



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Nerijus Makauskas

***NEISSERIA DENITRIFICANS* BAKTERIJŲ MECHANINIO ARDymo
METODO TYRIMAS IR OPTIMIZAVIMAS**

**INVESTIGATION AND OPTIMIZATION OF *NEISSERIA DENITRIFICANS*
MECHANICAL DISRUPTION**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerijos mokslo kryptis

Vilnius, 2011

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

(Vardas, pavardė)

(Data)

Nerijus Makauskas

***NEISSERIA DENITRIFICANS* BAKTERIJŲ MECHANINIO ARDYMO
METODO TYRIMAS IR OPTIMIZAVIMAS**

**INVESTIGATION AND OPTIMIZATION OF *NEISSERIA DENITRIFICANS*
MECHANICAL DISRUPTION**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerijos mokslo kryptis

Vadovas mag. Robert Stupak _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas mag. Ričardas Mališauskas _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas doc. dr. Angelė Kaulakienė _____

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2011

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Technologijos mokslų studijų sritis

Bioinžinerijos mokslo kryptis

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(parašas)

Juozas Kulys

(vardas, pavardė)

(data)

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

.....Nr.

Vilnius

Studentui (ei)**Nerijui Makauskui**.....

(vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo tema: ***NEISSERIA DENITRIFICANS* BAKTERIJŲ
MECHANINIO ARDYMO METODO TYRIMAS IR OPTIMIZAVIMAS**

patvirtinta 2010 m. lapkričio 03 d. dekanų įsakymu Nr. 334

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2011 m. gegužės 26 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTYS:

1. parinkti metodus *Neisseria denitrificans* ląstelių ardymo efektyvumui įvertinti;
2. parinkti ardymo metodus tiek laboratoriniams tiek gamybiniams ląstelių kiekiams ardyti;
3. sumodeliuoti analizuojamus procesus;
4. keičiant biologinius, konstrukcinius ir išorinius parametrus, optimizuoti *Neisseria denitrificans* ląstelių ardymo procesą.

Vadovas
(parašas)

Konsultantas
(parašas)

Užduotį gavau
(parašas)

Nerijus Makauskas
(vardas, pavardė)

.....
(data)

mag. Robert Stupak
(mokslinis laipsnis, vardas, pavardė)

mag. Ričardas Mališauskas
(mokslinis laipsnis, vardas, pavardė)

Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Nerijus Makauskas, 20055122

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų

(Fakultetas)

Bioinžinerijos programa, Bifm09

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2011 m. gegužės 20 d.

(Data)

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas (projektas) tema

Neisseria denitrificans bakterijų mechaninio ardymo metodo tyrimas ir optimizavimas

patvirtintas 2010 m. lapkričio 03 d. dekanu potvarkiu Nr. 334, yra

savarankiškai parašytas. Šiame darbe (projekte) pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą (projektą), mane konsultavo mokslininkai ir specialistai: Ričardas Mališauskas, doc. dr. Angelė Kaulakienė, Darius

Mano darbo (projekto) vadovas Robert Stupak

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą (projektą) nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs(-usi).

(Parašas)

(Vardas ir pavardė)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas

Fundamentinių mokslų fakultetas

Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN

ISSN

Egz. sk.

Data-....-....

Antrosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas

Pavadinimas *Neisseria denitrificans* bakterijų mechaninio ardymo metodo tyrimas ir optimizavimas

Autorius **Nerijus Makauskas**

Vadovas **Ričardas Mališauskas**

Kalba

☒ X

lietuvių

☐

anglų

Santrauka

Remiantis mikroskopine analize, tiriamų dalelių dydžio skirstiniais bei viduląstelinių produktų koncentracijos kitimo kinetika ištirtas *Neisseria denitrificans* ląstelių ardymas mechaniniais metodais. Nustatyta, jog laboratoriniams (<50g) kiekiams ardyti optimalu naudoti ultragarsinį dezintegratorių, kuriuo 1g *Neisseria denitrificans* ląstelių efektyviai suardomas per 2,4 min, t.y. beveik 3 kartus greičiau nei rutuliniu malūnu, sunaudojant 28513 J energijos. Gamyboje savo ruožtu efektyviau naudoti naujos konstrukcijos didelio slėgio homogenizatorių - mikroskystintuvą: kuriuo 12 L/val našumu 1 g biomasės suardomas per 8,4 s sunaudojant 13749 J energijos. Didelio slėgio homogenizatorius APV, kurio našumas 9 L/val, suardo 1 g *Neisseria denitrificans* per 24 s. Ardymas mikroskystintuvu optimizuotas varijuojant biologinius, konstrukcinius ir išorinius faktorius. Nustatyta, jog *Neisseria denitrificans* sienelės struktūra yra efektyviausiai ardoma, kai ląstelės auginamos iki 1 OV, auginimo metu nepakintant viduląstelinei sudėčiai. Biologinis endoproduktų stabilumas ir aktyvumas išlaikomas ardymui panaudojus Y tipo ardymo celę ir 125–145 MPa darbinį slėgį. Lyginant su Y-tipo cele, Z-tipo celėje ląstelės suardomos efektyviau ir našiau, tačiau po suardymo pastebėtas fermentų aktyvumo sumažėjimas ir gautos mažesnio dydžio sunkiai šalinamos ląstelių nuolaužos. Pritaikius DoE eksperimentų planavimo metodą parinktos optimalios išorinių faktorių koncentracijos – buferinio tirpalo pH 9.0, 10 mM EDTA, 0,2% Triton X-100, 0,2 g/ml ląstelių koncentracija ir 90 min. preinkubacija (brinkinimas). Pritaikius optimalias ardymo sąlygas, atliktas NdeI restrikcijos endonukleazės gryninimas ir gauti duomenis palyginti su neoptimizuotos gamybos duomenimis. Gauta jog ląstelės suardytos 83% efektyviau; ląstelių nuolaužos centrifugavimo metodu šalinamos 15% greičiau ir gaunamos kompaktiškesnės; po chromatografinio gryninimo 26% didesnė NdeI restrikcijos endonukleazės išeiga, palyginti su tradiciniu gamybiniu ardymu.

Darbą sudaro: įvadas, 3 skyriai, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 70 p. teksto be priedų, 35 paveikslai, 12 lentelių, 70 bibliografinis šaltinis.

Prasminiai žodžiai: *Neisseria denitrificans*, ultragarsinis dezintegratorius, rutulinys malūnas, didelio slėgio homogenizatorius, mikroskystintuvas, optimizavimas, DoE.

Vilnius Gediminas technical university
Faculty of **Fundamental Sciences**
Department of **Chemistry and Bioengineering**

ISBN ISSN
Nr.of copies.....
Date....-....-....

Master Degree Studies **Bioengineering** study programme Master's Thesis

Title **Investigation and optimization of *Neisseria denitrificans* mechanical disruption**

Author **Nerijus Makauskas**

Coordinator **Ričardas Mališauskas**

Language

☒ X

lithuanian

☐

english

Abstract

Disruption of *Neisseria denitrificans* cells using mechanical disruption methods was investigated. Detailed monitoring of disruption efficiency was based on microscopic and particle size distribution analysis and intracellular content release kinetics. Ultrasonication, operated in batch mode, was the optimal disruption method for the laboratory-scale of cells (<50g), resulting in efficient disintegration of 1g of cells in less than 2.4 minutes, applying 28513 J of energy. In comparison, bead mill disrupted 1g of cells in more than 7 minutes. The new construction of high-pressure homogenizer - microfluidizer is more efficient in industrial-scale applications: flow rates 12L/h, 1 g of biomass is disrupted in 8,4 s using the 13749 J energy. In comparison the traditional construction of high-pressure homogenizer – APV was less efficient: flow rates 9L/h, 1 g of biomass was disrupted by 24 s, applying 15500 J energy. The efficiency of the disruption is dependent on biological, structural and external factors. Cells grown at high specific growth rates were easier to disrupt than cells grown at a lower growth rate. Furthermore, cell disruption in Z-type chamber found to be more efficient and productive, however the degradation of proteins was observed, resulting in decreased enzyme activity. Optimization of cell rupture in Y-type chamber was performed using modern DoE planning technique and optimal levels of external factors were determined- buffer pH 9.0, 10 mM EDTA, 0,2% Triton X-100, 0,2 g/mL cell concentration, and 90 minutes incubation. Optimized disruption was applied in NdeI restriction endonuclease production scheme and obtained results were compared with traditional purification scheme. Changes in flowchart resulted in 83% increased cell disruption efficiency; 15% faster (time) cell debris removal using centrifugation, precipitate was more compact; 26% increased overall yield of NdeI after chromatographic purification cycle. Based on results 20% savings in labor hours and production economics were reached due to optimized disruption.

Structure: introduction, 3 chapters, conclusion, references.

Thesis consists of: 70 p. of text without supplements, 35 figures, 12 tables, 70 bibliographical entries.

Keywords: *Neisseria denitrificans*, ultrasonication, bead mill, high pressure homogenizer, microfluidizer, optimization, DoE

TURINYS

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS	9
LENTELIŲ SĄRAŠAS	11
SANTRUMPOS	12
IVADAS	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Mikroorganizmų įvairovė ir ląstelės sienelės sudėtis	14
1.2. Ląstelės forma	15
1.3. Mechaninės ląstelių savybės	17
1.4. Ląstelių ardymo metodai	18
1.4.1. Nemechaniniai ardymo būdai	19
1.4.2. Mechaniniai ardymo metodai	21
1.5. Ardymo metodų palyginimas	26
1.6. Ląstelių ardymo optimizavimas	27
1.7. Tyrimo objektas	29
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	30
2.1. Aparatūra	30
2.2. Medžiagos	30
2.3. Tirpalai ir buferiniai tirpalai	31
2.4. Metodai	31
2.4.1. Biomasės ardymas lizocimu	31
2.4.2. Biomasės ardymas ultragarsiniu dezintegratoriumi	32
2.4.3. Biomasės ardymas rutuliniu malūnu	32
2.4.4. Biomasės ardymas didelio slėgio homogenizatoriumi	32
2.4.5. Biomasės ardymas mikroskystintuvu	32
2.5. Ląstelių ardymo efektyvumo nustatymas	33
2.5.1. Mikroskopija	33
2.5.2. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu	33
2.5.3. Nukleorūgščių kiekio nustatymas Spirino metodu	34
2.5.4. Polisacharidų koncentracijos nustatymas	34
2.5.5. Gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės aktyvumo nustatymas	35
2.5.6. Dalelių dydžio nustatymo metodas	35
2.5.7. Chromatografinis gryninimas stacionariomis sąlygomis	35
2.5.8. Chromatografinis gryninimas	35

2.5.9.	Restriktazių aktyvumo nustatymas	36
2.5.10.	DNR elektroforezė agarozės gelyje	37
2.6.	Matematinis modeliavimas	37
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	40
3.1.	Ardymo metodo parinkimas	40
3.1.1.	Fermentinis ardymo metodas	40
3.1.2.	Mechaninių ardymo metodų efektyvumas ardant <i>Neisseria denitrificans</i>	41
3.2.	Faktoriai, lemiantys suardymo efektyvumą.....	46
3.2.1.	Biologiniai faktoriai	47
3.2.2.	Mechaniniai faktoriai	47
3.2.2.1.	Ardymo celes konstrukcija	47
3.2.2.2.	Slėgis ląstelių suardymui	49
3.2.3.	Išoriniai faktoriai.....	51
3.2.3.1.	pH ir ląstelių brinkinimo trukmė	52
3.2.3.2.	Druskų ir ląstelių koncentracija	53
3.2.3.3.	Detergentai ir chelatai	55
3.2.3.4.	Polietileniminas	57
3.2.3.5.	Chaotropai.....	59
3.3.	Suardymas panaudojant tirtų faktorių optimalias reikšmes	60
	IŠVADOS	62
	LITERATŪRA	64

PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

Paveikslo nr.	Puslapis	Paveikslo pavadinimas
1 pav.	15	Scheminis bakterijų ląstelės vaizdas ir apvalkalo skirtumai skirtingoms ląstelėms
2 pav.	16	Rutulinių bakterijų formos
3 pav.	19	Ląstelių ardymo metodų skirstymas
4 pav.	22	Rutulinio malūno veikimo principinė schema
5 pav.	23	Akustinio slėgio ir kavitacijos ryšis ultragarsui sklindant tirpale
6 pav.	24	Didelio slėgio homogenizatorius APV – 2000
7 pav.	25	Mikroskystintuvas MH-110EH-30 su Y ardymo tipo celė
8 pav.	37	M13mp18 plazmidės restriktazių Bsp143I ir NdeI atpažinimo vietos
9 pav.	40	Ląstelių suspensijos <i>Neisseria denitrificans</i> hidrolizė su lizocimu mikroskopinė analizė
10 pav.	40	Bioproduktų koncentracijos kitimas terpeje ardant lizocimu
11 pav.	41	Ardomos <i>N. denitrificans</i> suspensijos UG bei RM mikroskopinė analizė
12 pav.	42	UG ir RM ardymo metodų palyginimas
13 pav.	43	Ląstelių suspensijos ardymo mikroskystintuvu proceso grafikas
14 pav.	45	Ardomos <i>N. denitrificans</i> suspensijos APV bei MS mikroskopinė analizė
15 pav.	45	Slėginių ardymo metodų palyginimas
16 pav.	45	Slėginių ardymo prietaisų celių konstrukcija
17 pav.	45	Ląstelių nuolaužų dydžių pasiskirstymas po suardymo slėginiais metodais
18 pav.	46	Faktoriai lemiantys suardymo efektyvumą
19 pav.	47	<i>Neisseria denitrificans</i> , augintos iki 1 ir 3 optinių vienetų, suardymo efektyvumas
20 pav.	48	Mikroskystintuvo ardymo Z ir Y celių principinės konstrukcijos
21 pav.	48	Y ir Z tipo celių suardymo efektyvumas
22 pav.	49	Nuolaužų dydžių pasiskirstymas po ardymo su Z ir Y tipo cele
23 pav.	49	Nuosėdų dalis po centrifugavimo
24 pav.	50	<i>Neisseria denitrificans</i> suardymo greitis nuo slėgio naudojant Y tipo celę ir Z tipo celę

25 pav.	50	Fermentų aktyvumo sumažėjimas
26 pav.	52	Suardymo greičio priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH ir brinkinimo trukmės po ląstelių suspendavimo
27 pav.	53	Ląstelių nuolaužų dydžių pasiskirstymų priklausomybė nuo pH po 8 suardymo ciklą
28 pav.	54	Suardymo efektyvumo priklausomybė nuo NaCl ir ląstelių koncentracijos
29 pav.	55	Suardymo greičio priklausomybė nuo NaCl ir ląstelių koncentracijos
30 pav.	56	Suardymo efektyvumo priklausomybė nuo detergentų ir chelatų koncentracijos ir suardymo greičio priklausomybės
31 pav.	57	Restrikcijos endonukleazių aktyvumas su EDTA ir Triton X-100
32 pav.	58	Ardomos <i>N. denitrificans</i> ląstelių suspensijos be PEI ir su PEI mikroskopinė analizė
33 pav.	58	PEI įtaka ląstelių suardymui
34 pav.	59	GuHCl įtaka ląstelių suardymui
35 pav.	60	<i>Neisseria denitrificans</i> ląstelių suardymas optimaliomis sąlygomis

LENTELIŲ SĄRAŠAS

Lentelės nr.	Puslapis	Lentelės pavadinimas
1 lentelė	18	Ląstelių suardomumas
2 lentelė	26	Ardymo metodų palyginimas
3 lentelė	27	Ardymo optimizavimo darbų palyginimas
4 lentelė	28	Ardymo eksperimentų, taikant faktorinį eksperimentų planavimą, palyginimas
5 lentelė	29	Optimalūs ardymo slėgiai įvairioms <i>Neisseria</i> rūšims
6 lentelė	36	Mėginio kiekis restrikcijos endonukleazės teste
7 lentelė	42	<i>Neisseria denitrificans</i> ląstelių suspensijos ardymo lizocimu analizės duomenys
8 lentelė	46	Metodai palyginti pagal tai kiek reikia laiko ir energijos 1 g <i>Neisseria denitrificans</i> biomasės suardyti
9 lentelė	51	Išoriniai faktoriai
10 lentelė	52	pH ir brkinimo trukmės įtaka ląstelių suardomumui
11 lentelė	54	Druskos ir ląstelių koncentracijos įtaka ląstelių suardomumui
12 lentelė	56	Detergentų ir chelatų įtaka ląstelių suardomumui

SANTRUMPOS

APV – didelio slėgio homogenizatorius APV – 2000

DAP - diaminopimelinė rūgštis

DE52 – dietilamino etilo celiuliozė

DNazė – dezoksiribonukleazė

DNR – deoksiribonukleorūgštis

DOE – (angl. *design of experiments*) faktorinis eksperimentų planavimas

DTT – ditionitritolis

EDTA – etilendiaminotetraacto rūgštis

G6P – D-gliukozės-6-fosfatas

G6PDH - D-gliukozės-6-fosfato dehidrogenazė

GuHCl – guanidino hidrochloridas

JSA – jaučio serumo albuminas

MS – mikroskystintuvas

NAD – nikotinamido adenino dinukleotidas

NaDS – natrio dodecilsulfatas;

NdeI – restrikcijos endonukleazė NdeI;

NR – nukleino rūgštys

P11 – fosfoceliuliozė

PAM – paviršiaus aktyvumo medžiagos

PEI – polietileniminas

RM – rutulinis malūnas

RNR – ribonukleorūgštis

TRIS – tris (hidroksimetil) aminometanas

UG – ultragarsinis dezintegratorius

IVADAS

Biotechnologija, paremta vis didėjančių molekulinės biologijos ir genetinės inžinerijos supratimu, yra viena sparčiausiai auganti pramonės sritis. Kaip vertingų fermentų, baltymų ir kitų bioproduktų šaltinis gali būti panaudotos įvairios ląstelės: nuo bakterijų iki žmogaus. Mikroorganizmai intensyviai naudojami jau 30 metų (Geciova *et al.* 2002). Jie gamina įvairių tipų biologines medžiagas: sekretuojamas - išskiriamas į bakterijų auginimo terpę, tiek viduląstelines, kurios yra ląstelės citoplazmoje. Kaip producentai jie pasirenkami pagal kelias charakteristikas: kuo paprastesnė genetinė medžiaga, ekspresijos sistema, ekspresijos indukcija ir jos reguliavimas, plazmidės turėjimas, kuo didesnis augimo greitis, kuo paprastesnė auginimo terpė ir žemas priemaišinių bioproduktų kiekis (proteazių, nukleazių ir t.t.). Dažniausiai naudojami mikroorganizmai yra *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ir *Bacillus subtilis* (Middelberg 1995).

Bioproduktų gryninimas susideda iš kelių pagrindinių stadijų: mikroorganizmo, turinčio tikslinį produktą, kultivavimas, bioproducto išskyrimas, ląstelių skaidrinimas ir gryninimas. Produktų gryninimas supaprastėja, kai mikroorganizmai juos išskiria į auginimo terpę, tačiau didžioji dalis reikalingų produktų yra pačioje ląstelėje, todėl prieš gryninimą dar naudojamas ląstelių suardymas. Šios stadijos tikslas yra ne kuo smulkiau suardyti ląstelę, bet išskirti specifinį produktą į išorę. Skirtingos ląstelės ne vienodai atsparios ardymui, pagrindiniai faktoriai, lemiantys ląstelės atsparumą, yra mechaninės ląstelės savybės ir ląstelės forma (Geciova *et al.* 2002). Norint sumažinti gryninamo produkto sąnaudas, būtina optimizuoti ardymą, o tai galima padaryti keičiant suardymo efektyvumą lemiančius faktorius.

Šio darbo tikslas yra parinkti mechaninį ardymo metodą *Neisseria denitrificans* ląstelėms ardyti ir jį optimizuoti. Iškelti tokie darbo uždaviniai:

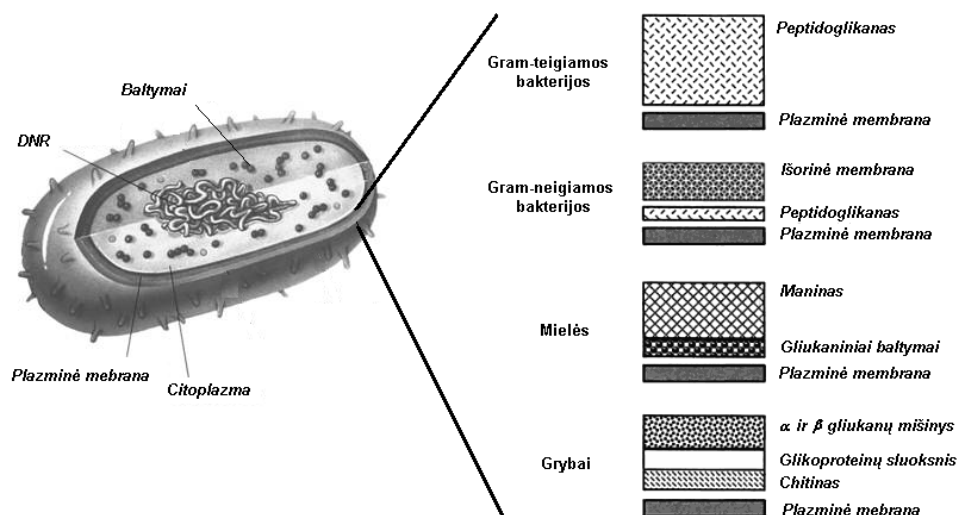
- 1) parinkti metodus *Neisseria denitrificans* ląstelių ardymo efektyvumui įvertinti;
- 2) parinkti ardymo metodus tiek laboratoriniams tiek gamybiniams ląstelių kiekiams ardyti;
- 3) sumodeliuoti analizuojamus procesus;
- 4) keičiant biologinius, konstrukcinius ir išorinius parametrus, optimizuoti *Neisseria denitrificans* ląstelių ardymo procesą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mikroorganizmų įvairovė ir ląstelės sienelės sudėtis

Pagal chemines ir fizines bakterijų ląstelių sienelių savybes išskiriamos *gram-teigiamų* ir *gram-neigiamų* bakterijų grupės. Gramo metodas (dažymas Gramo būdu) – tai bakterijų sienelių dažymo metodas, pagal kurį skirstomos bakterijos. Mikroorganizmai nudažomi iš pradžių kristaliniu violetu, vėliau praplaunami vandeniu ir pridedama Gramo jodo reagento, kuris sutvirtina dažus bakterijų ląstelių sienelėse. Gram-teigiamos bakterijos išlaiko pirminę dažo spalvą, o gram-neigiamos jos netenka. Antrasis dažas (naudojamas safraninas, fuksinas) naudojamas kaip vizualinis markeris: gram-teigiamos bakterijos išlaiko pradinio nudažymo spalvas ir neįsisavina antrojo dažo, todėl atrodo tamsiai violetinės; gram-neigiamos bakterijos bus nudažytos antrąja, rožine spalva. Metodo esmę sudaro skirtinga gram-teigiamos ir gram-neigiamos bakterijos sienelės reakcija į dažus. Dažant Gramo metodu, gram-teigiamas bakterijas dengiančiame storas peptidoglikano sluoksnyje vyksta dehidratacija ir kristalinis violetas „įstringa“ ląstelėje, o gram-neigiamose bakterijose dažas pradžioje ištirpdo riebalų sluoksnį, o plonas toliau esantis peptidoglikano sluoksnis nėra pajėgus sulaikyti dažus (Isenberg 1995).

