mikrofiltravimu susiję eksperimentai buvo atliekami 2–8 °C temperatūroje.

MIKROFILTRAVIMO MEMBRANOS PLOVIMAS. Po kiekvieno eksperimento membrana plauta 2–3 l vandens, po to 1–2 h palikta viename litre 0,5 M NaOH tirpalo. Po inkubavimo su šarmu sistema dar kartą perplauta vandeniu ir patikrintas vandens savitasis našumas per membraną. Jeigu membranos savitasis našumas per mažas, valoma pakartotinai. Mikrofiltravimo membrana plauta 20–25 °C temperatūroje.

BALTYMŲ KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS.

Baltymų koncentracija analizuota taikant modifikuotą Lowry metodą [12]. Kalibravimo grafikas gautas naudojant jaučio serumo albumino (JSA) standartus (10–200 µg/ml). Visi mėginiai skiesti 0,15 M NaCl, 8 mM NaN₃ tirpalu. Baltymų koncentracija apskaičiuota iš kalibravimo grafiko.

POLISACHARIDŲ KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS. Polisacharidų koncentracija tiriamuose mėginiuose nustatyta taikant Dubois fenolio-sieros rūgšties metodą [13]. Prieš analizę mėginiai skiesti buferiniu tirpalu A. Mėginių šviesos sugertis matuota esant 490 nm bangos ilgiui. Polisacharidų koncentracija nustatyta naudojant gliukozės tirpalo (5–150 µg/ml) kalibravimo grafiką.

NUKLEORŪGŠČIŲ KONCENTRACIJOS NUSTATYMAS. Mėginiai skiesti buferiniu tirpalu A. Į 250 µl praskiesto mėginio įpilta 1 ml perchlorato rūgšties (HClO₄) ir inkubuota 30 min 98 °C temperatūroje, po to mėginiai palikti atvėsti iki kambario temperatūros. Tirpalai centrifuguoti 10 min esant 14 000 aps./min greičiui (Eppendorff R-5801).

Po centrifugavimo matuota šviesos sugertis supernatante esant 270 ir 290 nm bangos ilgiui [14]. Nukleorūgščių koncentracija apskaičiuota pagal formulę:

$$C_{DNR} = (A_{270} - A_{290}) \cdot \frac{10,13}{0,19} \cdot p; \quad (1)$$

čia C_{DNR} – DNR koncentracija, µg/ml; A_{270} ir A_{290} – tirpalo šviesos sugertis esant 270 ir 290 nm bangos ilgiams; p – mėginio skiedimas, kartais.

TAQ DNR POLIMERAZĖS FERMENTINIO AKTYVUMO NUSTATYMAS. Fermentinis aktyvumas matuotas į reakcijos mišinį (67 mM Tris/HCl, 6,7 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl, 0,2 mg/ml BSA, 0,2 mM dNTP, 250 µg/ml lašišų pienui DNR, 8 µl/ml [³H]-dTTP) pridedant iki ~0,006 akt.vnt./µl skiesto mėginio ir inkubuojant 30 min 70 °C temperatūroje. Matuojamas išdžiovintų DE-81 lapelių su ant jo sorbuotu mėginiu radioaktyvumas ir skaičiuojamas *Taq* DNA polimerazės fermentinis aktyvumas.

DALELIŲ DYDŽIO NUSTATYMAS. Naudojant *Zeta-sizer Nano Series* (Nano – S; Malvern instruments) įrenginį buvo išmatuoti mėginiuose esančių dalelių dydžiai. Esant reikalui, mėginiai buvo skiesti 0,15 M NaCl tirpalu. Matavimui buvo naudoti necentrifuguoti mėginiai.

BIOJUNGINIŲ KONCENTRACIJOS KITIMO FILTRATE MODELIAVIMAS. Biojunginių koncentracijos kitimas pradiniam tirpale (suardytų ląstelių suspensijoje) priklauso nuo medžiagos koncentracijos ir koncentracijos kitimo greičio konstantos k . Idealiomis sąlygomis, kai medžiaga nesulaikoma membranos, šį santykį galima užrašyti lygtimi:

$$\frac{dC}{dN} = -kC; \quad (2)$$

čia C – medžiagų koncentracija tirpale, mg/ml, N – per membraną praėjusio tirpalo tūris, ml, k – medžiagos koncentracijos kitimo greičio konstanta, ml⁻¹.

