

## Lazdelinės ir rutulinės formų bakterijų ardymo mechaniniais metodais dėsningumai

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

Kauno technologijos universitetas,

Radvilėnų pl. 19, LT-50254 Kaunas, Lietuva

El. paštas robert.stupak@thermofisher.com

**crossref** <http://dx.doi.org/10.5755/j01.ct.59.1.1531>

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

Darbe nagrinėti rutulinių ir lazdelinių formų bakterijų ardymo mechaniniais metodais dėsningumai. Nustatyta, jog rutulinės formos bakterijos lengviau suardomos ultragarsu bei tradicinės konstrukcijos didelio slėgio homogenizatoriumi. Tuo tarpu dėl geometrinės formos lazdelinės bakterijos lengviau suardomos rutuliniu malūnu. Energijos sąnaudų bei ardymo greičio atžvilgiu universalusias abiejų tipų ląstelių metodas yra ardymas didelio slėgio priešingų srautų konstrukcijos homogenizatoriumi. Ištyrus dalelių dydžio pasiskirstymą, nustatyta, jog rutulinių ir lazdelinių formų bakterijų ardymo mechanizmai skiriasi iš esmės. Rutulinės formos bakterijos yra sumalamos iki smulkių, mikroskopu sunkiai matomų dalelių, tuo tarpu lazdelinės formos bakterijose yra padaromi trūkiai, pakankami, kad viduląsteliniai produktai patektų į aplinką.

### Įvadas

Biotechnologijos pramonėje gaminama didelė įvairovė biologiškai aktyvių medžiagų, kurių pagrindinės yra baltymai ir DNR [1]. Gamyboje sėkmingai panaudojami augalų ir gyvūnų audiniai, grybai, mielės arba bakterijos [2]. Dėl pigios eksploatacijos, klonavimo galimybių ir spartaus dauginimosi dažniausiai produkto gavimui naudojamos mielės ir bakterijos. Specifinių procesų metu produktas sintetinamas ląstelės viduje, po to jis arba lieka ląstelės viduje, arba iš jos išgaunamas. Dauguma bakterijų nesekretuoja produkto į auginimo terpę, todėl gamyboje naudojama papildoma stadija – ląstelių ardymas – produkto išskyrimas į aplinką. Šiuo metu ląstelėms ardyti taikoma daug skirtingų mechaninių ir nemechaninių ardymo metodų [3]. Gamyboje dažniau taikomi mechaniniai, kurie vertinami dėl galimybės procesą vykdyti nepertraukiamu režimu, universalumo, prieinamumo, didelio efektyvumo, atsikartojamumo, proceso standartizavimo.

Palyginti su kitais metodais, taikomais biologinių produktų gamyboje, mechaninių ardymo metodų parinkimas yra dažnai empirinis. Metodo pasirinkimas priklauso nuo ląstelių prigimties, jų kultivavimo sąlygų, paruošimo ląstelių apdorojimo prieš ardymą ir gryninamojo produkto savybių [2–4]. Ląstelių ardymo būdas ir sąlygos parenkami atsižvelgiant į metodo paprastumą, kainą, efektyvumą, įrangos tinkamumą. Kiekvieno metodo ardymo efektyvumas priklauso nuo (i) biologinių veiksnių: ląstelės sienelės sudėties, jos formos ir mechaninių parametrų ir (ii) konstrukcinių parametrų: ardymo kelės konstrukcijos, varomosios jėgos ir kt. Ardymo metodai dažniausiai palyginami tarpusavyje pagal gebėjimą ardyti mikroorganizmus [5, 6].

Suardymo efektyvumas gali būti nustatytas tiesioginiais ir netiesioginiais metodais. Skaitiniai netiesioginiai metodai yra paremti viduląstelinių produktų koncentracijos kitimo stebėjimu terpeje. Ląstelių formos ir dydžio kitimas nustatomas matuojant dalelių dydį ar stebint mikroskopu [4].

Literatūros šaltiniuose randami tik pavieniai ląstelių ardymo dėsningumų tyrimai, atliekami atskirai su rutulinėmis arba lazdelinėmis ląstelėmis. Be to, siekiant greitai suardyti, tyrimams dažnai panaudojami didelio našumo prietaisai, o parametrai apskaičiuojami taikant sparčius, bet negausius netiesioginius metodus [7–13]. Literatūroje nerandama skirtingų rūšių ląstelių ardymo palyginimo, kai analizuojami bent keli viduląsteliniai produktai, ir ardymas atliekamas vienodais prietaisais ir identiškomis sąlygomis.

*Neisseria denitrificans* (*N.den*) yra tipinės gramneigiamos rutulinės formos bakterijos. Pagal literatūroje pateikiamus duomenis, šiai grupei priklausančios bakterijos yra vienos lengviausiai ardomų [3]. Pramonėje bakterijos naudojamos *NdeI* ir *NdeII* fermentams gaminti.

*Nocardia corallina* (*N.cor*) yra gramteigiamos lazdelinės formos bakterijos, biotechnologijos pramonėje naudojamos *NcoI* fermento gamybai.

Šio darbo tikslas – palyginti rutulinės ir lazdelinės formos ląstelių, atitinkamai *Neisseria denitrificans* ir *Nocardia corallina*, ardymo dėsningumus dažniausiai taikomais mechaniniais ardymo metodais: didelio slėgio homogenizatoriumi, ultragarsiniu ardymo prietaisu bei rutuliniu malūnu. Pagrindiniai pasirinkti kriterijai yra ląstelių ardymo kinetiniai parametrai bei energijos sąnaudos, ląstelės dydis po suardymo bei irimo mechanizmas.

### Naudotos medžiagos bei tyrimo metodika

**MEDŽIAGOS IR TIRPALAI.** Ardymo buferinis tirpalas (100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT); 0,2 M NaOH vandeninis tirpalas;  $\text{NAD}^+$  priklausomų dehidrogenazių aktyvumo matavimo reakcijos mišinys (0,5 mM NAD, 0,1 mM  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$  (piruvatas), 0,1 mM  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , 0,1 mM  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 0,1 mM D-gliukozės 6-fosfatas); 0,15 M NaCl vandeninis tirpalas; 0,5 M  $\text{HClO}_4$ ; 5 % vandeninis fenolio tirpalas; 100 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; Bradfordo reagentas (UAB Fermentas).