Gram-neigiamų ir gram-teigiamų bakterijų sienelių sudėtis skiriasi (1 pav.). Gram-teigiamų bakterijų sienelės turi storą mukopeptido (peptidoglikano tinklas) sluoksnį, kuris bakterijų ląstelės sieniei suteikia formą ir tvirtumą bei apsaugo nuo citoplazmos osmosinio slėgio (Engler *et al.* 1981). Nustatyta, jog peptidoglikano tinklas taip pat dalyvauja bakterijų dauginimosi – dalijimosi procese (Collis *et al.* 1995). Peptidoglikanas yra sudarytas iš cukrų – N-acetilglukozamino, N-acetilmuramo rūgšties ir keleto amino rūgščių – L-alanino, D-alanino, D-glutamininės rūgšties ir lizino arba diaminopimelinės rūgšties (toliau – DAP). DAP jungiasi sudarydamos pasikartojančią struktūrą – glikano tetrapeptidą (Engler 1985). Peptidai sujungia cukrų grandines. Glikozilinės jungtys, jungiančios cukrus glikano grandinėse, yra labai stiprios, bet peptidoglikano stiprumas yra nulemtas amino rūgščių. Gram-neigiamose bakterijose šios jungtys susidaro jungiantis DAP amino grupei prie galinio D-alanino karboksilinės grupės. Gram-teigiamose sujungimas vyksta per peptidinį tiltą. Pvz. *Staphylococcus aureus* (gram-teigiama) kiekvienas „tilto“ peptidas sudarytas iš penkių glicino molekulių. Gram-teigiamos bakterijos dažnai turi keletą peptidoglikano sluoksnių sienelėje, Gram-neigiamose bakterijose tik 10% sienelės sudaro peptidoglikanas. Dėl šių sienelės skirtumų bakterijos skirtingai nusidažo Gramo metodu.



1 pav. Scheminis bakterijų ląstelės vaizdas ir apvalkalo skirtumai skirtingoms ląstelėms (Garcia 1999)

Gram-neigiamų bakterijų sienelė yra plonesnė nei gram-teigiamų, tačiau ji yra sudėtingesnė, tiek fizine konfigūracija, tiek molekuline sudėtimi (Sutherland, 1975). Lipopolisacharidai, lipoproteinai ir fosfolipidai išsidėstę išorinėje membranoje, o sienelės vidinis plonas sluoksnis sudarytas iš mukopetido be techninės rūgšties.

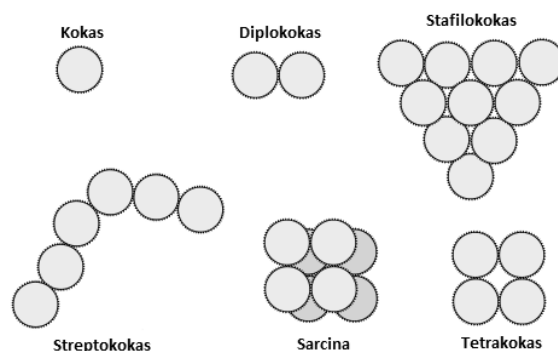
Svarbiausias ląstelės suardymo atsparumo faktorius yra peptidoglikano tinklas. Tinklo tvirtumas priklauso nuo peptido sąryšio su gliuko grandine dažnio, su kokiais peptidais sudaromos jungtys ir nuo cukrų sluoksnių kiekio (Engler, 1985). Didžiausi peptidoglikano struktūros pokyčiai įvyksta pereinant iš eksponentinės į stacionarią mikroorganizmo augimo fazę. Stacionarioje fazėje esančios bakterijos turi storesnį ir su didesniu polimerizacijos laipsniu polipeptidoklinano sluoksnį (Middelberg 1995), o tai sąlygoja didesnį mikroorganizmo atsparumą suardymui.

1.2. Ląstelės forma

Ląstelės forma yra svarbus kriterijus klasifikuojant bakterijas. Toks klasifikavimas taikomas nuo mikrobiologijos atsiradimo pradžios ir gerai atsispindi taksonomijoje - *Streptococcus* rūšis taip vadinama dėl savo sferinės formos, bacilos dėl savo lazdelės formos, o spirochetos dėl savo spiralinės formos. Bakterijos sienelė kartu su peptidoglikano sluoksniu yra svarbi formuojant ląstelės formą ir apsauganti nuo osmosinio slėgio. Ardant lazdelės formos ląsteles (*Escherichia coli*) lizocimu ar penicilinu, jos apvalėja ir didėja osmosinis jautris (Weibull *et al.* 1953; Lederberg *et al.* 1956). Paveikus ląsteles antibiotiku buvo gauti peptidoglikano siūlai, kurie turėjo nepažeistos *E.coli* ląstelės formą (Weidel *et al.* 1964; Weidel *et al.* 1960).

Istoriškai skiriamos keturios bakterijų formos, turinčios geometrinių skirtumų ir formai būdingų savybių. Kiekviena jų bus aptarta detaliau, kadangi geometriniai ląstelių skirtumai turi įtakos ląstelių atsparumui ardant (Lodish *et al.* 2007).

Rutulinės bakterijos (kokai) yra paprasčiausios geometrijos požiūriu. Jos sudarytos iš vienos apskritos ląstelės, retais atvejais jos yra pupos, inksto ar pusrutulio formos. Besidalydamos viena kryptimi, kai kurių rūšių rutulinės bakterijos neatsiskiria viena nuo kitos. Tokiu atveju susidaro porinė bakterija, vadinama diplokoku (pvz., *Azotobacter chroococcum*). Jei dviląstelė rutulinė bakterija toliau dalijasi ta pačia kryptimi ir naujos ląstelės viena nuo kitos neatsiskiria, gaunama daugialąstė grandinės formos kolonija, vadinama streptokoku (pvz., *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*). Kai ląstelės antrojo dalijimosi kryptis yra statmena pirmajai, susidaro ląstelių tetradą (tetrakokas). Jei tetrakoko formos bakterija dar skyla pusiau, bet jau yra statmena šiai keturių ląstelių plokštumai, tada susidaro aštuonių kokių „kubo“ formos kolonija, vadinama sarcina. Kiekviena sarcinos ląstelė dar gali panašiai dalytis trimis kryptimis ir toliau. Tuomet susidaro sudėtinga 16 arba 32 ląstelių sarcina, primenanti kokių ryšulėlį (*Sarcina lutea*). Kartais rutulinė bakterija dalijasi įvairiomis kryptimis, o susidariusios naujos ląstelės ne išsisklaido, bet lieka sukibusios. Tokia vynuogių kekės formos ląstelių grupė vadinama stafilokoku (2 pav.) (Lodish *et al.* 2007)



2 pav. Rutulinių bakterijų formos

Lazdelinės bakterijos (bacilos) savo forma yra šiek tiek įvairesnės, ypač skiriasi jų ilgis. Lazdelinės bakterijos kartais esti smailiais galais, lenktos ar šiek tiek šakotos. Kai kurios rūšys po dalijimosi lieka sukibusios. Dažnai kolonijose susidaro poromis sukibusios arba grandinės formos lazdelinės bakterijos (*Lactobacterium plantarum*) (Alberts *et al.* 2008).

Spiralinės bakterijos esti dar įvairesnės. Jos gali būti trumpos, panašios į kablelį (*Vibrio gentis*), „S“ raidės formos ir kt. Pasitaiko labai plonų ir vingiuotų bakterijų. Tai

spirochetų (*Spirochaeta pallidum* - sifilio sukėlėja) ir spirilų (*Spirillum*) bakterijos (Lodish *et al.* 2007; Alberts *et al.* 2008).

Iš siūlinių bakterijų tipiškiausios yra gelžbakterės ir sierabakterės, kurios yra daugialąstės ir didelės. Dirvožemyje ir mėšle yra labai plonų siūlinių vienaląsčių bakterijų. Tai vadinamieji aktinomicetai, anksčiau priskiriami grybų karalystei ir vadinami laibagrybiais. Tarp lazdelinių ir siūlinių bakterijų griežtos ribos nėra, nes kai kurios lazdelinės bakterijos dėl savotiškos prigimties ar dėl išorės sąlygų veikimo ištįsta iki labai ilgų siūlų (Lodish *et al.* 2007; Alberts *et al.* 2008).

Bakterijų ar mielių ląstelės sienelė priklauso nuo organizmo, augimo stadijos, taip pat nuo augimo temperatūros, panaudotų cheminių reagentų, augimo terpės komponentų ir savito augimo greičio (Middelberg 1995). Todėl prieš parenkant ardymo metodą ir nustatant specifinius parametrus labai svarbu žinoti ląstelės sienelės struktūrą.

1.3. Mechaninės ląstelių savybės

Bakterijų ląstelių apvalkalo skirtumai sąlygoja skirtingą ląstelių atsparumą ardymui. Vienų ląstelių sienelės sudaro ploni komplikotų polimerų sluoksniai, kitų – storas, tačiau sąlygiškai paprastesnis polimero sluoksnis, daug atsparesnis ardymui.

Ištyrus bakterijų sienelės tamprumą (Isaac *et al.* 1974) buvo parodyta, kad spiralinės bakterijos veikiant išorinėms jėgoms geba išsivynioti iki trys kartus didesnio ilgio, palyginti su pradiniu. *E. coli* buvo ištempta iki 2 kartus didesnio ilgio, nestebint deformacijos ar kitų pokyčių (Durieux *et al.* 2002). Vienintelių rutulinės formos gram-teigiamų *S. aureus* ląstelių atveju nebuvo stebimas tamprumas. Pastarieji rezultatai parodė, jog ląstelės sienelė yra anaipol netvirta ir netampri struktūra, ir gali prisitaikyti prie aplinkos veiksnių.

Thwaites pirmą kartą nustatė pirmuosius mechaninius ląstelės parametrus - stiprumą ir elastingumą. Bandant pavyko atrasti viskoelastinį bakterijų fenomeną, kai ląstelės yra veikiamos išorinės jėgos tam tikrą laiką be jokių pastebimų pokyčių. Tokiu būdu buvo atrastas naujasis mechaninių savybių tyrimo metodas, mikromanipuliacija. Pagrindiniai privalumai, palyginti su buvusiais metodais, yra darbas su tiksline ląstele ir platus aplinkos veiksnių tyrimo spektras (Durieux *et al.* 2002).

Mikromanipuliacijos metodas paremtas tradiciniu medžiagų atsparumo matavimo metodu, kuriuo remiantis ląstelė spaudžiama tarp dvejų optinių pluoštų, kol yra suardoma; jėgos matuoklis matuoja reikalingą jėgos kiekį. Pirmieji darbai buvo pradėti 1991 m. Zhango ir kt. pirmiausiai naudojant gyvūnų ir mielių ląsteles (Zhang *et al.* 1991). Tyrimais buvo įrodyta, jog

mikromanipuliacijos metodu galima išmatuoti įvairių ląstelių mechanines savybes, iš esmės nustatant ląstelės stiprumą suplėšant struktūrą. Nustatyta, jog ląstelių mechaninis stiprumas koreliuoja su ardymo įvairiais metodais duomenimis, pateiktais 1 lentelėje.