Suintegravus (2) lygtį, kai pradinėmis sąlygomis medžiagos koncentracija yra C_0 , gaunamas koncentracijos kitimo priklausomumas nuo filtrato tūrio:

$$C = C_0 e^{-kN}. \quad (3)$$

Bet kuriuo laiko momentu, pagal masės tvermės dėsnį, bendra medžiagos koncentracija (C_{tot}) yra lygi koncentracijų pradiniam tirpale (koncentrate) (C_K) ir filtrate (C_F) sumai:

$$C_{tot} = C_K + C_F.$$

Tuo tarpu norint išreikšti koncentraciją filtrate, įtraukiamas medžiagos sulaikymo koeficientas (R) – vienas iš dviejų pagrindinių filtravimo parametrų (kartu su membranos savituoju našumu). Sulaikymo koeficientas nurodo proceso selektyvumą. Jei $R = 1$ – visos dalelės (arba tikslinės) yra sulaikomos ir į filtratą nepatenka, o kai $R = 0$ – visos dalelės prateka pro membraną. Tačiau šis santykis yra teisingas tik nesideformuojančioms tvirtoms sferinėms dalelėms. Dalelės, kurios yra linkusios deformuotis paprastai turi mažesnę sulaikymo koeficientą. Tokiu atveju makromolekulės kitimą koncentrate galima aprašyti lygtimi:

$$C_F = C_0 e^{-kN} (1 - R). \quad (4)$$

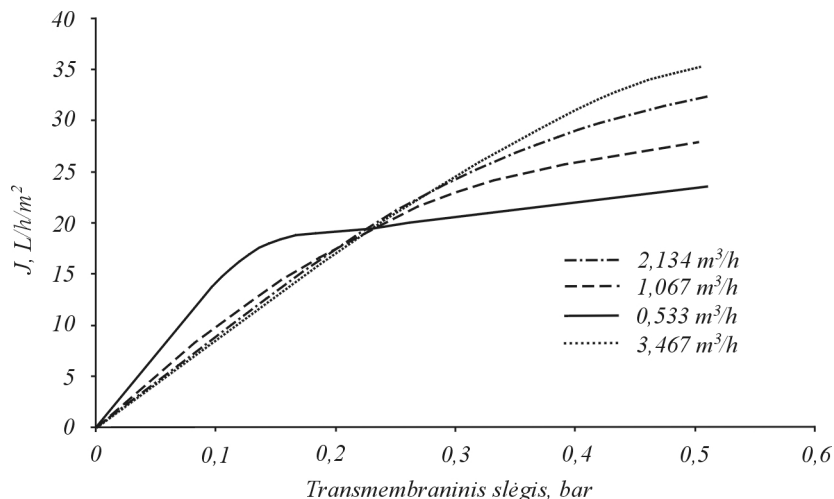
Rezultatai ir jų aptarimas

OPTIMALIAUS TRANSMEMBRANINIO SLĖGIO IR SIURBLIO NAŠUMO NUSTATYMAS. Remiantis Darcy dėsniumi, tangentinio filtravimo eksperimentus reikia atlikti sudarant minimalų transmembraninį slėgį ir pumpuojant tirpalą per sistemą kuo didesniu greičiu [15]. Tokiomis sąlygomis yra mažiausia tikimybė ląstelių lizate esančioms makromolekulėms ir jų agregatams kauptis membranos paviršiuje ir ją blokuoti. Tačiau pasirinktas per didelis siurblio našumas padidina proceso energetines sąnaudas, todėl tangentiniam mikrofiltravimui būtina parinkti optimalias sąlygas: siurblio našumą ir transmembraninį slėgį, kuriems esant gaunamas didžiausias membranos savitasis našumas.