**BIOMASĖS AUGINIMAS.** Rutulinės formos bakterijos *Neisseria denitrificans* auginamos *Lysogeny broth* (LB) terpėje iki 1 optinio vieneto, sugertis matuota esant 600 nm šviesos bangos ilgiui. Lazdelinės bakterijos *Nocardia corallina* auginamos LB terpėje iki 3 optinių vienetų, sugertis matuota esant 600 nm šviesos bangos ilgiui. Biomasės gautos iš UAB Fermentas, saugotos -20 °C temperatūroje.

**LAŠTELIŲ ARDYMAS.** Biomasė buvo suspenduojama ardyimo buferiniame tirpale masių santykiu 1 : 4.

**Ardymas rutuliniame malūne.** Rutulinio malūno (RM) darbinis kameros tūris 500 ml. Suspenduota biomasė sumaišyta su plastikiniiais rutuliukais (0,25–0,50 mm skersmens) tūrių santykiu 1 : 1. Ardymui naudota vadinamoji 50 % užkrova. Laštelės ardytos esant 4 500 aps./min rotoriaus greičiui. Mėginiai imti kas 5 min. Ardymo trukmė 70 min.

**Ardymas ultragarasu.** Biomasė buvo ardyta naudojant 16 mm titano strypą, pamerktą tiesiai į ardumą suspensiją, esant 14 kHz ultragarso dažniui (Vibracell VCX500). Ardyta 20 ciklų po 1 min, tarpuose tarp ardyimų leidžiant mėginiui atvėsti iki 8–10 °C temperatūros. Mėginiai imti pasirinktinai po suardymo ciklo.

**Ardymas didelio slėgio homogenizatoriumi.** Prieš ardyimą didelio slėgio homogenizatorius (DSH) *APV2000* praplaunamas MilliQ vandeniu, po to sistema užpildoma ardyimo buferiniu tirpalu. Esant 1 250 atm darbiniam slėgiui biomasė ardoma 10 ciklų (1 ciklas užtrunka apie 4 min), mėginiai paaimami po kiekvieno ciklo.

**Ardymas MS konstrukcijos didelio slėgio homogenizatoriumi.** Kaip ir DSH prieš ardyimą mikrosuskystintojas (MS) *M-110EH* praplaunamas MilliQ vandeniu ir užpildomas ardyimo buferiniu tirpalu. Esant 1350 atm darbiniam slėgiui biomasė ardoma 10 ciklų (1 ciklas užtrunka apie 3min), mėginiai paaimami po kiekvieno ciklo.

Siekiant išmatuoti energijos sąnaudas ardyimo metu į kiekvieno ardyimo prietaiso elektros grandinę buvo įmontuotas vatmetras. Energijos sąnaudos buvo fiksuojamos laike ir netiesioginiais metodais išmatavus suardymo efektyvumą apskaičiuota sunaudojamos energijos vertė.

**NETIESIOGINIS ARDYMO EFEKTYVUMO NUSTATYMAS. Dalelių dydžio matavimas ir mikroskopinė analizė.** Dalelių dydžio nustatymui ir mikroskopavimui naudojami necentrifuguoti mėginiai. Dalelių dydis matuotas *Zetasizer* (Nano S) prietaisu, mėginys skiedžiamas 30 kartų ardyimo buferiniu tirpalu, matuojama naudojant 100 μl kiuvetę. Optinei mikroskopijai mėginys plonu sluoksniu paskleidžiamas ant stikliuko. Užpilama dažo fuksino ir paliekama kelioms minutėms. Mikroskopu stebimos sveikos ir suardytos laštelės [9].

**Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu.** Mėginiai centrifuguojami 30 min 14 000 aps./min greičiu (+4 °C). Nuosėdos pašalinamos. Bendra baltymų koncentracija nustatoma Bradfordo metodu [10]. Mėginiai skiedžiami 0,15 M NaCl tirpalu. Reakcija vykdoma sumaišius 15 μl skiesto mėginio su 750 μl Bradfordo reagento. Mėginiai išmaišomi maišyklėje. Spektrofotometru matuojama šviesos sugertis, esant 595 nm šviesos

bangos ilgiui. Kalibravimo grafikui gauti naudojami jaučio serumo albumino (BSA) standartai.

**Nukleorūgščių koncentracijos nustatymas Spirino metodu.** Nukleorūgščių koncentracija nustatoma Spirino metodu, mėginius skiedžiant ardyimo buferiu [14]. Į užsukamus mėgintuvėlius pilama po 250 μl skiestų mėginių ir 1 ml 0,5 M HClO<sub>4</sub> tirpalo, išmaišoma ir kaitinama verdančio vandens vonioje 30 min. Mėginiai atšaldomi ledo vonioje (per 5 min), o susidariusios nuosėdos centrifuguojamos 10 min 14 000 aps./min greičiu (+4 °C). Supernatante matuojama UV šviesos sugertis esant 270 nm ir 290 nm bangos ilgiams. Kontrolei naudojamas ardyimo buferinis tirpalas. Bendra nukleorūgščių koncentracija (μg/ml) apskaičiuojama pagal A. Spirino pasiūlytą formulę (1):

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

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

**Polisacharidų koncentracijos nustatymas Dubois metodu.** Mėginiai skiedžiami ardyimo buferiu. Į mėgintuvėlį įpilama 200 μl skiesto mėginio ir 200 μl 5 % vandeninio fenolio tirpalo, gerai išmaišius įpilamas 1 ml koncentruotos sieros rūgšties. Išmaišoma ir paliekama atvėsti iki kambario temperatūros. Šviesos sugertis matuojama esant 490 nm bangos ilgiui. Kontrolinis mėginys – vietoj standartinio gliukozės tirpalo pilama 200 μl ardyimo buferinio tirpalo. Polisacharidų koncentracija apskaičiuojama iš standartinio gliukozės tirpalo (5–150 μg/ml) kalibracinio grafiko.