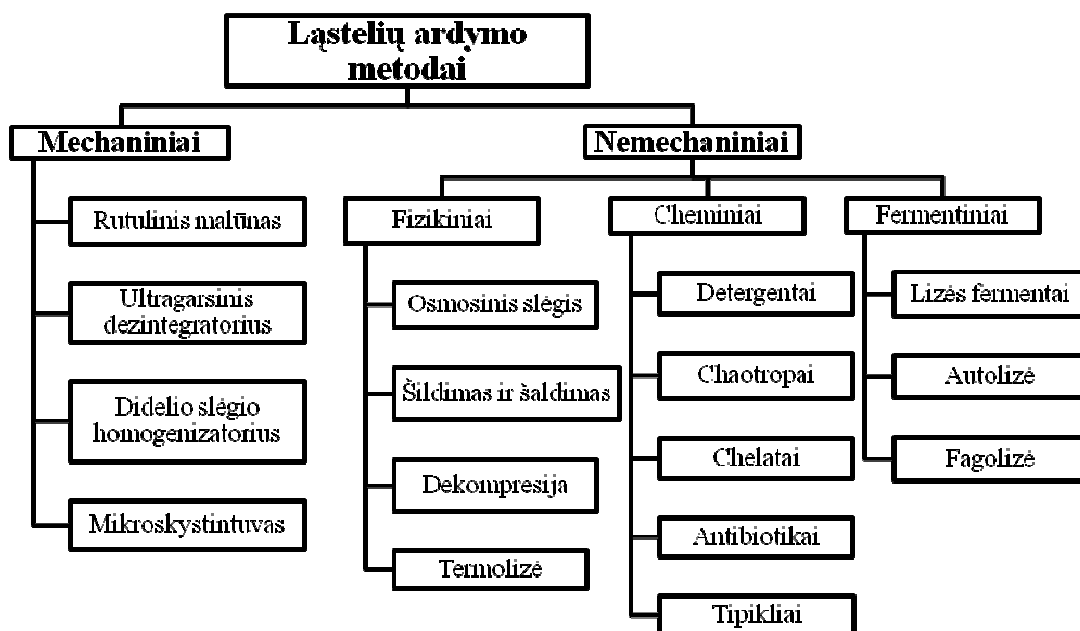
1 lentelė. Ląstelių suardomumas. Skalė nuo 1 iki 7; 1 - suardomos blogai, 7 - suardomos puikai (Durieux *et al.* 2002)

	Ardymas slėgiu	Ekstruzija	Malimas	UG
Gyvūnų ląstelės	7	7	7	7
Gram-neigiamos bacilos ir kokai	6	6	5	6
Gram-teigiamos bacilos	5	4	4	5
Mielės	4	2,5	3	3,5
Gram-teigiami kokai	3	2,5	2	3,5
Sporos	2	1	1	2
Grybų filamentai	1	5	6	1

Lentelėje matoma, jog sunkiausiai suardomi ląstelių tipai yra sporos, gram-teigiami kokai ir mielės, o gyvūnų ląsteles galima sėkmingai suardyti visais metodais. Tačiau lentelė yra nevienareišminška, nes net tos pačios formos ir gram rūšies mikroorganizmai auginti skirtingomis sąlygomis, skirtingai atsparūs suardymui. Skirtingas suardomumas tapo iššūkiu konstruoti skirtingos konfigūracijos prietaisus, kurių vieni sėkmingai ardo tam tikras ląsteles, kiti ne. Papildoma motyvacija tapo platus ląstelių panaudojimas, nuolat augantys ekonominiai rodikliai, kurie paskatino inžinierius sukurti daug ląstelių ardymo metodų.

1.4. Ląstelių ardymo metodai

Besirutuliojant ir tarpusavyje jungiantis skirtingoms mokslo šakoms, buvo sukurta daugybė ląstelių ardymo metodų. Vieni šių metodų naudojami išskirtinai pavienėse laboratorijose, o kiti yra plačiai paplitę. Dėl didelės metodų gausos skiriasi ir jų grupavimas, ardymo metodai gali būti skirstomi į (i) fizinius ir cheminius (ii) mechaninius ir nemechaninius ir kitus. Dažniau ląstelių ardymo metodai skirstomi į mechaninius ir nemechaninius, o detalus ląstelių ardymo metodų skirstymas pateiktas 3 paveiksle.



3 pav. Ląstelių ardymo metodų skirstymas (Harrison 1991)

3 pav. matoma, jog nemechaninių metodų grupei priskiriamos metodikos yra „švelnesnės“ ląstelės viduje esančioms biomolekulėms. Kadangi dažnai naudojami cheminiai reagentai ar fermentai negali patekti į ląstelės vidų, jų poveikyje ląstelės yra tik apardomos, t.y. sienelės atskiri komponentai yra suardomi, o kiti palaiko sienelės formą. Pagrindinė nemechaninių ardymo metodų paskirtimi laikoma ląstelės sienelės destrukcija arba sienelės pažeidimas, o mechaniniai metodai yra tikslingai naudojami ląstelės struktūros suardymui. Dėl žemo našumo nemechaniniai metodai retai naudojami pramonėje arba yra kombinuoti su mechaniniais, todėl darbe panagrinėti tik dažniausiai naudojami.

1.4.1. Nemechaniniai ardymo būdai

Šie metodai yra silpno poveikio, tačiau ardymo proceso metu galima kontroliuoti ląstelių suardymo lygį, keičiant reagentų koncentracijas, temperatūrą ir pan. Ardymas pagrįstas žiniomis apie ląstelių sienelių struktūrą. Kiekvienas metodas selektyviai veikia tam tikrus ląstelės sienelės komponentus. Nemechaniniai ardymo metodai daugiausiai naudojami gram-neigiamoms bakterijoms.

Fizikiniai ardymo metodai

Osmosinis šokas. Tai yra švelnus ardymo metodas. Augalų ir gyvūnų ląstelės bei kai kurios gram-neigiamos bakterijos gali būti ardamos osmosiniu šoku. Šiuo metodu ląstelės dažniausiai visiškai nesuardomos. Po tokio ardymo į terpę patenka tik nedidelė dalis

viduląstelinių komponentų, todėl gryninamą baltymą lengviau išgryninti. Pvz.: hemoglobinas sudaro 90% osmosiniu šoku suardytų eritrocitų ekstrakto baltymų. Gram-teigiamos bakterijos dėl storo peptidoglikano sluoksnio yra atsparios osmosiniam šokui (Harris *et al.* 1989).

Užšaldymas – atšildymas. Pakartotinis užšaldymo ir atšildymo procesas pažeidžia kai kurių bakterijų ir eukariotų ląstelių membranas. Ledo kristalai užima didesnę tūrį negu vandeninis tirpalas, todėl ardo ląstelių sienelės. Taip išlaisvinami periplazminiai ir viduląsteliniai baltymai. Ląstelių suardymas priklauso nuo jų amžiaus, užšaldymo temperatūros, atšildymo greičio. Tai ilgai trunkantis ardymo metodas, be to, fermentai, kurie yra labilūs šalčiui, gali inaktyvuotis (Harris *et al.* 1989).

Kiti rečiau naudojami ardymo metodai yra dekompresija ir termolizė.

Cheminiai ardymo metodai

Cheminiai junginiai gali pažeisti arba net suardyti ląstelės sienelę. Šie metodai pagrįsti įvairių tarpmolekulinių ir vidinių jungčių tarp ląstelės sienelės struktūrinių komponentų suardymo.

Detergentai. Paviršiaus aktyvumo medžiagos (toliau - PAM) - Triton X-100, NaDS suardo išorinės membranos lipidinių komponentų struktūrą. Jų poveikis priklauso nuo PAM koncentracijos, pH ir temperatūros. Detergentai skirstomi į nejoninius (Triton X-100) ir joninius agentus (NaDS). Nejoninių detergentų poveikis baltymams yra silpnas, o joniniai agentai denatūroja baltymus. Didžiausias PAM panaudojimo trūkumas yra putojimas ir baltymų denatūracija. Dažnai naudojama kartu su EDTA (Harris *et al.* 1989; Middelberg 1995).

Detergento struktūroje esanti „uodega“ yra hidrofobinė, paprastai sudaryta iš linijinių arba šakotų angliavandenių, o hidrofilinė galva gali būti sudaryta iš skirtingų cheminių grupių. Svarbi detergentų savybė yra micelių formavimas. Micelėmis vadinami detergentų molekulių sankaupos, kuriose detergentų hidrofiliniai struktūros komponentai yra orientuoti į micelės išorę, o hidrofobiniai – į vidų. Po ląstelės suardymo membraniniai baltymai sudaro bendrą micelę su detergentu, kuris apsaugo hidrofobinį (arba transmembraninį) baltymo domeną nuo sąveikos su vandeniu, atitinkamai sudarydamas sąlygas baltymui tirpti. Kritinė micelių koncentracija yra vienas pagrindinių detergentų parametrų, kuris parodo mažiausią detergento koncentraciją, kuriai esant yra sudaromos micelės. Kiti svarbus parametrai, aprašantys detergentų būseną, yra agregacijos skaičius, kritinė micelių temperatūra ir hidrofilo - lipofilo santykis (Ahmed 2005).

Chaotropiniai agentai. Guanidino hidrochloridas arba karbamidas susilpnina sąveiką tarp hidrofobinių ląstelės sienelės komponentų ir tirpina membranoje integruotus baltymus, suardo vandenilines jungtis. Didelės chaotropinių agentų koncentracijos riboja jų

panaudojimą gamybiniuose ardymuose. Šios medžiagos taip pat denatūruoja baltymus. Efektyvumas padidėja veikiant kartu su toluenu (Gaciova *et al.* 2002; Middelberg 1995).

Chelatuojantys agentai. Gram-teigiamų bakterijų išorinę membrana stabilizuoja divalenčiai katijonai (Mg^{2+} , Ca^{2+}), kurie tarpusavyje suriša lipopolisacharidinius membranos fragmentus. Su chelatuojančiais agentais (EDTA) surišus katijonus, pašalinamas polisacharidinis sluoksnis (Gaciova *et al.* 2002).

Rečiau suardymui naudojami antibiotikai ar tirpikliai (Gaciova *et al.* 2002).

Fermentiniai metodai

Lizės fermentai. Fermentinis ląstelių ardymas yra labai švelnus ir selektyvus metodas. Ardant šiuo metodu, galima kontroliuoti ląstelių suardymo lygį. Didžiausias trūkumas yra didelė fermentų kaina, kuri ir apriboja platesnį šio metodo panaudojimą.

Ardymui dažniausiai naudojamas lizocimas. Pramoniniu būdu gaunamas iš vištų kiaušinių ar išskiriamas bakterijų, todėl yra pakankamai pigus. Jis hidrolizuoja peptidoglikanų β -1,4-glikozidinę jungtį, dėl to efektyviai ardo gram-teigiamų ląstelių sienelę. Lizocimas kombinuojamas su kitais agentais, kurie ardo išorinę membraną (EDTA) ir palengvina fermento priėjimą prie peptidoglikano sluoksnio. Lizocimas dažnai naudojamas ląstelių apdorojimui prieš jų ardymą osmosinių šoku ar mechaniniais būdais (Harris *et al.* 1989).

Gram-neigiamos bakterijos, turinčios išorinę membrana, dėl apsauginio asimetrinio lipidų bisluoksnio yra žymiai atsparesnės cheminei lizei. Išorinė membrana neleidžia cheminiams junginiams pasiekti peptidoglikano sluoksnį, arba prieš tai turi būti permeabilizuota. Kadangi pagrindiniai, barjerą sudarantys komponentai yra polijoniniai lipopolisacharidai, susijungę į agregatą, dalyvaujant divalenčiams katijonams, Mg^{2+} , todėl chelatai (EDTA), polikatijoninės arba mažos katijoninės molekulės (Tris) yra naudojamos pralaidumui padidinti (Ahmed 2005).

1.4.2. Mechaniniai ardymo metodai

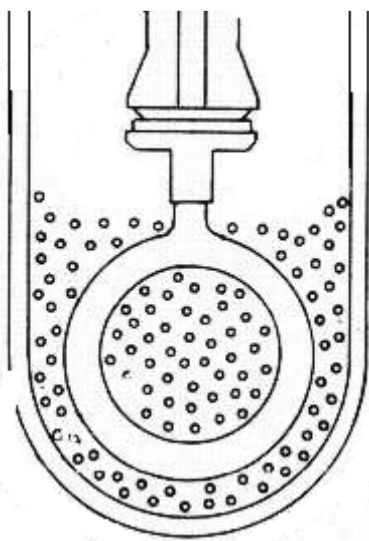
Mechaniniai ląstelių ardymo metodai daugiausiai naudojami dideliems ląstelių kiekiams ardyti. Naudojant šiuos metodus galima ardyti ląsteles nenutrūkstamu režimu, jie yra universalūs, komerciškai prieinami, jų aukštas efektyvumas, proceso atsikartojamumas, galimybė procesą automatizuoti. Mechaniniai ardymo metodai suardo ląstelių sienelės ir membranos struktūrą dėl: ląstelių trinties esant dideliame skysčio srautui, „sprogimo“ esant dideliems slėgio skirtumams tarp ląstelės išorės ir vidaus, susidūrimo su greitai judančiomis

kietomis dalelėmis arba prietaiso mentelėmis ar šių jėgų įvairių kombinacijų. Kadangi įvykus šioms sąveikoms, 90% energijos virsta šiluma, todėl ardoma suspensija turi būti šaldoma, kad neįvyktų biomolekulių denatūracija. Taip pat mechaniniai metodai yra neselektyvūs: jei tikslinis produktas yra tarpmembraninis baltymas, tai ardant į terpę patenka ir citoplazminiai.