Membranos savitąjo našumo priklausomumas nuo transmembraninio slėgio buvo nustatytas esant keturiems skirtingiems siurblio našumams 0,533, 1,067, 2,134 ir 3,467 m³/h (2 ir 3 pav.). Iš rezultatų matyti, kad nepaisant naudojamos membranos, esant mažiausiam siurblio našumui, jau esant ~0,12 bar slėgiui transmembraninis slėgis neturi įtakos membranos savitajam našumui. Kaip ir galima tikėtis, didžiausias membranos savitasis našumas buvo gautas esant 3,467 m³/h siurblio našumui. Membranos

savitasis našumas, naudojant 0,65 μm porų skersmens membraną, praktiškai nepriklauso nuo siurblio našumo. Tuo tarpu naudojant 0,2 μm porų skersmens membraną, proceso našumas, atsižvelgus į siurblio našumą, skiriasi 1,84 karto. Tirpalą sistemoje cirkuliuojant 2,134 m^3/h srauto debitu ir esant 0,35 bar transmembraniniam slėgiui, memb-

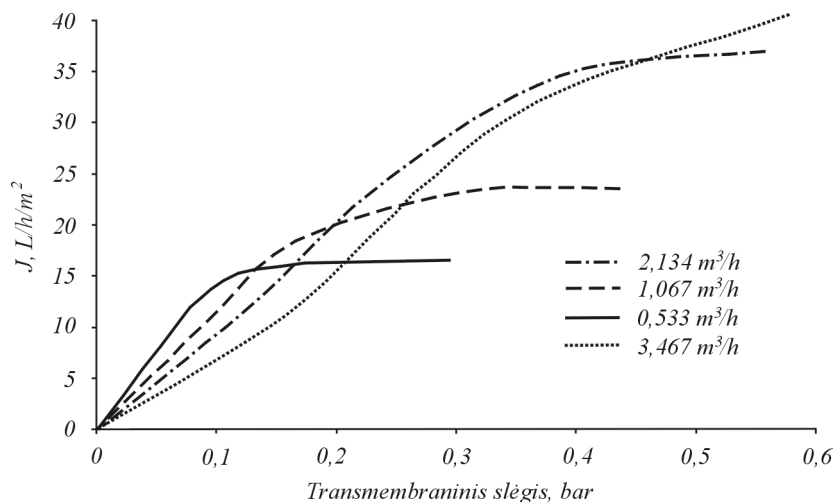
ranos savitasis našumas buvo gautas 33,5 $\text{l}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$, tuo tarpu esant 1,067 m^3/h (0,15 bar TMS) – 18 $\text{l}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$. Padidinus siurblio našumą iki 3,467 m^3/h ir esant 0,41 bar transmembraniniam slėgiui, membranos savitasis našumas padidėja labai nežymiai (36 $\text{l}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$).



2 pav. Membranos savitojo našumo priklausomumas nuo transmembraninio slėgio, esant skirtingam siurblio našumui. Naudojama 0,65 μm porų skersmens membrana

Remiantis rezultatais, nuspręsta tangentinio mikrofiltravimo eksperimentus su abiem membranomis atlikti esant 2,134 m^3/h siurblio srauto debitui ir 0,35 bar transmembraniniam slėgiui. Tyrimus atlikti esant didesniai

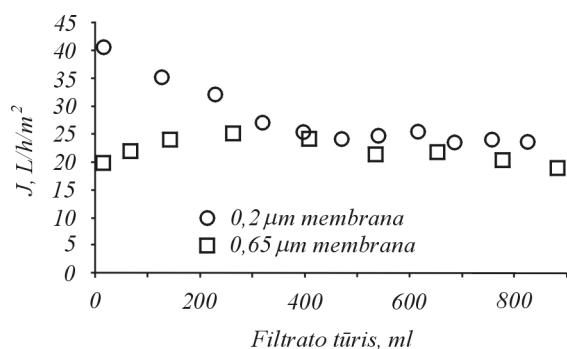
transmembraniniam slėgiui netikslinga, nes padidinus slėgį, membranos savitasis našumas pakinta nežymiai, tuo tarpu padidėja tikimybė blokuoti membraną ląstelių nuolaužomis.