**Nuo NAD priklausomų dehidrogenazių koncentracijos nustatymo metodas.** Dehidrogenazių aktyvumo metodas taikomas nustatyti ardyimo įtaką viduląstelių fermentų aktyvumui. Paruošiamas reakcijos mišinys (0,5 mM NAD, 0,1 mM C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub> (piruvatas), 0,1 mM C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 0,1 mM CH<sub>3</sub>COOH, 0,1 mM D-gliukozės 6-fosfatas). Sumaišius 1 ml reakcijos mišinio (kambario temperatūros) su 10 μl mėginio, išmatuojama šviesos sugertis ties 340 nm šviesos bangos ilgiu [11]. Kontrolinis mėginys – vietoj mėginio į reakcijos mišinį pilama 10 μl ardyimo buferinio tirpalo. Visuose matavimuose NAD ir substratų koncentracijos vienodos, skiriasi tik dehidrogenazių kiekis, kuris didėja po kiekvieno ardyimo ciklo.

**MATEMATINIS MODELIAVIMAS.** Ardymo metodams tarpusavyje palyginti naudotos pirmojo laipsnio kinetinės lygtys. Buvo lyginamos ardyimo greičio konstantos, apskaičiuotos iš kinetinių lygčių, kaip ardyimo efektyvumą nusakantis parametras.

Analizuojant rutulinio malūno ar ultragarsinio prietaiso ardyimo kinetiką praktikoje taikoma pirmojo laipsnio lygtis ((2) lygtis). Iš jos apskaičiuojamas laikas, reikalingas suardyti 95 % laštelių.

$$R = R_m(1 - e^{-k \cdot t}); \quad (2)$$

čia  $R$  – produkto koncentracija,  $R_m$  – produkto koncentracijos maksimumas,  $k$  – pirmojo laipsnio ardymo greičio konstanta,  $t$  – 1 g biomasės ardymo trukmė.

Tačiau dažnai mėginyje randama viduląstelinių biomolekulių pradiniu laiko momentu (ardymo trukmė 0 min). Kadangi biomasė laikoma  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  temperatūroje, dėl atšildymo prieš ardymą dalis ląstelių yra suardomos. Papildomai struktūra ardoma maišant biomasę su buferiniu tirpalu. Todėl (2) lygtis modifikuojama į (3) lygtį. Čia  $R_0$  – produkto koncentracija pradiniu laiko momentu.

$$R = (R_m - R_0)(1 - e^{-k \cdot t}) + R_0 \quad (3)$$

Nepertraukiamo veikimo prietaisams ardymo efektyvumas stebimas atsižvelgus į ardymo ciklų skaičių  $N$ . Tuomet (2) lygtis slėgiminiams prietaisams yra modifikuojama, įvertinant, jog pradiniu laiko momentu tirpale yra viduląstelinių biomolekulių:

$$R = (R_m - R_0)(1 - e^{-k' \cdot N \cdot P^a}) + R_0 \quad (4)$$

čia  $N$  – ciklų skaičius,  $P$  – slėgis, MPa,  $a$  – ląstelių jautrumas suardymui,  $k'$  – ardymo greičio konstanta slėginiams homogenizatoriams.

Apskaičiavus vieno ardymo ciklo trukmę, slėgiminiams ardymo metodams sėkmingai gali būti pritaikyta (3) lygtis. Tačiau realybėje nustatyta pirmojo laipsnio greičio konstanta turės išraišką:

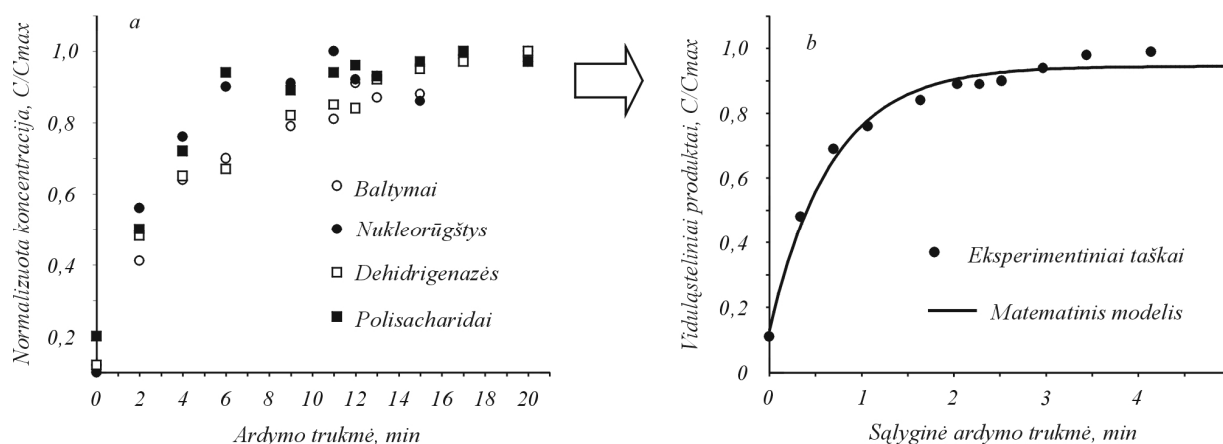
$$k = k' \cdot P^a \quad (5)$$

Visi gauti duomenys iš netiesioginių matavimų apdorojami *GraphPad Prism 5.0* programa.

## Rezultatai ir jų aptarimas

### EKSPERIMENTINIŲ DUOMENŲ PAPRASTINIMAS.

Vertinant ląstelių ardymo dėsningumus, ardymo terpėje matuotas įvairių biojunginių – baltymų, nukleorūgščių, polisacharidų bei dehidrogenazių – koncentracijos kitimas bei tirti kinetiniai parametrai. Dėl skirtingos biomolekulių koncentracijos ląstelėse palyginimui skaičiuotas santykis  $C_i / C_{max}$ . Tokiu būdu kiekvieno produkto palyginamoji koncentracija gauta nuo 0 iki 1 (1 pav., a). Ardant ląsteles biomolekulių koncentracija laike kito pagal pirmojo laipsnio greičio lygtį, todėl kinetikos tyrimams taikyta (3) lygtis. Ardymo greičio konstantos, apskaičiuotos iš skirtingų viduląstelinių biomolekulių koncentracijų, pateiktos 1 lentelėje.