Mechaniniai ardymo metodai ardo bet kurios rūšies ląsteles (miesles, bakterijas, grybus ir t.t.), skiriasi tik suardymo efektyvumas. Plačiau bus aptarti gamyboje ir laboratorijoje dažniausiai naudojami mechaniniai ardymo metodai.

Rutulinis malūnas

Rutulinis malūnas ląstelių ardymui naudojamas tiek laboratorijoje tiek gamyboje. Dėl savo paprastos konstrukcijos ir didelio efektyvumo suardo daugelį mikroorganizmų. Yra įvairių konstrukcijų, bet bazinė sudėtis nekinta: darbinė kamera su dvigubomis sienelėmis, tarp kurių cirkuliuoja šaldymo agentas, viduje besisukantis velenas, suteikiantis kinetinės energijos rutuliukams (4 pav.), kurie tarp savęs sutrina ląsteles (Middelberg 1995; Chisti *et al.* 1986). Rutuliukų dydis ir užpildo kiekis labai svarbūs suardymo efektyvumo parametrai. Suardymo laipsnis priklauso nuo užpildo kiekio, nes padidėja susidūrimų dažnis. Optimaliausias užpildo kiekis yra 80 - 85%, nes daugiau suardymo efektyvumas nedidėja (Kula *et al.* 1987).



4 pav. Rutulinio malūno veikimo principinė schema

Norint pasiekti didesnę efektyvumą gaunant citoplazmoje esančius baltymus, naudojami mažesnio skersmens rutuliukai, o ląstelės viduje esantiems bioproduktams gauti naudojami didesni stikliniai rutuliukai, nes visiškas ląstelės suardymas ne tik kad nereikalingas, bet net ir nepageidaujamas (Shutte *et al.* 1983). 0,10-0,15 mM skersmens rutuliukai naudojami bakterijų ardymui, o 0,25-0,75 mM rutuliukais ardamos mielės. Gamybiniuose ardymuose naudojami didesni rutuliukai, nes taip lengviau

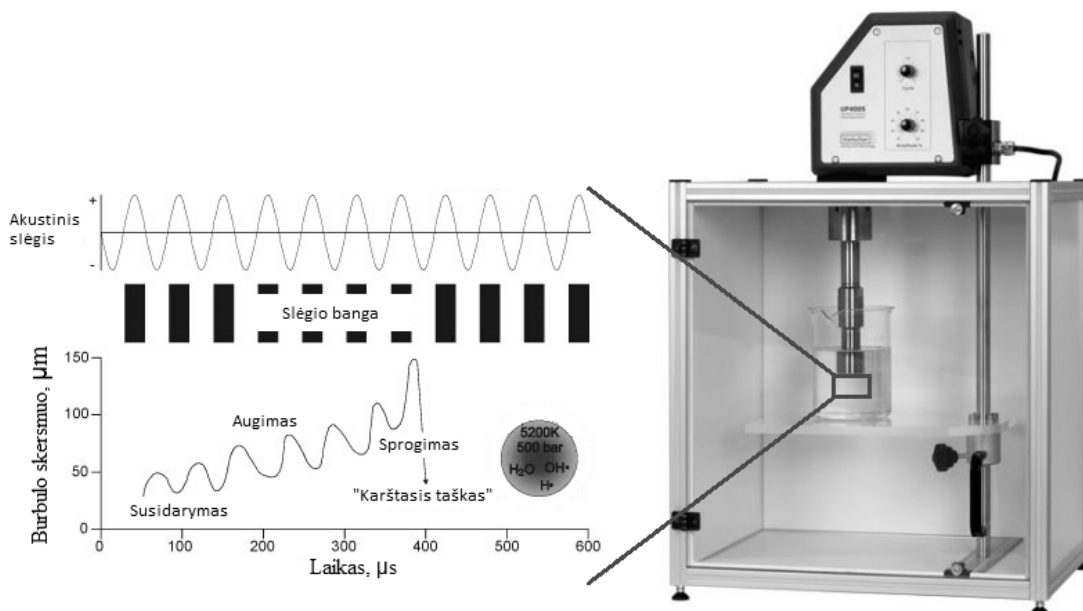
atskiriami nuo ląstelių suspensijos (Kula *et al.* 1987). Padidinus rotorius apskuk greitį, padidėja ardymo efektyvumas, bet tuo pačiu ir energijos sąnaudos bei išsiskiriančios šilumos kiekis. Norint suardyti mažas ląsteles reikia didesnių greičių. Mielėms reikia 8 m/s, o bakterijoms rekomenduojamas ne mažesnis nei 10 m/s (Kula *et al.* 1987). Taip pat reikalinga didelė ląstelių koncentracija (40-50% šlapio svorio), norint pasiekti didelį suardymo efektyvumą (Middelberg 1995).

Rutulinis malūnas daug efektyviau ardo mieles nei bakterijas, kadangi bakterijos yra maždaug dešimt kartų mažesnės. Tačiau lazdelės formos bakterijos ardamos daug efektyviau nei rutulinės bakterijos dėl didesnės susidūrimo su rutuliukais tikimybės (Middelberg 1995).

Kuo ląstelė ilgiau išbūna kameroje, tuo didesnė tikimybė, kad ji bus suardyta, tačiau pailgintas laikas turės neigiamos įtakos tiksliniam produktui.

Ultragarsinis dezintegratorius

Ardymas ultragarsiniu dezintegratoriumi (toliau - UG) yra vienas iš labiausiai paplitusių metodų laboratorijose (Engler, 1985). Mikroorganizmai ardomi 20 kHz dažniu. Ultragarso bangos pasiekia tirpalą per titaninį ardymo strypą. Tirpalu sklindantį ultragarso banga skirtingose tirpalo vietose sudaro slėgio gradientą. Atsirandantys slėgių gradientai veikia oro burbulų formavimąsi, kuriems pasiekus kritinį dydį įvyksta sproginimas. Procesą, vadinama kavitacija, sudaro 3 etapai: (i) dujų (oro dažniausiai) burbulo formavimasis, (ii) burbulo augimas ir (iii) burbulo sproginimas (5 pav.). Ląstelių ardantys mechaniniai veiksniai gali susidaryti įvairiu kavitacijos etapo metu: (i) greito burbulo augimo metu susidaro greičio gradientai, kurie gali ardyti ląsteles, tačiau pagrindinė ardymo jėga laikoma (ii) mechaninė energija, skleidžiama elastinių bangų pavidalu sproginus burbului. Didelis slėgis ir sklindanti smūgio banga suardo ląsteles (5 pav.) (Doulah 1977). Lokaliuose vietose susidaro 50 MPa slėgis, o temperatūra pakyla iki 5000 °C. Ardymas vyksta mažame atstume nuo ardymo strypo, todėl norint pasiekti didesnį suardymo efektyvumą, būtina po kiekvieno ciklo maišyti.



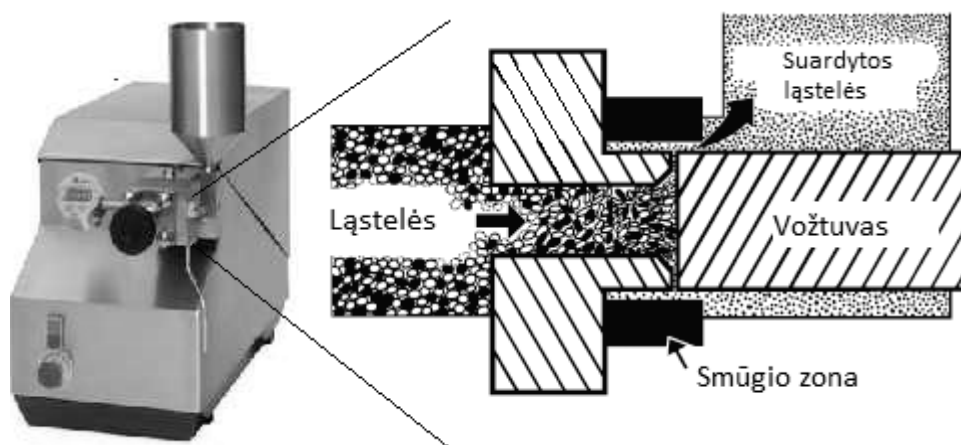
5 pav. Akustinio slėgio ir kavitacijos ryšys ultragarsui sklindant tirpale

Ląstelių sienelės suyra dėl susidariusių lokalių slėgių skirtumų. Ardymo efektyvumas priklauso nuo buferinio tirpalo, pH, akustinės galios ir mėginio tūrio (Feliu *et al.* 1998). Ardant

UG būtina reguliuoti temperatūrą ir užtikrinti maišymą. Metodas lengvai valdomas, greitai paruošiamas. Ardymo metu ΔT siekia iki 4 °C per vieną ardymo minutę, todėl ypatingas dėmesys turi būti skirtas šaldymo sistemai. Dėl stipriai generuojamos šilumos ultragarsinis dezintegratorius retai naudojamas ardant gamybiniu būdu.

Didelio slėgio homogenizatorius

Pagrindiniai parametrai, lemiantys suardymo efektyvumą, yra naudojamas slėgis ir pasažų skaičius (Engler 1985), suspensijos temperatūra (Hetherington *et al.* 1971) ir ardymo celės konstrukcija (Keshavarz-Moore *et al.* 1990). Slėginiuose ardymo prietaisuose suspenduotų ląstelių tirpalas, esant dideliame slėgiui, spaudžiamas fiksuoto dydžio kanalu arba pro mažą angą, sudarytą specialios konstrukcijos vožtuvu. Sumažintoje erdvėje ląstelės yra dar labiau pagreitinamos ir veikiamos tarpusavio susidūrimo bei šlyties jėgų. Ląstelės ardamos naudojant 55-200 MPa slėgį.



6 pav. Didelio slėgio homogenizatorius APV – 2000

Labiausiai paplitęs yra Mantono ir Gaulino APV homogenizatoriaus tipas (Middelberg 1995). Ląstelių suspensija pumpuojama pastoviu greičiu, o slėgis reguliuojamas keičiant atstumą tarp vožtuvo (6 pav.). Kas 10 MPa temperatūra pakyla apie 2 °C, todėl suspensija būtina šaldyti. Labai stipri priklausomybė nuo slėgio. Ardant didesniu slėgiu galima sumažinti pasažų skaičių. Tačiau dėl šilumos išsiskyrimo gali denatūruoti baltymai, todėl turi būti parinktas optimalus darbinio slėgio ir pasažų skaičiaus santykis (Kula *et al.* 1987). Po 3-5 pasažų dažniausiai suardoma 90% ląstelių, tačiau tai labai priklauso nuo ląstelių tipo. Suardymo efektyvumas taip pat priklauso ir nuo ląstelių koncentracijos (Engler 1985)

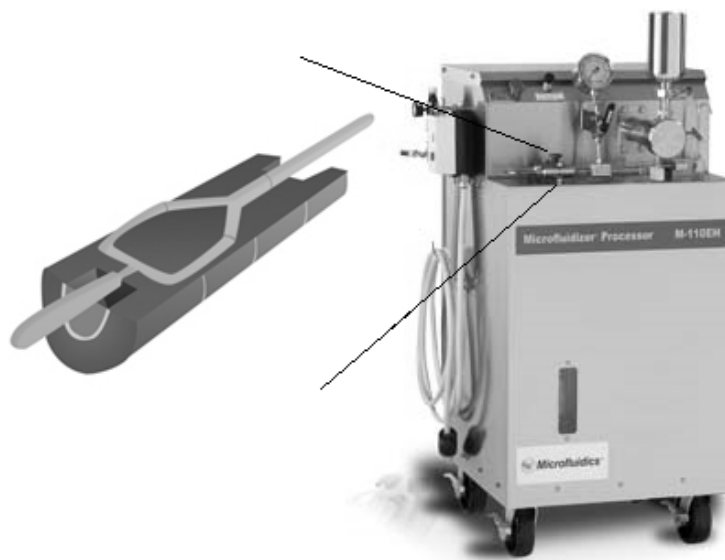
Pirmaisiais pasažais ląstelės yra pažeidžiamos arba suardomos į kelias dalis, tačiau didėjant pasažų skaičiui, ląstelės suardomos į vis smulkesnes daleles. Tai gali apsunkinti kitą

baltymų gryninimo etapą - ląstelių skaidrinimą: mikrofiltruojant blokuojama membrana, o centrifuguojant blogesni sedimentacijos parametrai (Baldwin *et al.* 1990).