3 pav. Membranos savitojo našumo priklausomumas nuo transmembraninio slėgio, esant skirtingam siurblio našumui. Naudojama 0,2 μm porų skersmens membrana

MEMBRANOS SAVITOJO NAŠUMO PER MEMBRANĄ Palyginimas. Tangentinio mikrofiltravimo metu stebėtas membranos savitasis našumas (4 pav.). Savitojo našumo per 0,65 μm membraną kitimas proceso metu iš pradžių iš lėto didėjo, o per membraną pratekęjus 300 ml permeato, pradėjo iš lėto mažėti. Tai gali būti susiję su suardytų ląstelių nuolaužų pralaidumu per membranos poras. Tirpių medžiagų ir ląstelių nuolaužų dydis gali įvairuoti nuo tūkstantųjų mikrometro dalių iki

kelių mikrometrų – tai priklauso nuo ląstelių susiarydymo. Todėl iš pradžių stebima mažesnių už porų skersmenį dalelių skvarba per membraną ir su tuo susijęs membranos savitojo našumo didėjimas. Tačiau nufiltravus du diafiltravimo tūrius per membraną, membranos savitasis našumas pradeda mažėti dėl atsirandančio membranos blokavimo. Vidutinis savitasis našumas per 0,65 μm porų skersmens membraną nustatytas 20,6 $\text{l}/(\text{h}\cdot\text{m}^2)$.



4 pav. Membranos savitojo našumo kitimas tangentinio mikrofiltravimo metu, procesą atliekant skirtingomis membranomis

Savitasis našumas per 0,2 µm porų skersmens membraną viso proceso metu mažėjo. Iš pradžių membranos savitojo našumo mažėjimas buvo greitesnis, o per membraną pratekėjus 400 ml permeato, savitasis našumas stabilizavosi. Tai gali būti susiję su suardytų ląstelių nuolaužų patekimu į membranos poras ir membranos poliarizacija. Apskaičiuotas vidutinis savitasis našumas per 0,2 µm membraną buvo 27,8 l/(h·m²). Iš rezultatų matyti, kad savitasis našumas per 0,65 µm membraną yra 1,35 karto mažesnis, palyginus su 0,2 µm membranos našumu. Tokie rezultatai gali būti gauti dėl dviejų priežasčių: a) dėl skirtingo membranų porų skersmens ir b) dėl medžiagos, iš kurios pagaminta membrana [16]. Į platesnes (0,65 µm) poras patenka daugiau suardytų ląstelių nuolaužų, kurios negalėdamos praeiti per porą, ją blokuoja ir užkemša, taip sumažindamos pralaidumą. Taip pat makromolekulės ar suardytų ląstelių nuolaužos gali skirtingai sąveikauti su PVDF ir PES, nors abu polimerai pasižymi hidrofilišėmis savybėmis. Eksperimentiškai parodyta, kad Taq DNR polimerazės išeiga po mikrofiltravimo per 0,65 µm PVDF membraną, naudojant buferinį tirpalą be paviršinio aktyvumo medžiagos, yra tik 46 % (rezultatai nepateikti). Tuo tarpu 50 % fermento nelieka nei koncentrate, nei filtrate. Remiantis šiais rezultatais bei tuo, jog pridėjus paviršinio aktyvumo medžiagos Nonidet P-40 išeiga padidėja iki 86,8 ±4,9 % (2 lent.), galima teigti, kad produkto išeiga sumažėja dėl galimos agregacijos ir sąveikos su membrana. Naudojant 0,2 µm PES membraną tomis pačiomis sąlygomis, fermento išeiga siekia 96 %.

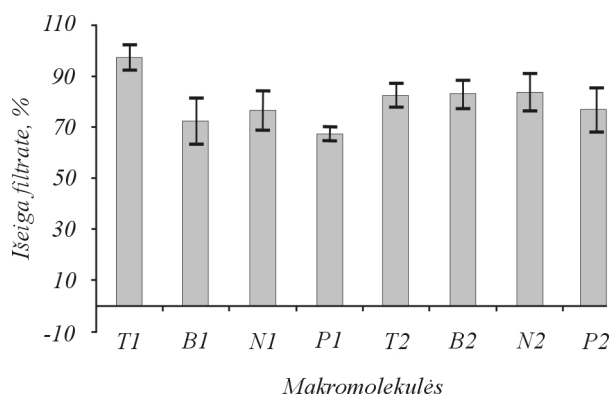
2 lentelė. Polisacharidų, baltymų, nukleorūgščių ir Taq DNR polimerazės išeiga (%) po tangentinio mikrofiltravimo filtrate ir koncentrate. M1 – 0,2 µm porų skersmens membrana, M2 – 0,65 µm porų skersmens membrana