**1 pav.** Ardymo metodo parametų paprastinimas: a – baltymų, polisacharidų, nukleorūgščių ir dehidrogenazių koncentracijos kitimas laike ardant *N.den* ląsteles ultragarsu; b – konvertuotos pagal santykį  $C_i / C_{max}$  ir vidurkintos (matematinis vidukis kieviename taške) viduląstelinių produktų koncentracijos kitimas laike

**1 lentelė.** *Neisseria denitrificans* ardymo greičio konstantos, apskaičiuotos iš skirtingų biomolekulių koncentracijų

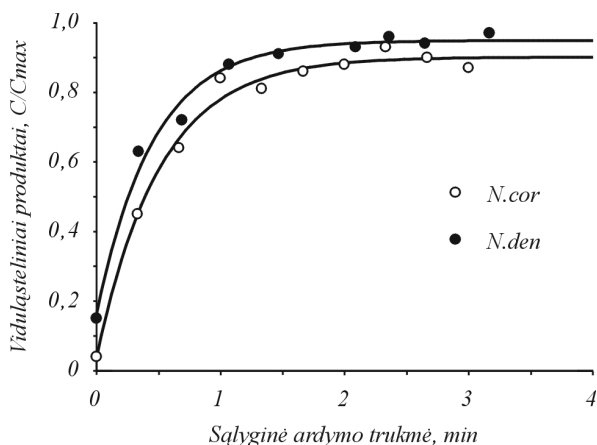
Biojunginiai	k, min <sup>-1</sup>
Baltymai	0,24 ± 0,03
Nukleorūgštys	0,27 ± 0,03
Polisacharidai	0,30 ± 0,03
Dehidrogenazės	0,26 ± 0,04

Iš 1 lentelėje pateiktų duomenų matyti, jog vertinant ardymo greičio konstantas pagal skirtingus biojunginius, gaunamos artimos reikšmės (10 % paklaidų ribose) ir

sudaro nuo 0,24 min<sup>-1</sup> iki 0,30 min<sup>-1</sup>. Todėl remiantis konstantų panašumu duomenys konvertuoti į vidurkinę reikšmę. Siekiant palyginti ardymo efektyvumą tarp skirtingų metodų, įvesta sąlyginė ardymo trukmė, t. y. 1 g ląstelių ardymo trukmė (1 pav., b). Identiška duomenų konvertavimo metodika taikyta tolesniuose tyrimuose, analizuojant *N.den* bei *N.cor* ardymo dėsningumus.

*N.den* IR *N.cor* BAKTERIJŲ LAŠTELIŲ ARDYMAS PERIODINIO VEIKIMO MECHANINIAIS ARDYMO METODAIS. Ardymui pasirinkti dažniausiai naudojami periodinio veikimo ardymo prietaisai: rutulinis malūnas ir ultragarso aparatas. Ardant ultragarsu ir palaikant vienodas ardymo sąlygas *N.den* ląstelės suardytos greičiau. 1 g

*N.den* ląstelių suiro per 1,81 min, o *N.cor* ląstelių – per 2,20 min. Duomenys analizuoti naudojant pirmojo laipsnio lygtį ir parodyti 2 paveiksle.



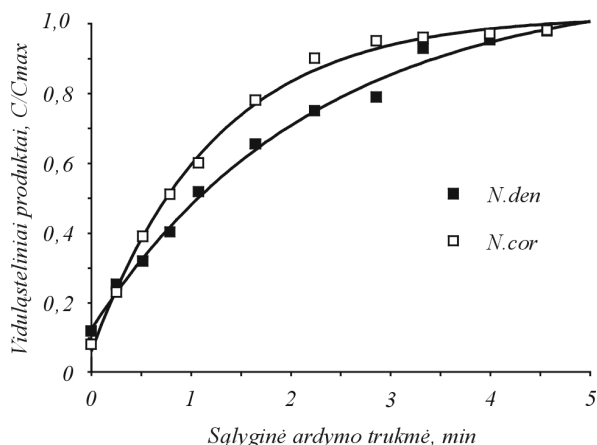
2 pav. Viduląstelinė produktų koncentracijos ardymo terpėje priklausomumas nuo ardymo ultragarsu trukmės

Iš gautų rezultatų matyti, jog lazdelinės formos *N.cor* bakterijos ultragarsu ardosi sunkiau nei *N.den*. Ardymo greičio konstantos sudarė  $1,87 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$  ir  $2,20 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  atitinkamai *N.cor* ir *N.den* bakterijoms. Apskaičiuota, jog ardant 1 g *N.cor* ląstelių, sunaudojama 20 021 J energijos, tuo tarpu *N.den* – 16 132 J. Galima teigti, jog ardant ultragarsu, efektyvumas priklauso nuo ardomų ląstelių prigimties – lazdelinės formos bakterijos ardamos sunkiau nei rutulinės.

Ardant ląsteles rutuliniu malūnu, pastebėti priešingi nei ardant ultragarsu dėsningumai. Rutulinės formos *N.den* bakterijos suyra sunkiau: 1 g šių ląstelių suardymas truko 3,98 min, tuo tarpu 1 g *N.cor* ląstelių – 2,86 min. Ardymo kinetika parodyta 3 paveiksle.

Iš gautų rezultatų matyti, kad *N.cor* ląstelės rutuliniu malūnu ardamos daug efektyviau nei *N.den* ląstelės. *N.cor* ląstelių ardymo greičio konstanta sudarė  $0,68 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  ir buvo 1,5 karto didesnė nei *N.den* ląstelių ( $0,45 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ ). Tai gali būti paaiškinta rutulinio malūno efektyvumo dėsningumais. Iš kolizijos dažnio lygties rutuliniam malūnui yra žinoma, jog egzistuoja minimalus dydis veikiamos trinties ir nėra ardomos. Rutulinės formos bakterijoms *N.den* yra palankesnės sąlygos atsikurti rutuliukų

„kišenėje“, įgaunant atsparumą ardymui. Lazdelinės formos bakterijos geometrija tam yra nepalanki, todėl jos ardamos efektyviau [13].