APV dažniausiai naudojamas mechaninis ardymo metodas biotechnologijos pramonėje, nes galima ardyti nuo kelių šimtų mililitrų iki keliasdešimt litrų suspensijos. Didžiausias trūkumas šilumos išsiskyrimas, todėl reikalinga gera šaldymo sistema.

Didelio slėgio homogenizatorius - mikroskystintuvas

Mikroskystintuve (toliau – MS) prietaise ląstelių ardymas realizuojamas dideliu greičiu ir plonais kapiliarais pumpuojamus ląstelių srautus nukreipiant vienas į kitą. Tokiu būdu ląstelės ardomos dėl dvejų pagrindinių jėgų: (i) trinties ir (ii) smūginės. Kaip ir APV prietaise ląstelės papildomai veikiamos kavitacijos jėgos, kadangi iš ardymo celės ląstelės patenka į atmosferinio slėgio ruožą. Slėgis reguliuojamas keičiant siurblio greitį. Ląstelės ardymo celėje yra tik 25-40 ms, tačiau suspensijos temperatūra padidėja. Ląstelių suardymas priklauso nuo slėgio ir pasažų skaičiaus. Taip pat labai svarbūs faktoriai yra ląstelių koncentracija, mikroorganizmo rūšis, ląstelių auginimo terpė ir augimo stadija. Dažniausiai naudojama Y tipo ardymo celė, kurioje srautas dviem kanalais paskirstomas į du atskirus srautus, kurie celės gale sueina į vieną (7 pav.). Taip pat populiari Z tipo ardymo celė, kurioje suspensija neatskiriama, tačiau yra daugiau smūginių taškų. Komerciškai prieinamų kanalų skersmuo varijuoja 50–300 μm , kuriuose srauto greitis pasiekia iki 400 m/s. Po suardymo produktas būtinai turi būti atšaldytas ir tam naudojamas šaldalu šaldomas šilumokaitis.



7 pav. Mikroskystintuvas MH-110EH-30 su Y ardymo tipo celė

Svarbus parametras yra po suardymo gautų dalelių dydis. Ardant APV gaunamas skirtingo dydžio dalelės, o suardžius MS gautos dalelės yra pakankamai monodispersiškos, todėl šis metodas labiau tinka gamybos gausinimui (Geciova *et al.* 2002).

1.5. Ardymo metodų palyginimas

Ardymo metodai parenkami atsižvelgiant į ląstelės tipą, ląstelių kiekį, specifinį produktą ir jo lokalizaciją ląstelėje. Išanalizuotų literatūros šaltinių analizės suvestinė pateikta 2 lentelėje.

2 lentelė. Ardymo metodų palyginimas

Ląstelės	Metodai	Analizuojamasis produktas	Apibendrinimas
<i>E. coli</i>	UG, RM su stikliniais rutuliukais	Visi baltymai ir fruktozės transferazė	Po RM buvo didžiausias santykinis fermentinis aktyvumas (Song <i>et al.</i> 1997)
<i>C. perfringens</i>	NaOH-SDS, French presas, UG, fermentai	Visi baltymai	Mechaniniai metodai ardė efektyviau nei cheminiai (Guerlava <i>et al.</i> 1998)
<i>S. cerevisiae</i>	UG, DSH	Visi baltymai ir invertazė	UG – mažas santykinis aktyvumas, DSH – didelis invertazės aktyvumas, bet ir padidėjusi bendra baltymų koncentracija (Balasundaram <i>et al.</i> 2001)
<i>L. bulgaricus</i>	UG, DSH, RM	β -galaktozidazė	Po UG prastesni rezultatai nei po RM ir DSH. Po UG liko tik 30% fermento aktyvumo pagal kitus metodus (Bury <i>et al.</i> 2001)
<i>E. coli</i>	RM, šaldymas-šildymas, French presas, UG	Visi baltymai ir keletas fermentų	Mechaniniai metodai parodo geresnius rezultatus nei šaldymas ir šildymas. RM patogiausias metodas (Benov <i>et al.</i> 2002)
<i>Mycobacteria</i>	UG, RM	Proteominė analizė ir baltymai	Abiejų metodų panašūs rezultatai, Ardant RM buvo padidėjęs putojimas (Lanigan <i>et al.</i> 2004)
<i>P. putida</i>	Fermentai, DSH	Polisacharidai ir integruoti baltymai	Geresni rezultatai ardant fermentiniu metodu (Van Hee <i>et al.</i> 2004)
<i>E.coli</i>	UG, DSH, French presas, osmosinis šokas, EDTA lizė	Visi baltymai, rūgštinė fosfatazė ir β -galaktozidazė	UG ardė efektyviausiai ir buvo labai selektyvus fermentams, bet po osmosinio šoko išsiskyrė daugiau rūgštinės fosfatazės (Balasundaram

<i>et al. 2006)</i>			
<i>E. coli</i>	Fermentai, UG	Visi baltymai ir hepatito B antigenai	UG specifinio baltymo gauta 22 kartus daugiau (Ho <i>et al.</i> 2006)
<i>M. lysodeikticus</i>	Imobilizuoti lizozimai, UG, DSH, RM	Visi baltymai	Geriausiai suardė imobilizuotas lizocimas, bet pakartojus efektyvumas sumažėjo 70% (Chang <i>et al.</i> 2007)
<i>S. pristinaespiralis</i>	Liofilizavimas, RM su/be 4 fermentų kombinacija	Fosfolipidai	Efektyviausiai suardyta panaudojant liofilizavimą (Limonet <i>et al.</i> 2007)
<i>E. coli</i>	Termolizė, UG, cheminis ardymas	Visi baltymai ir esterazė	Didžiausia baltymų koncentracija po UG, bet termolizė buvo selektyvesnė esterazei (91% daugiau fermento) (Rene <i>et al.</i> 2007)

Išanalizavus turima literatūrą, galima daryti išvadas, jog populiariausi mechaniniai ardymo metodai yra UG ir RM. Jie labiausiai tinkami mažiems biomasės kiekiams ardyti, yra komerciškai prieinami. Iš didelio slėgio ardymo metodų dažniausiai naudojamas APV.

Kaip modelinės ląstelės dažniausiai naudojamos *Escherichia coli* ir *Saccharomyces cerevisiae*. Tai yra populiariausi prokariotų ir eukariotų atstovai. Ląstelės lengvai užauginamos, taip pat *E.coli* dažnai naudojamas kaip rekombinantinis kamienas ir nepasižymi atsparumu suardymui, todėl eksperimentai trumpai užtrunka.

1.6. Ląstelių ardymo optimizavimas

Iš literatūros apžvalgos matyti, kad ląstelių suardymas labai priklauso nuo auginimo sąlygų ir kamieno sienelės mechaninių savybių, todėl siekiant specifinį produktą gauti kuo stabilesnį ir kuo mažesnėmis sąnaudomis, būtina ardymo procesą optimizuoti. Ardymo optimizavimo darbų analizė pateikta 3 lentelėje.

3 lentelė. Ardymo optimizavimo darbų palyginimas

Biomasė	Prietaisas	Faktoriai
<i>S. cerevisiae</i>	RM	Apsukų greitis, užpildo tūris, ląstelių koncentracija (Ricci-Silva <i>et al.</i> 2000)
<i>E. coli</i>	APV	Slėgis, ląstelių koncentracija, pasažų skaičius (Ramanan <i>et al.</i> 2009)
<i>K. lactis</i>	UG	pH,brinkinimo trukmė, ardymo trukmė (Farkade <i>et al.</i> 2006)

<i>E. coli</i>	APV	Detergentų, chaotropų, chelatinių agentų koncentracija, brinkinimo trukmė (Anand <i>et al.</i> 2007)
<i>S. cerevisiae</i>	APV + elektroporuliacija	Įtampa, slėgis (Shynkaryk <i>et al.</i> 2009)
<i>S. cerevisiae</i>	APV	Slėgis, ląstelių koncentracija, pasažų skaičius (Moore <i>et al.</i> 1990)
<i>A. peroxydans</i>	UG	pH, ardymo trukmė, hercai (Kapucu <i>et al.</i> 2000)
<i>S. cerevisiae</i>	UG	Ardymo trukmė, hercai (James <i>et al.</i> 1972)
<i>E. coli</i>	UG	Joninė jėga, ląstelių koncentracija, mėginio tūris, hercai (Feliu <i>et al.</i> 1998)

Didžioji dalis ardymo optimizacijos darbų atlikta keičiant mechaninius faktorius: ardymo trukmę, rutuliukų dydį, dažnį, slėgį, pasažų skaičių, o ląstelių koncentracija yra dažniausiai keičiamas išorinis faktorius.

Eksperimentinių tyrimų metu ieškomas ryšys tarp faktorių, veikiančių į objektą (ląstelę) ir dydžių, kurie charakterizuoja objekto savybes. Eksperimentiškai nustatyti ryšiai išreiškiami kiekybine forma, t.y. sudaromas objekto matematinis modelis, kuris vėliau panaudojamas kaip instrumentas optimizavimo sprendimui. Faktorinio eksperimento vienas pagrindinių privalumų – eksperimentų skaičiaus sumažinimas, palyginus su tradiciniu. Atliekant eksperimentą su 2 faktoriais, vietoj 9 matavimų užtenka atlikti 5, t.y. matuojamos kraštinės reikšmės ir vienas centrinis taškas. Pats metodas yra labai efektyvus, dažnai naudojamas biotechnologijoje norint sumažinti eksperimentų skaičių kiekvienoje gamybos stadijoje nuo fermentacijos iki galutinio produkto formulavimo. Tačiau literatūroje randama tik keletas darbų pritaikant faktorinį eksperimentų planavimą ląstelių ardymo stadijoje (4 lentelė).

4 lentelė. Ardymo eksperimentų, taikant faktorinį eksperimentų planavimą, palyginimas

Biomasė	Prietaisas	Faktoriai
<i>C. mogii</i>	RM	Rutuliukų skersmuo, ląstelių koncentracija, sukimo dažnis (Mayerhoff <i>et al.</i> 2008)
<i>C. guilliermondii</i>	RM	Ardymo trukmė, ląstelių koncentracija (Gurpilhares <i>et al.</i> 2006)
<i>P. rhodozyma</i>	Rūgštinė hidrolizė	Rūgšties koncentracija, inkubacijos trukmė, temperatūra, etanolio koncentracija, ekstrakcijos trukmė (Ni <i>et al.</i> 2008)
<i>E. coli</i>	RM	Ardymo trukmė, rutuliukų dydis, koncentracija, detergentų koncentracija (Belo <i>et al.</i> 1996)
<i>S. cerevisiae</i>	RM	Apsukų greitis, pasažų skaičius, ląstelių koncentracija (van Gaver <i>et al.</i> 1991)

Visi faktorinio eksperimento mechaninio ardymo darbai atlikti naudojant rutulinį malūną, ardyti maži ląstelių kiekiai, todėl rezultatus sunku pritaikyti gamyboje.

1.7. Tyrimo objektas

Tyrimo objektas yra *Neisseria denitrificans*. *Neisseria* yra gram-neigiama, rutulinė bakterija, kuri gali būti tiek simbiotinė, tiek patogeninė. Iš visų *Neisseria* rūšių tik dvi yra patogeninės (*gonorrhea* ir *meningitis*), bet jos visos gali būti žmogaus ar gyvūno gerklėje nesukeldamos simptomų. *Neisseria denitrificans* izoliuota iš jūrų kiaulytės burnos gleivinės ir taip pavadinta, dėl savo sugebėjimo redukuoti azotą iki dujinio (Butcher *et al.* 1999). Ji taip pat yra atspari antibiotikams (Mackenzie *et al.* 1980).