Tangentinio mikrofiltravimo frakcijos	Taq DNR polimerazė		Baltymai		Nukleorūgštys		Polisacharidai	
	M I	M II	M I	M II	M I	M II	M I	M II
Filtratas	96,3 ±3,7	82,5 ±4,5	72,3 ±9,2	82,8 ±5,6	76,5 ±7,7	83,7 ±7,1	67,4 ±2,7	76,6 ±8,4
Koncentratas	1,6 ±0,2	4,3 ±0,4	8,5 ±0,5	2,5 ±0,4	7,1 ±0,6	4,3 ±0,4	29,2 ±2,8	4,2 ±0,6
Bendra mikrofiltravimo išeiga	97,9 ±3,9	86,8 ±4,9	83,8 ±9,7	85,3 ±6,0	83,6 ±8,3	88,0 ±7,6	96,7 ±5,5	80,8 ±9,0

Įdomu tai, kad 67,4 ±2,7 % polisacharidų praeina per 0,2 µm membraną, o likusi dalis (29,2 ±2,8 %) lieka koncentrate. Tuo tarpu naudojant 0,65 µm PVDF mem-

Gauti eksperimentiniai duomenys skaidrinant *T. aquaticus* YT-1 lizatą tangentinio mikrofiltravimo metodu koreliuoja su literatūros duomenimis apie *E. coli* ir *N. corallina* lizatų skaidrinimą. Galima teigti, kad nepaisant mikroorganizmo rūšies, proceso našumas priklauso nuo naudojamų membranų porų skersmens. Proceso efektyvumas didesnis naudojant mažesnio porų skersmens membranas.

MEDŽIAGŲ IŠEIGOS ANALIZĖ. Po kiekvieno tangentinio mikrofiltravimo eksperimento buvo įvertintos nukleorūgščių, polisacharidų, baltymų ir Taq DNR polimerazės išeigos (2 lent.). Abiem atvejais dauguma makromolekulių praeina pro membraną į filtratą, tačiau naudojant 0,2 µm membraną, visų analizuotų makromolekulių, išskyrus Taq DNR polimerazę, filtrate randama mažiau (5 pav.). Iš rezultatų matyti, kad Taq DNR polimerazės (0,2 µm membrana) ir polisacharidų (0,65 µm membrana) bendra išeiga yra artima 100 %. Visais kitais atvejais bendra vidutinė išeiga kinta nuo 81 iki 88 %. Tai rodo, kad makromolekulės sąveikauja su membrana arba patenka į poras ir jas užkemša. Makromolekulių ir membranos sąveika turi įtakos mažėjančiam filtrato srautui per membraną, ypač filtravimo per 0,2 µm membraną metu.



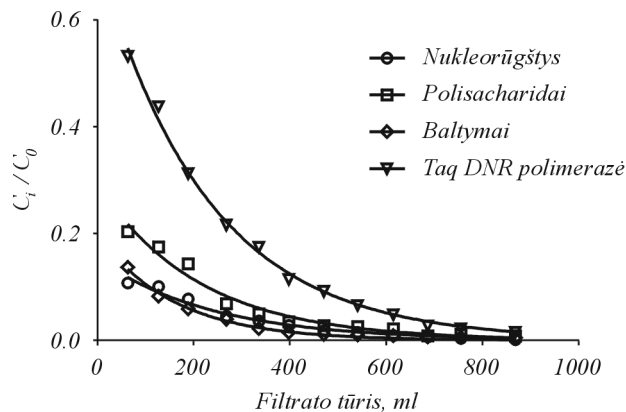
5 pav. Makromolekulių pasiskirstymas filtrate po tangentinio mikrofiltravimo. T, B, N ir P simboliai atitinkamai reiškia Taq DNR polimerazę, baltymai, nukleorūgštys ir polisacharidai. Skaičiai 1 ir 2, esantys prie simbolių, rodo, kad procesas atitinkamai atliktas naudojant 0,2 µm ir 0,65 µm porų skersmens membranas