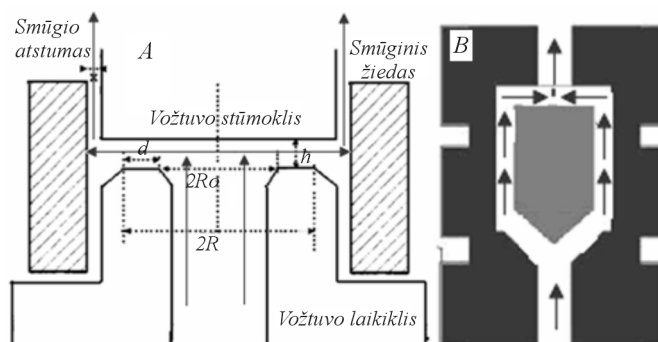


3 pav. Viduląstelinė produktų koncentracijos ardymo terpėje priklausomumas nuo ardymo rutuliniu malūnu trukmės

Energijos sąnaudų skaičiavimai parodė, jog 1 g *N.den* suardyti rutuliniu malūnu sunaudojama 31 730 J, o 1 g *N.cor* – 16 015 J.

Lyginant tarpusavyje periodinio veikimo ardymo metodus matyti, jog ardymo ultragarsu metodas yra daugiau negu 3 kartus našesnis, universalesnis ląstelių geometrijos atžvilgiu bei energetiškai apie 2 kartus naudingesnis, palyginus su rutuliniu malūnu. Rutulinis malūnas yra mažiausias trinties jėgas generuojantis ardymo metodas, todėl yra mažesnio našumo, palyginti su ardymu ultragarsu. Maksimali trinties jėga, kuria gali būti veikiamos ląstelės ardant rutuliniu malūnu –  $500\,000 \text{ s}^{-1}$ , vidutiniškai du kartus mažesnės, palyginti su ardymu ultragarsu [15].

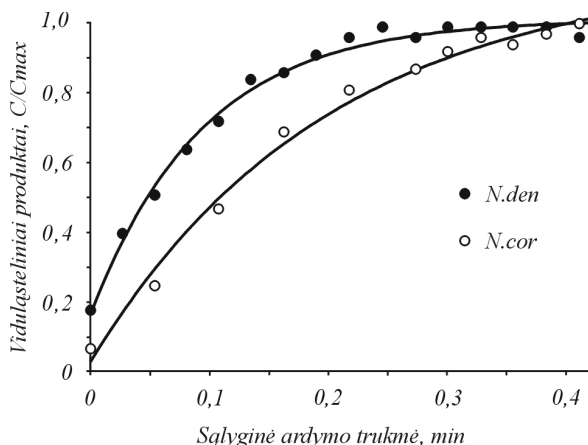
*N.den* IR *N.cor* BAKTERIJŲ LĄSTELIŲ ARDYMAS NEPERTRAUKIAMO VEIKIMO MECHANINIAIS ARDYMO METODAIS. Vieni dažniausiai gamyboje naudojamų nepertraukiamo veikimo ardymo prietaisų yra tradicinės konstrukcijos vožtuvinis didelio slėgio homogenizatorius (DSH) (4 pav., A) bei priešingų srautų didelio slėgio homogenizatorius (MS) (4 pav., B). Abiejų prietaisų varomoji ardymo jėga yra slėgis bei trinties jėgos, tačiau konstrukciniai skirtumai yra akivaizdūs (4 pav.).



4 pav. Ardymo celių konstrukcija: A – DSH ardymo celės padidintas vaizdas; B – MS ardymo celės padidintas vaizdas [14]

Slėgis tradiciniame didelio slėgio homogenizatoriuje sudaromas rankiniu būdu reguliuojant atstumą tarp vožtuvo ir jo laikiklio. Rotoriniam siurbliui veikiant pastoviu greičiu, mažinamas pratekėjimo atstumas, todėl didėja sistemos slėgis ir trintis. MS homogenizatoriuje naudojama fiksuoto skersmens vamzdžio celė (50–200 μm) bei reguliuojamo greičio siurbliu sudaromas reikalingas slėgis.

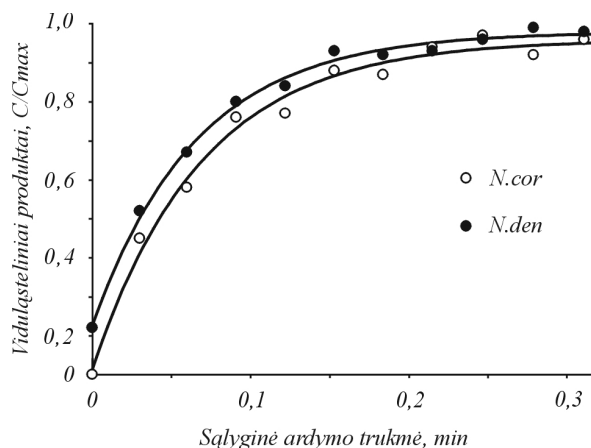
Ardant abiejų tipų ląsteles DSH prietaisu nustatyta, jog *N.den* ląstelės yra suardomos greičiau, palyginus su *N.cor*. 1 g *N.cor* ląstelių suardymas trunka 0,32 min, tuo tarpu 1 g *N.den* – 0,24 min (5 pav.).



5 pav. Viduląstelių produktų koncentracijos kitimas laike ardant ląsteles DSH homogenizatoriumi

Aproksimavus eksperimentinius duomenis pirmojo laipsnio greičio lygtimi, apskaičiuotos ardymo greičio konstantos. *N.cor* atveju ardymo greičio konstanta sudaro  $6,58 \pm 0,21 \text{ min}^{-1}$ , *N.den* –  $8,13 \pm 0,17 \text{ min}^{-1}$ . Matyti, jog ardant DSH prietaisu, turi įtakos ląstelių geometrinė forma – rutulinės formos bakterijos suyra apie 20 % greičiau nei lazdelės formos. Energijos sąnaudų skaičiavimai parodė, jog *N.den* ląstelių suardymui sunaudojama 15 500 J/g energijos, tuo tarpu *N.cor* ląstelėms – 19 010 J/g.

Ardant ląsteles MS prietaisu, nustatyta, jog ląstelių geometrija neturi įtakos ardymo kinetikai. 1g ląstelių ardymas trunka vienodai abiejų rūšių ląstelėms –  $0,16 \text{ min}^{-1}$ . Kinetiniai proceso dėsningumai pavaizduoti 6 paveiksle.