Neisseria denitrificans bakterijose yra dvi II tipo restrikcijos endonukleazės: NdeI (atpažįsta 5'-CA↓TATG-3') ir NdeII (atpažįsta 5'-↓GATC-3') (Watson *et al.* 1982). Tai yra pagrindiniai bioproduktai, dėl kurių dirbama su šia biomase. Tačiau kaip objektas, *Neisseria* buvo pasirinkta kaip dažniausiai biotechnologijoje naudojamo tipo (gram neigiamas kokas) bakterija pasižyminti atsparumu suardymui (5 lentelė).

5 lentelė. Optimalūs ardymo slėgiai įvairioms <i>Neisseria</i> rūšims (Martin <i>et al.</i> 1968)	
Ląstelės	Optimalus ardymo slėgis, MPa
<i>N. gonorrhoeae</i> F62, tipas 4	50
<i>N. gonorrhoeae</i> F62, tipas 3	70
<i>N. gonorrhoeae</i> F62, tipas 4	80
<i>N. gonorrhoeae</i> F62, tipas 1	80
<i>N. meningitis</i> grupė B	125
<i>N. sicca</i>	150
<i>N. flava</i>	150
<i>N. catarrhalis</i>	150
<i>E. coli</i>	80 (Ahmad-Raus <i>et al.</i> 2010)
<i>C. utilis</i>	95 (Baldwin <i>et al.</i> 1994)
<i>S. cerevisiae</i>	150 (Harrison 1991)

Slėgių skirtumas 50-150 MPa yra nulemtas *Neisseria* ląstelės sienelės skirtumų.

Objektas, *Neisseria denitrificans*, yra mažai tyrinėtas ir modeliuojant svarbu pasirinkti sunkiai ardomą mikroorganizmą. Su šiomis ląstelėmis dar nėra atlikti jokie ardymo tyrimo darbai. Manoma, jog suradus šio mikroorganizmo suardymą lemančius faktorius, jie bus pritaikomi ir kitoms, sunkiau ar lengviau suardomoms bakterijoms.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Aparatūra

Ultragarsinis ląstelių disintegratorius (Sonics&Materials inc. Vibra Cell), didelio slėgio homogenizatorius (APV, LAB 2000), mikroskystintuvas (MicroFluidics), rutulinis malūnas (Chromoform AB), centrifuga (Eppendorf Centrifuge 4517R), centrifuga (Beckman J2-21), DNR elektroforezės horizontalūs aparatai (Thermo Fisher Scientific), techninės svarstyklės (0,5-4100 g) (Kern), analitinės svarstyklės (0,01-120 g) (Kern), spektrofotometras (Ultraspec 2100 Pro), mikroskopas (Leica), homogenizatorius (Ultra-Turrax T25), spektrofotometras (Multi Bio RS-24), magnetinė maišyklė (Mandel), automatinės pipetės (Gilson), magnetinė maišyklė (Mandel), pH-metras (Consort C 833), dalelių dydžio matuoklis (Zetasizer Nano S), chromatografinė sistema (Akta Explorer).

2.2. Medžiagos

Restrikcijos endonukleazės NdeI [10 vnt/μl] (Thermo Fisher Scientific), Bsp143I (*Sau3AI*) [10 vnt/μl] (Thermo Fisher Scientific), restrikcijos endonukleazių reakcijos buferinis tirpalas *Orange* (Thermo Fisher scientific), fago DNR M13mp18 [0,5 vnt/μl] (Thermo Fisher Scientific), lambda DNR [0,3 vnt/μl] (Thermo Fisher Scientific), TopVision™ LM GQ Agarose, natrio hidroksidas (Applichem), orto-fosforo rūgštis 85% (Merck), fenolis (Merck), kalio hidroksidas (Roth), koncentruota sieros rūgštis (Merck), gliukozė (Merck), acto rūgštis 100% (Merck), perchlorato rūgštis 70% (Merck), Kumasi Brilliantinis Mėlis (Thermo Fisher Scientific), boro rūgštis 100% (Merck), natrio dodecilsulfatas (SDS) (Amresco), etilendiaminotetraacto rūgštis (EDTA) (Amresco), etidžio bromidas (Calbiochem), imersinė alyva (Fluka), fuksinas (Hispanlab, S.A.), etanolis (AB „Vilniaus degtinė“), JSA (Thermo Fisher Scientific), (D-gliukozės-6-fosfatas (Applichem), nikotinamido adenino dinukleotidas (NAD) (Applichem), DTT (Thermo Fisher Scientific), lizocimas (Amresco), DNAzė (Thermo Fisher Scientific), Tris (hidroksimetil) aminometanas (TRIS) (Sigma), tirpalų ruošimui naudojamas „Milli-Q“ vanduo (Thermo Fisher Scientific).

Sorbentai : fosfo celiuliozė P11 (Whatman), dietilaminoetil celiuliozė DE52 (Whatman).

2.3. Tirpalai ir buferiniai tirpalai

Buferinių tirpalų sudėtis:

Buferinis tirpalas A (ardymo): 10 mM kalio fosfatas + 10 mM acetatinis + 10 mM boratinis + 1 mM EDTA + 1 mM DTT + 50 mM NaCl, pH 7.4;

Buferinis tirpalas B: 10 mM kalio fosfatas + 10 mM acetatinis + 10 mM boratinis + 1 mM EDTA + 1 mM DTT + 1 M NaCl, pH 7.4;

Buferinis tirpalas C (ardymo): 10 mM kalio fosfatas 1 mM EDTA + 1 mM DTT + 50 mM NaCl + 0,1% Triton X-100, pH 7.4

Buferinis tirpalas D: 55 mM Tris-HCl, 3,3 mM MgCl₂, pH 7,8

3x STOP tirpalas: 60 mM EDTA, pH 8.2, 30% glicerolio, 0,03% bromfenolio mėlynojo.

Modricho tirpalas: 50 mM MgCl₂, 1 M KCl, 0,2% Triton X-100, 10 mM β-merkaptioetanolio, 1 mg/mL JSA.

5% vandeninis fenolio tirpalas: 5,0 g fenolio tirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 100 mL. Tirpalas laikomas tamsiame inde, kambario temperatūroje.

Standartinis gliukozės tirpalas (0,2 mg/mL): tiksliai atsveriamas 20 mg gliukozės, tirpinama vandenyje ir skiedžiama iki 100 mL matavimo kolbutėje.

0,1 M NaCl buferinis tirpalas: 10 mL 1 M H₃PO₄, 0,372 g EDTA ir 5,85 g NaCl yra tirpinama vandenyje. Su NaOH koreguojamas pH iki 7,4.

2.4. Metodai

Neisseria denitrificans ląstelių ardymas. Ląstelės laikomas -20 °C ir kas kart jas atšildant, dalis ląstelių susiardo.

2.4.1. Biomasės ardymas lizocimu

Rutulinių bakterijų biomasė suspenduojama ardymo buferiniame tirpale C, santykiu 1:4 (w/w). Ląstelių suspensija maišoma su 1 mg/mL lizocimo tirpalu, kuriame yra 4mM MgCl₂ ir 20 μg/mL DNazės. Mišinys inkubuojamas 2 val. kambario temperatūroje, švelniai maišant magnetine maišykle. Lizocimas, optimaliai veikdamas pH 6,7–8,6 intervale, hidrolizuoja N-acetilmuramidines jungtis, sąlygodamas ląstelės sienelės ardymą. Mėginiai imami kas 20 min.

2.4.2. Biomasės ardymas ultragarsiniu dezintegratoriumi

Neisseria denitrificans bakterijų biomasė suspenduojama ardymo buferiniame tirpale A, santykiu 1:4 (w/w). Prieš ardymą suspensija homogenizuojama maišant ją magnetine maišykle. Biomasė ardoma ultragarsiniu dezintegratoriumi naudojant 8 mM ardymo strypą, kai amplitudė 80%, ir su 16 mM ardymo strypu, kai amplitudė 70%. Ardymo metu suspensija šaldoma ledo vonioje. Ardomos ląstelių suspensijos tūris 20 mL. Mėginiai imami 1 min. intervalu.

2.4.3. Biomasės ardymas rutuliniu malūnu

Rutulinių bakterijų biomasė suspenduojama ardymo buferiniame tirpale A, santykiu 1:4 (w/w). Prieš ardymą, suspensija homogenizuojama maišant ją magnetine maišykle. Rutulinio malūno (RM) darbinis kameros tūris 500 mL. Suspenduota biomasė sumaišyta su plastikiniais rutuliukais (0,25-0,5 mM skersmens) santykiu 1:1 (v/v). Ardymui panaudota vadinamoji 50% užkrova. Ląstelės ardytos esant 3500 aps./min. ir 4500 aps./min. rotoriaus greičiui. Šaldymo marškiniai užpildyti ledukais palaikant +4 °C ardymo kameroje. Suspensijos tūris (su rutuliuku užpildu) 300 mL. Mėginiai imami 5 min. intervalu.

2.4.4. Biomasės ardymas didelio slėgio homogenizatoriumi

Neisseria denitrificans bakterijų biomasė suspenduojama ardymo buferiniame tirpale A, santykiu 1:4 (w/w). Prieš ardymą suspensija homogenizuojama statoriaus – rotoriaus tipo homogenizatoriaus pagalba. APV praplaunamas distiliuotu vandeniu, o tada sistema užpildoma buferiniu ardymo tirpalu. Ardoma keliais pasažais (1 pasažas esant 50-60 MPa, likę 120-130 MPa). Suspensija (~300 mL) visą laiką šaldoma. Mėginiai imami po kiekvieno ardymo pasažo.

2.4.5. Biomasės ardymas mikroskystintuvu

Neisseria denitrificans bakterijų biomasė suspenduojama ardymo buferiniame tirpale A, santykiu 1:4 (w/w). Prieš ardymą suspensija homogenizuojama statoriaus – rotoriaus tipo homogenizatoriaus pagalba. Mikroskystintuvas praplaunamas distiliuotu vandeniu, o tada sistema užpildoma buferiniu ardymo tirpalu. Ardoma keliais pasažais 130 MPa visą laiką šaldant

suspensiją. Ardomos ląstelių suspensijos tūris 300 mL. Mėginiai imami po kiekvieno ardymo pasažo.

2.5. Ląstelių ardymo efektyvumo nustatymas

2.5.1. Mikroskopija

Liepsna sterilizuotas stiklėlis padengiamas testuojamu mėginiu ir kelias minutes laikomas kambario temperatūroje, kol užfiksuojamos tepinėlis. Užlašinama keli lašai fuksino, kuris adsorbuojasi ant ląstelių sienelių. Po 2-5 min. dažai nuplaunami distiliuotu vandeniu ir tepinėlis džiovinamas. Prieš tiriant mikroskopu ant mėginėlio užlašinama imersinė alyva. Mėginys stebimas mikroskopu (didinimas 700 kartų). Vaizdas fiksuojamas skaitmenine kamera, o skaitmeninis nuotraukų formatas panaudojamas ardymo efektyvumo tyrimams.

2.5.2. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Metodas pagrįstas specifine baltymo sąveika su dažu Coomassie Brilliant Blue G-250 rūgščioje aplinkoje ir susidariusio komplekso koncentracijos matavimu spektrofotometriškai, kai bangos ilgis yra 595 nm. Dažas sąveikauja su baltymų arginino, lizino triptofano, tirozino, histidino ir fenilalanino liekanomis.

Pirmiausiai atliekamas bandymas baltymų kalibracinei kreivei sudaryti:

Į pirmąjį mėgintuvėlį pilama 15 µl vandens (kontrolė), į kitus – po 15 µl (0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mg/mL) JSA tirpalo. Tada į visus mėgintuvėlius pilama po 750 µl 1x Bradfordo reagento. Mėginiai išmaišomi maišyklėje.

Remiantis gautomis optinio tankio reikšmėmis, brėžiamas grafikas – šviesos sugerties priklausomybė nuo baltymo koncentracijos. Gaunama kalibracinė baltymų kiekio nustatymo kreivė.