braną, 76,6 ±8,4 % polisacharidų praeina pro membraną, o koncentrate lieka tik 4,2 ±0,6 %. Tai rodo, kad ne mažiau negu 10 % polisacharidų lieka membranos porose arba su

ja sąveikauja. Panaši tendencija stebima su baltymais ir Taq DNR polimeraze – didesnis kiekis makromolekulių užsilaiko membranos porose arba sąveikauja su 0,65 μm PVDF membrana. Daugiau nukleorūgščių prarandama gaunamas naudojant 0,2 μm PES membraną.

Palyginus makromolekulių išėigas su literatūroje pateiktomis išėigomis po skaidrinimo tangentinio mikrofiltravimo metodu (kai naudojami skirtingi mikroorganizmų lizatai), galima teigti, kad geriausiai makromolekules sulaiko mažesnio porų skersmens membrana. Tačiau norint gauti didesnes tikslinio produkto išėigas su mažesnio porų skersmens membranomis, reikia parinkti optimalias sąlygas.

MAKROMOLEKULIŲ KONCENTRACIJOS KITIMO FILTRATE MODELIAVIMAS. Taq DNR polimerazės, baltymų, nukleorūgščių ir polisacharidų kitimui filtrate aprašyti buvo pritaikytas modelis ((4) lygtis), kurį naudojant apskaičiuota greičio konstanta (k) ir medžiagos sulaikymo koeficientas (R). Rezultatai pateikti 3 lentelėje ir parodyti 6 ir 7 paveiksluose.



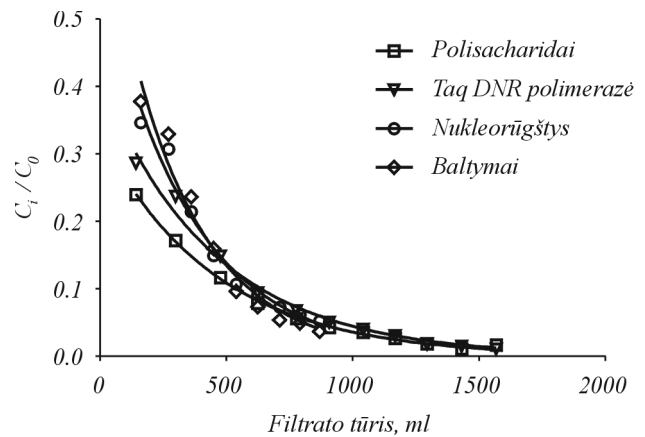
6 pav. Makromolekulių kitimas filtrate tangentiniam mikrofiltravimui naudojant 0,2 μm porų skersmens membraną

Iš rezultatų matyti, kad visų medžiagų, išskyrus Taq DNR polimerazės, sulaikymo koeficientas yra didesnis, kai tangentiniam mikrofiltravimui naudojama 0,2 μm porų skersmens membrana. Tai atitinka medžiagų koncentracijos analizės rezultatus.

3 lentelė. Medžiagų sulaikymo koeficientas ir jų koncentracijos kitimo filtrate greičio konstantos

Membrana	R				k, ml^{-1}			
	Baltymai	Nukleorūgštys	Polisacharidai	Taq DNR polimerazė	Baltymai	Nukleorūgštys	Polisacharidai	Taq DNR polimerazė
M I	0,8011	0,8465	0,7073	0,2789	$6,36 \cdot 10^{-3}$	$4,22 \cdot 10^{-3}$	$4,72 \cdot 10^{-3}$	$4,40 \cdot 10^{-3}$
M II	0,3103	0,4165	0,6706	0,5874	$3,26 \cdot 10^{-3}$	$2,87 \cdot 10^{-3}$	$2,21 \cdot 10^{-3}$	$2,23 \cdot 10^{-3}$

DALELIŲ DYDŽIO PASISKIRSTYMO ANALIZĖ. Tangentinio mikrofiltravimo efektyvumo palyginimui pamatuotas dalelių pasiskirstymas pradinėje suspensijoje po suardymo (lizate), filtrate ir koncentrate (8 pav.).