6 pav. Viduląstelių produktų koncentracijos kitimas laike ardant ląsteles MS homogenizatoriumi

Iš eksperimentinių ardymo MS homogenizatoriumi kinetinių parametru matyti, jog *N.cor* ardymo greičio konstanta sudaro  $19,61 \pm 0,51 \text{ min}^{-1}$ , o *N.den* –  $19,41 \pm 0,40 \text{ min}^{-1}$ . Energijos sąnaudos analizuojamoms ląstelėms buvo vienodos ir siekė 15 000 J/g.

Apibendrinant ląstelių ardymą nepertraukiamo veikimo prietaisais galima teigti, jog tradicinės konstrukcijos didelio slėgio homogenizatorius, esant vienodam darbiniam slėgiui, ardo ląsteles mažesniu efektyvumu negu priešingų srautų didelio slėgio homogenizatorius. Nustatyta ardymo greičio konstanta yra > 2,4 karto mažesnė DSH prietaisui, palyginus su MS. DSH prietaiso ardymo efektyvumas labiau priklauso nuo ląstelės formos, – rutulinės formos bakterijos šiame prietaise ardamos lengviau negu lazdelinės. Priešingai, MS prietaiso atveju ardymo efektyvumas nepriklauso nuo ląstelių geometrinės formos. Papildomas MS prietaiso privalumas yra mažos energijos sąnaudos, ardant ląsteles dideliu našumu.

Bendrieji ardymo dėsningumai parodė, jog lazdelinės bakterijos ardamos sunkiau negu rutulinės ultragarsu (UG) bei tradicinės konstrukcijos didelio slėgio homogenizatoriumi (DSH) (2 lent.). Nustatyta, jog ardant rutulininiu malūnu, dėl geometrijos skirtumo lengviau ardamos lazdelinės bakterijos *N.cor*. MS konstrukcijos didelio slėgio homogenizatoriaus efektyvumas buvo mažiausiai priklausomas nuo ląstelės geometrijos, – abiejų rūšių ląstelės suardytos vienodu efektyvumu.

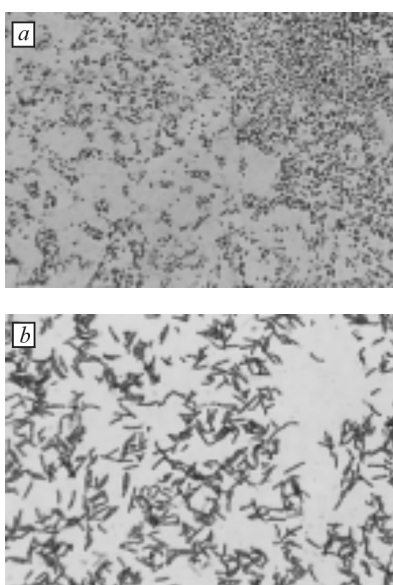
2 lentelė. Apibendrinta ląstelių ardymo efektyvumo parametru lentelė

Ardymo metodas*	$k, \text{min}^{-1}$		Sąlyginė ardymo trukmė, min		Energijos sąnaudos, J	
	<i>N.cor</i>	<i>N.den</i>	<i>N.cor</i>	<i>N.den</i>	<i>N.cor</i>	<i>N.den</i>
UG	$1,87 \pm 0,05$	$2,20 \pm 0,07$	2,20	1,81	20021	16132
RM	$0,68 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,06$	2,86	3,98	16015	31730
MS	$19,61 \pm 0,51$	$19,41 \pm 0,40$	0,16	0,16	15000	15000
DSH	$6,58 \pm 0,21$	$8,13 \pm 0,17$	0,32	0,24	19010	15500

\*UG – ultragarsu, RM – rutulinu malūnu, MS – MS konstrukcijos didelio slėgio homogenizatoriumi, DSH – tradicinės konstrukcijos didelio slėgio homogenizatoriumi.

Iš duomenų, pateiktų 2 lentelėje, matyti, kad energijos sąnaudų, ardymo greičio ir trukmės, reikalingų vienam ląstelių gramui suardyti atžvilgiu universaliausias prietaisas yra nepertraukiamo veikimo MS konstrukcijos didelio slėgio homogenizatorius.

**MIKROSKOPINĖ ANALIZĖ IR DALELIŲ DYDŽIŲ MATAVIMAI.** Ląstelių ardymo, kitaip nei tradicinio dalelių smulkinimo, tikslas yra viduląstelinį produktų išskyrimas į terpę, padarant tik smulkias pažaidas / trūkius ląstelėse. Todėl mikroskopu buvo vertinamas ardymo skirtingais metodais pobūdis. Kuo smulkiau ardymo metu ląstelės yra sumalamos, tuo sudėtingiau jas yra pašalinti tradicinio centrifugavimo metodu. Ląstelės stebimos esant 1000 kartų didinimui. 7–9 paveiksluose parodyti pradiniai ir suardyti dispersijų vaizdai.

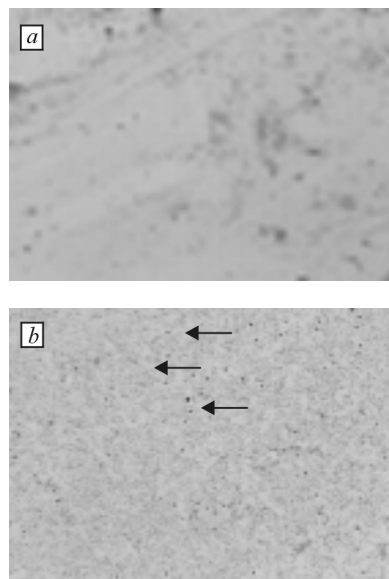


**7 pav.** Pradinė rutulinės formos *N.den* bakterijų dispersija prieš ardymą (a) ir b – lazdelinės formos bakterijų *N.cor* dispersija prieš ardymą. Didinimas 1000 kartų

Iš 7 paveiksle pateiktų nuotraukų matyti, kad rutulinės formos bakterijos yra mažesnės, palyginus su lazdelinėmis. Mikroskopu išmatuotas vidutinis *N.den* rutulinės formos bakterijų skersmuo sudaro 2,2  $\mu\text{m}$ . Lazdelinės formos bakterijų *N.cor* vidutinis ilgis sudaro nuo 4  $\mu\text{m}$  iki 6  $\mu\text{m}$ , o vidutinis skersmuo – 2,5  $\mu\text{m}$ .

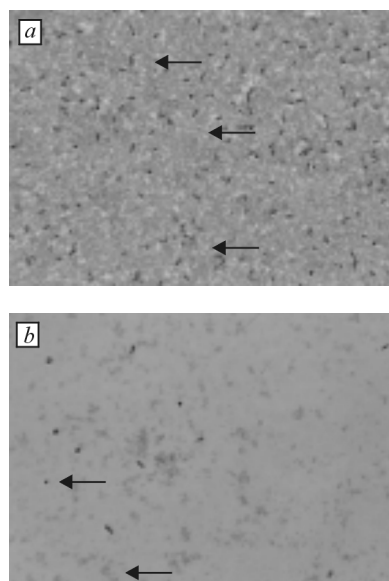
Ardant *N.den* ląsteles ultragarsu abiem nepertraukiamo veikimo metodais visos ląstelės yra suardomos ir pradinės struktūros ląstelių nebeaptinkama. Ardant rutuliniu malūnu, mėginiuose lieka sveikų ląstelių (8 pav.).

Iš 8 paveikslu nuotraukų matyti, kad ardant rutuliniu malūnu *N.den* ląsteles, lieka didelis kiekis nesuardytų ląstelių. Tai atitinka ir kinetinius duomenis, iš kurių buvo matyti, kad rutulinis malūnas prasčiausiai iš analizuotų metodų ardo šias ląsteles. Ardant nepertraukiamo veikimo metodais bei ultragarsu, sveikų ląstelių mėginiuose nebeaptinkama. Galima teigti, jog ardymo metu *N.den* ląstelės yra visai sumalamos iki optiniu mikroskopu nematomų komponentų esant 1000 kartų didinimui.



**8 pav.** *N.den* ląstelių dispersija po ardymo: a – ultragarsu; b – rutuliniu malūnu. Didinimas 1000 kartų

Stebint *N.cor* ląstelių dispersiją mikroskopu, nustatyta, jog ardant rutuliniu malūnu bei MS prietaisu ląstelės suardomos visiškai. Nedaug ląstelių lieka ardant jas ultragarsu bei tradicinės konstrukcijos didelio slėgio homogenizatoriumi (9 pav.).

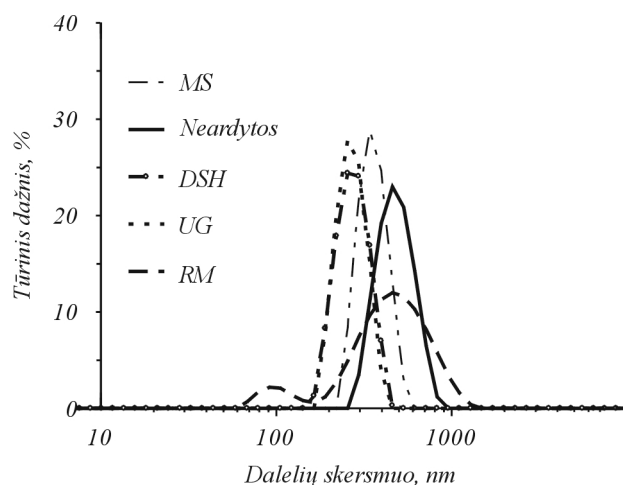


**9 pav.** *N.cor* ląstelių dispersija po ardymo: a – ultragarsu; b – rutuliniu malūnu

Matyti, jog *N. denitrificans* ląsteles ardant rutuliniame malūne, ardymo terpėje lieka nesuardytų ląstelių. Tai patvirtina kinetinius duomenis, jog rutulinis malūnas prasčiausiai iš analizuotų metodų suardo ląsteles (2 lent.). Ardant nepertraukiamo veikimo metodais bei ultragarsu sveikų ląstelių mėginiuose nebeaptinkama. Galima teigti, jog ardymo metu *N. denitrificans* ląstelės yra visiškai sumalamos iki mažesnių komponentų.

Mikroskopinė analizė parodė, jog ardant *N. Coralina* ląsteles mechaniniais metodais, mėginiuose stebimos didelio tūrio sveikos ląstelės (9 pav., a ir b). Tuo tarpu kinetiniai dėsniniai parodė, jog visi biojunginiai pereina iš ląstelių į ardymo terpę (2 ir 3 pav.). Šiuo atveju ardant ląstelėse yra padaromi tik trūkiai, per kuriuos viduląsteliniai produktai patenka į ardymo terpę. Vadinasi, *N.cor* ir *N.den* ląstelių irimo mechanizmas skiriasi. *N.cor* ląstelių irimo mechanizmas yra daug naudingesnis biotechnologijos pramonėje, kadangi palengvina ląstelių šalinimo po suardymo stadiją.

Kiekvienu mechaninio ardymo metodu ląstelės suardomos iki skirtingo skersmens dalelių. Išmatuotas ardytų ir neardytų ląstelių dydis. *N.cor* ląstelių dalelių dydžio skirstinys parodytas 10 paveiksle.



10 pav. *N.cor* ląstelių dydžio pasiskirstymas pagal tūrį prieš ardymą ir po jo skirtingais metodais

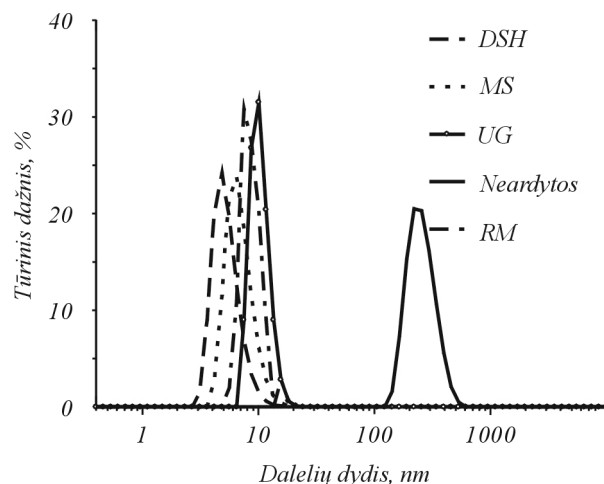
Iš gautų duomenų (10 pav.) matyti, kad *N.cor* ląstelių dydis po suardymo įvairiais metodais yra artimas pradiniam ląstelių dydžiui. Ardant rutuliniu malūnu nedaug dalelių yra visiškai suardoma, jų dydis yra apie 100 nm. Tuo tarpu daugumos ląstelių dydis nepakinta, nes jose yra padaryti tik trūkiai. Kinetiniais tyrimais buvo nustatyta, jog ardant RM metodu iš *N.cor* ląstelių biojunginiai išsiskiria greitai ir visiškai.