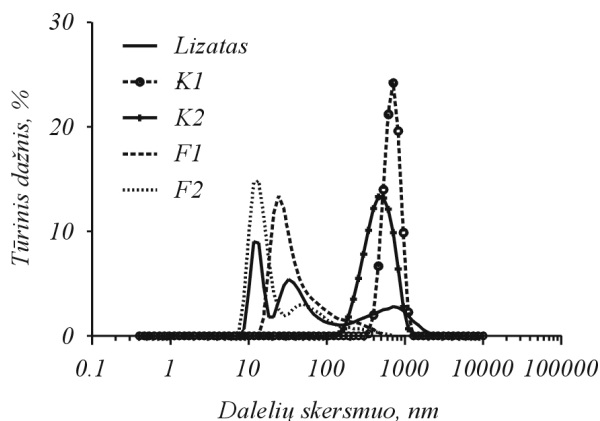
7 pav. Medžiagų koncentracijos kitimas filtrate tangentiniam mikrofiltravimui naudojant 0,65 μm porų skersmens membraną

Baltymų ir nukleorūgščių sulaikymo koeficientas 0,2 μm membranai yra ~ 2 kartus didesnis, palyginti su 0,65 μm membrana. Polisacharidams apskaičiuotasis R yra nežymiai didesnis, tuo tarpu Taq DNR polimerazės sulaikymo koeficientas yra daugiau negu 2 kartus mažesnis palyginus su didesnio porų skersmens membrana. Gauti duomenys koreliuoja su apskaičiuotomis išėigomis – tangentiniam mikrofiltravimui naudojant 0,2 μm porų skersmens membraną koncentrate lieka daugiau baltymų, nukleorūgščių ir polisacharidų. Tuo tarpu tikslinio produkto Taq DNR polimerazės išėiga filtrate yra $96,3 \pm 3,7\%$, o sulaikymo koeficientas R mažiausiai (0,2789).

Visoms medžiagoms apskaičiuotos greičio konstantos, naudojant 0,2 μm membraną, yra nuo 1,47 iki 2,13 karto didesnės, palyginus su 0,65 μm membrana. Tai galima pamatyti ir iš biojunginių koncentracijos kitimo filtrate duomenų (6 ir 7 pav.) – tam, kad biojunginių koncentracija filtrate priartėtų prie minimalios (naudojant 0,65 μm membraną), reikia diafiltruoti mažiausiai 10 mikrofiltravimo tūrių. Tokiu atveju skirtingų biojunginių koncentracija filtrate sumažės daugiausiai 26,2 karto (Taq DNR polimerazei). Tuo tarpu naudojant 0,2 μm membraną, biojunginių koncentracija filtrate sumažėja nuo 26 iki 75 kartų per 5,7 mikrofiltravimo tūrių.

Iš rezultatų matyti, kad naudojant 0,65 μm porų skersmens membraną koncentrate lieka didesnės dalelės, o filtrate pasiskirsto nuo 20 iki 350 nm. Tuo tarpu per 0,2 μm porų skersmens membraną praėjusių dalelių didžiausią dalį sudaro 11–12 nm skersmens dalelės, o kon-

centrate lieka platesnės dalelės. Tai rodo, kad naudojant 0,65 µm porų skersmens membraną, į filtratą kartu su produktu patenka daugiau įvairaus dydžio dalelių. Vizualiai lyginant abu koncentratas, buvo matyti, kad koncentratas po tangentinio mikrofiltravimo, naudojant 0,2 µm porų skersmens membraną, buvo skaidresnis. Tai patvirtina ir dalelių dydžio matavimai.