*N.den* atveju skirtumas tarp ląstelių dydžio pradinėje suspensijoje ir po suardymo yra gerokai didesnis. 11 paveiksle parodytas dalelių dydžio skirstinys.

Iš duomenų matyti (11 pav.), kad *N.den* ląstelės yra visiškai suardomos ir dalelių dydis po ardymo sumažėja iki maždaug 10 nm. Ląstelės yra intensyviai susmulkinamos ardymo metu. Tai dar kartą patvirtina, jog rutulinių ir lazdelinių bakterijų irimo mechanizmas yra skirtingas.

## Išvados

Ištirti rutulinės formos bakterijų *Neisseria denitrificans* ir lazdelinės formos bakterijų *Nocardia corallina* ardymo dėsniniai. Nustatyta, kad:



11 pav. *N.den* ląstelių dydžio pasiskirstymas pagal tūrį prieš ardymą ir po jo skirtingais metodais

- ardymo ultragarsu efektyvumas priklauso nuo ląstelių geometrinės formos. Greičiau suardomos rutulinės formos bakterijų ląstelės. Apskaičiuotos ardymo greičio konstantos sudarė  $1,87 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$  bei  $2,20 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ , atitinkamai *N.den* ir *N.cor* bakterijų ląstelėms;
- rutulinis malūnas 1,5 karto efektyviau ardo rutulinės formos bakterijas nei lazdelinės formos. *N.cor* ląstelėms apskaičiuota ardymo greičio konstanta sudarė  $0,68 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$ , *N.den* –  $0,45 \pm 0,06 \text{ min}^{-1}$ ;
- nepertraukiamo veikimo priešingų srautų didelio slėgio homogenizatorius yra mažiausiai ląstelės formos sąlygojamas ardymo metodas. Nustatytos ardymo greičio konstantos yra vienodos tiek *N.cor* ( $19,61 \pm 0,51 \text{ min}^{-1}$ ), tiek *N.den* bakterijų ląstelėms ( $19,41 \pm 0,40 \text{ min}^{-1}$ );
- tradicinės konstrukcijos didelio slėgio homogenizatoriumi lengviau suardomos rutulinės formos bakterijos. Ardymo greičio konstanta *N.cor* bakterijoms sudarė  $6,58 \pm 0,21 \text{ min}^{-1}$ , *N.den* –  $8,13 \pm 0,17 \text{ min}^{-1}$ ;
- mikroskopinė analizė ir dalelių dydžio matavimai patvirtino, jog rutulinių ir lazdelinių formų bakterijų ardymo mechanizmai skiriasi. Rutulinės formos ląstelės ardymo metu yra sumalamos iki smulkių dalelių, tuo tarpu lazdelinės formos ląstelėse ardymo metu išlaikoma pradinė struktūra, tik yra padaromi trūkiai, sąlygojantys viduląstelinį produktų patekimą į ardymo terpę.

## Literatūra

1. Durieux A., Simon J. P. Applied Microbiology. Kluwer Academic Press, 2002.
2. Middelberg A. P. J. // Biotechnology Advances. 1995. Vol. 13. P. 491–551.
3. MacKenzie C. R., McDonald I. J., Johnson K. G. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1980. Vol. 17, N 5. P. 789–797.
4. Jonson J. C., Ryden L. Protein purification. Second edition. New York, 1998.

5. **Pandolfe W. D.** Cell disruption by homogenization. Gaulin Rannie APV homogenizer group. 1993.
6. **Ho Ch. W., Tan W. S., Yap W. B., Ling T. Ch., Tey B. T.** // Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2008. Vol. 13. P. 577–583.
7. **Feliu J. X., Cubarsi R., Villaverde A.** // Biotechnology and bioengineering. 1998. N 5. P. 534–540.
8. **Lewis I. M.** // Bacteriology review. 1941. N 5. P. 181–230.
9. **Guerlavy P., Izac V., Tholozan J.-L.** // Current Microbiology Journal. 1998. Vol. 36, N 2. P. 131–135.
10. **Bruckner A.** // Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 1980. Vol. 18, N 5. P. 275–278.
11. **Brookman J. S. G.** // Biotechnology and Bioengineering. 1975. N 17. P. 465–479.
12. **Garrido F., Chisti Y., Moo-Young M.** // Bioseparation. 1994. N 4. P.134–136.
13. **Roe S.** Protein purification techniques. Oxford University Press, 2006.
14. **Спирин А. С.** // Биохимия. 1958. Т. 23, Вып. 5. С. 656–662.
15. **Posch A.** 2D page: Sample Preparation and Fractionation. Humana Press, 2008.

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

## EVALUATION OF DISRUPTION METHODS FOR RELEASING INTRACELLULAR PRODUCT FROM COCCUS AND BACILLUS TYPE BACTERIAL CELLS

### Summary

A comparative evaluation of four different cell-disruption methods of releasing intracellular products from *Neisseria denitrificans* and *Nocardia corallina* was investigated. The cell disruption methods evaluated in this study were high-pressure homogenization (HPH), batch mode bead milling (BM) and ultrasonication (US). US and traditional construction HPH were determined to be cell-geometry-dependent methods, less effectively disrupting the *Nocardia corallina* bacillus in comparison with the *Neisseria denitrificans* coccus. However, bead mill was found to be less effective in the disruption the *Neisseria denitrificans* of coccus. Microfluidizer, opposed-steam HPH, was found to be a cell-type-independent method with the lowest energy consumption and highest disruption rates among the analyzed methods. Microscopic and size-distribution analyses revealed the mechanism of disruption to differ between cells. Coccus are totally disrupted and lose their native structure after disruption, while bacillis are just broken but retain their geometrical structure which is truncated enough to release the intracellular products.