8 pav. Dalelių dydžio pasiskirstymas. K1 ir F1 – atitinkamai koncentratas ir filtratas (0,65 µm skersmens poros); K2 ir F2 – atitinkamai koncentratas ir filtratas (0,2 µm skersmens poros)

Išvados

Thermus aquaticus YT-1 lizato skaidrinimui geriausiai naudoti 0,2 µm porų skersmens membraną. Nustatyta, kad:

- atliekant tangentinį mikrofiltravimą didesnis membranos savitasis našumas gaunamas naudojant 0,2 µm porų skersmens membraną – 27,8 l/(h·m²);
- polivinildenfluoridinė 0,65 µm porų skersmens membrana pasižymi stipresne sąveika su makromolekulėmis, todėl suardytoms ląstelėms skaidrinti geriau rinktis membraną, pagamintą iš polietersulfono;
- naudojant 0,2 µm porų skersmens membraną, Taq DNR polimerazės išeiga yra 96,3 ± 3,7 %, tuo tarpu su didesnio porų skersmens membrana gaunama 82,5 ± 4,5 % išeiga;
- tangentinis mikrofiltravimas naudojant 0,2 µm membraną atliekamas greičiau ir efektyviau: greičio kitimo filtrate konstantos visiems biogunginiams yra didesnės, o nuskaidrinti suardytas *T. aquaticus* YT-1 ląsteles galima mažiau siai 1,75 karto greičiau.

Literatūra

1. Reis R. V., Zydney A. // Curr. Opin. Biotechnol. 2001. Vol. 12, N 2. P. 208–2011.

2. Aspelund M. T., Rozeboom G., Heng M., Glatz C. E. // J. Membr. Sci. 2008. Vol. 324. P. 198–208.

3. Roe S. Protein purification techniques, 2nd edn. Oxford University Press. 2001. P. 99–102.

4. Kim J. S., Akeprathumchai S., Wickramesinghe S. R. // J. Membr. Sci. 2001. Vol. 182. P. 161–172.

5. Bailey S. M., Meagher M. M. // Biotechnol. Bioeng. 1997. Vol. 57. P. 304–310.

6. Parnham C. S., Davis R. H. // Biotechnol. Bioeng. 1995. Vol. 47. P. 155–164.

7. Karim M. N., Graham H., Han B., Cibulskas A. // Biochem. Eng. J. 2008. Vol. 40. P. 512–519.

8. Levesley J. A., Hoare M. // J. Membr. Sci. 1999. Vol. 158, N 1–2. P. 29–39.

9. Rodriguez J. A., Aguilar C. F., Padilla A. P. // Desalination. 2000. Vol. 130. P. 131–136.

10. Mazeika D., Stupak R., Liesiene J., Valancius Z. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. Vol. 22. Supplement 1. P. S61.

11. Villbrandt B., Sobek H., Frey B., Schomburg D. // Protein Eng. 2000. Vol. 13, N 9. P. 645–654.

12. Lowry O. et al. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

13. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. // Anal. Chem. 1956. Vol. 28. P. 350–356.

14. Спириин А. С. // Биохимия. 1958. Т. 23. Вып. 5. С. 656–662.

15. Baker R. W. Membrane technology and applications, 2nd edn. Menlo Park, California. 2004. P. 17.

16. Bailey S. M., Meagher M. M. // J. Membr. Sci. 2000. Vol. 166. P. 137–146.

D. Mažeika, R. Stupak, J. Liesienė, Z. Valančius

TANGENTIAL FLOW MICROFILTRATION OF *THERMUS AQUATICUS* YT-1 LYSATE

Summary

The tangential flow microfiltration of *Thermus aquaticus* YT-1 lysate was investigated. Two membranes of different pore diameter – 0.2 µm PES and 0.65 µm PVDF – were compared. The optimal transmembrane pressure at different flow rates for both membranes was determined. Parameters such as flux through membrane, retention coefficients, rate constants and yields of nucleic acids, polysaccharides, proteins and product Taq DNA polymerase were evaluated. The flux of 0.2 µm pore diameter membrane was shown to be 1.35 times higher as compared with the 0.65 µm pore diameter membrane. A comparison of Taq DNA polymerase yield has revealed the majority of the product to flow through the membrane, but the highest yield of the product (96.3 ± 3.7%) has been obtained with the 0.2 µm pore diameter membrane. The type of membrane material was shown to influence the performance of the process. It has been concluded that the 0.2 µm pore diameter membrane is suitable for the clarification of *Thermus aquaticus* YT-1 lysate.