Galutiniai rezultatai palyginami su kalibracine kreive. Jeigu baltymas buvo skiestas, tai pagal kalibracinę kreivę nustatytą baltymo koncentraciją reikia padauginti iš praskiedimų kartų. Kuo daugiau yra baltymo tiriamajame mėginyje, tuo intensyvesnė yra susidariusio komplekso spalva.

2.5.3. Nukleorūgščių kiekio nustatymas Spirino metodu

Metodas grindžiamas nukleorūgščių ekstrakcija iš biologinio objekto karšta perchlorato rūgštimi ir tolesniu ekstrakto sugerties nustatymu ultravioletinėje spektro dalyje, esant bangos ilgiams 270 ir 290 nm. A. Spirino metodo esmė – tai DNR kiekio nustatymas grubiuose ekstraktuose, kai hidrolizuoja ne tik DNR, bet ir RNR.

Į užsukamus plastikinius 1,5 mL mėgintuvėlius įpilama 250 µl mėginio (jei reikia skiesti mėginį, jis skiedžiamas ardymo buferiniu tirpalu) ir 1 mL 0,5 M perchlorato rūgšties. Mėgintuvėliai užsukami, tirpalai sumaišomi purtykle, talpinami į verdančio vandens vonią. Kaitinama 30 min. Po kaitinimo mėginiai šaldomi šaldytuve (+4 °C) 30 min. Centrifuguojama 14000 aps/min. 15 min, supernatantas atskiriamas nuo nuosėdų. Spektrofotometru matuojama supernatanto sugerti esant bangos ilgiui 270 nm ir 290 nm. Nukleorūgščių (NR) kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$NR=54,211*(A_{270nm}-A_{290nm}); \quad (1)$$

kur A_{270nm} ir A_{290nm} sugerti atitinkamai esant 270 nm ir 290 nm bangos ilgiui.

Jei mėginiai buvo skiesti – skiedimas įvertinamas skaičiuojant NR kiekį.

2.5.4. Polisacharidų koncentracijos nustatymas

Paruošiami trys kiekvienos gliukozės tirpalo koncentracijos mėginiai (pakartojimai). Į mėgintuvėlį įpilama 0,2 mL paruošto gliukozės tirpalo, 200 µl 5% vandeninio fenolio tirpalo, gerai išmaišoma ir įpilama 1 mL koncentruotos sieros rūgšties. Išmaišoma ir paliekama atvėsti iki kambario temperatūros.

Mėginių sugertį matuojama spektrofotometru 490 nm bangoje, lyginant su kontroliniu mėginiu (vietoje standartinio gliukozės tirpalo pilama 200 µl NaCl buferinio tirpalo).

Pagal gautus duomenis brėžiama kalibracinė kreivė: sugerties priklausomybė nuo gliukozės koncentracijos (mg/mL).

Koncentracijos nustatymas mėginiuose: į mėgintuvėlius įpilama po 200 µl mėginio (jei reikia skiedžiama ardymo buferiniu tirpalu), įpilama fenolio ir koncentruotos sieros rūgšties tokia pat tvarka, kaip aprašyta ruošiant kalibracinę kreivę.

2.5.5. Gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės aktyvumo nustatymas

Dehidrogenazių aktyvumo metodas naudojamas nustatyti ardymo įtaką viduląstelių fermentų aktyvumui. Paruošiamas reakcijos mišinys (0,5 mM NAD, 0,1 mM *D*-gliukozės-6-fosfatas). Sumaišius 0,98 mL reakcijos mišinio (kambario temperatūros) su 20 µl mėginio, stebima šviesos sugertis ties 340 nm šviesos bangos ilgiu (Bruckner 1980). Kontrolei naudojamas reakcijos mišinys su mėginiu pradinio laiko momentu.

2.5.6. Dalelių dydžio nustatymo metodas

Necentrifuguoti mėginiai skiedžiami ardymo buferiniu tirpalu 10 kartų. Dalelių dydis matuojamas naudojant Zetasiser Nano S prietaisą. Dalelės matuojamos pagal šviesos sklaidą.

2.5.7. Chromatografinis gryninimas stacionariomis sąlygomis

Chromatografija atliekama stacionariomis sąlygomis. Naudojamas sorbentas fosfoceliuliozė (P11). Padaroma jo pusiausvyra su ardymo buferiniu tirpalu A. Ant 2 g sorbento užnešamas 1 g biomasės. Chromatografijos eiga:

- 1) sorbcija vykdoma 1 val. 30 min. lėtai maišant mėginį su sorbentu;
- 2) centrifuguojama 5000 aps./min. 2 min.;
- 3) nesisorbavusio mėginio pašalinimas (10 tūrių) 15 min. lėtai maišant;
- 4) 2 ir 3 etapai kartojimas;
- 5) sorbavusio mėginio desorbcija (išstūmimo elucija). Desorbcijai naudojamas buferinis tirpalas B (4 tūriai), 15 min. lėtai maišant;
- 6) po chromatografijos matuojamas restriktazių aktyvumas.

2.5.8. Chromatografinis gryninimas

Chromatografinis gryninimas atliekamas naudojant Akta Explorer chromatografinę sistemą. Prie sistemos prijungiama reikiamu sorbentu pripildyta chromatografinė kolona. Ji nulygsvarinama 10 kolonos tūrių pradinio buferiniu tirpalu, kuris bus naudojamas chromatografijoje. Kompiuterine programa „Unicorn 5.10“ sukuriamas chromatografijos metodas, kuris susideda iš:

- 1) kolonos parametrų aprašymas;
- 2) mėginio sorbcija;
- 3) nesisorbavusio mėginio išplovimas iš kolonos;
- 4) sorbavusio mėginio desorbcija druskų turinčiais pradiniais buferiniais chromatografijos tirpalais;
- 5) reikiamo tūrio frakcijų rinkimas į mėgintuvėlius.

Po chromatografijos frakcijose nustatomas restriktazinis aktyvumas.

2.5.9. Restriktazių aktyvumo nustatymas

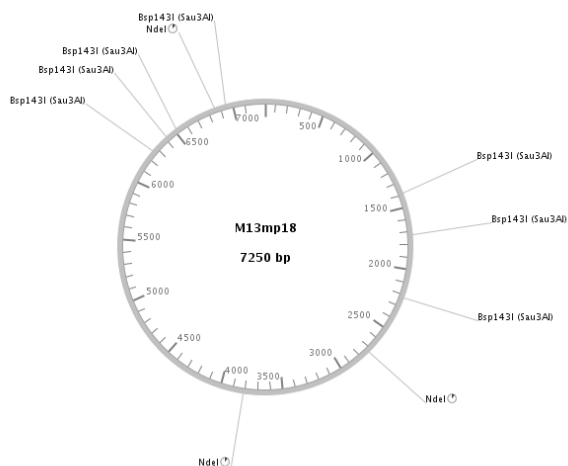
NdeI restriktinis aktyvumas nustatomas reakcijos buferiame tirpale O, substratu po pirmos gryninimo stajios naudojant fago M13mp18 DNR, o po antros stadijos λ DNR.

1. Paruošiamas reakcijos mišinys, kurio 50 μ l yra 1 vienetas M13mp18 DNR (kitu atveju λ DNR).
2. Į reakcijos mišinį įdedama atitinkamas kiekis Bsp143I restriktazės (dirbant su M13mp18 DNR).
3. Inkubuojama 30 min. 37 °C. Fermentas Bsp143I hidrolizuoja tas pačias vietas, kaip ir NdeII.
4. Po inkubacijos reakcijos mišinys išpilstomas į mėgintuvėlius po 50 μ l.
5. Mėginiai skiedžiami Modricho buferiniu tirpalu.
6. Į kiekvieną mėgintuvėlį dedamas skirtingas tiriamo mėginio kiekis (6 lentelė). Vykdoma lede.
7. Inkubuojama 60 min. 37 °C, po to perkeliama į ledo vonią.
8. Į 50 μ l dedama 25 μ l .3x STOP buferinio tirpalo.
9. Inkubuojama 10 min. 65 °C
10. Atvėsinus mėginius, atliekama elektroforezė agarozės gelyje.

6 lentelė. Mėginio kiekis restrikcijos endonukleazės teste

Neigiama kontrolė	Teigiama kontrolė, komercinis NdeI (10v/ μ l), μ l	Mėginis, μ l						
-	1	1	2	2,5	3	4	5	

Restriktazė Bsp143I pilnai hidrolizuoja M13mp18 plazmidę į 7 fragmentus (8 pav.).



8 pav. M13mp18 plazmidės restriktazių Bsp143I ir NdeI atpažinimo vietos

I mišinį pridėjus NdeI restriktazės ir įvykus pilnai hidrolizei, matomos papildomos mažesnių DNR fragmentų juostelės.

2.5.10. DNR elektroforezė agarozės gelyje

DNR elektroforezė vykdoma 1% agarozės gelyje. Jis ruošiamas: 1 g agarozės tirpinama TBE buferiniame elektroforezės tirpale, pilama į gelių formą stove, įstatomos reikiamo šulinėlių skaičiaus šukos, gelis stingsta apie 1 val. Sustingęs gelis užpilamas TBE buferiniu elektroforezės tirpalu su 1 µg/mL etidžio bromidu, į šulinėlius supilami mėginiai (8-20 µl) ir esant 140-160 V įtampai vykdoma forezė. Po elektroforezės gelis fotografuojamas gelių dokumentavimo sistema.

2.6. Matematinis modeliavimas

Naudojant matematinį modeliavimą, galima sistemingai planuoti gamybinių biomasės kiekių ardymą. Galima apskaičiuoti ardymo išeigą ir pamatyti, kada tolesnis ardymas nebeturi prasmės. Naudojant matematines lygtys gaunama ardymo greičio konstanta, kuri parodo efektyvumą. Mechaninio ardymo greičio konstanta gali būti apskaičiuota iš pirmo laipsnio kinetinės lygties.

Ląstelių ardymas arba viduląstelinio produkto išskyrimas naudojant UG arba RM yra aprašomas standartine pirmojo laipsnio greičio lygtimi (2) (Roe 2006):

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

kur R – produkto koncentracija, R_m – produkto koncentracijos maksimumas, k – pirmo laipsnio ardymo greičio konstanta, t – ardymo trukmė tenkanti 1 g biomasės.

Esant normuotiems viduląstelinių produktų kiekiams, ardymo metodų efektyvumas palyginamas naudojant būdingą ardymo greičio konstantą k , s^{-1} . Papildomas parametras, nustatomas pritaikant 2 lygtį yra laikas per kuri 95% efektyvumu yra suardomas 1g biomasės.

Pradinėje suspensijoje (ardymo trukmė 0 min.) randama viduląstelinių baltymų, polisacharidų, nukleorūgščių ir funkcionalių NAD priklausomų dehidrogenazių. Kadangi biomasė laikoma -20 °C temperatūroje, dėl atšildymo prieš ardymą dalis *Neisseria denitrificans* biomasės ląstelių suyra. Taip pat 10 min. vyksta biomasės supendavimas ardymo buferyje +4 °C švelniai maišant. Todėl (2) lygtis modifikuojama į (3) lygtį. R_0 – produkto koncentracija pradiniu laiko momentu.

$$R = (R_m - R_0)(1 - e^{-kt}) + R_0; \quad (3)$$

Nepertraukiamo veikimo prietaisams, kurie suardo ląsteles dėl didelių slėgių, ardymo efektyvumas stebimas priklausomai nuo ardymo ciklų skaičiaus, N . APV prietaisams lygtis (2) yra modifikuojama:

$$R = R_m (1 - e^{-k'N}); \quad (4)$$

kur N – ciklų skaičius, k' - ardymo greičio konstanta slėginiams homogenizatoriams.

4 lygtis, dėl pradinių laiko momentu esančių suardytų ląstelių, analogiškai modifikuojama kaip (3) lygtis:

$$R = (R_m - R_0)(1 - e^{-k'N}) + R_0. \quad (5)$$

Ardant MS prietaisu ląstelių ardymo metu tirpaus produkto išleidimas iš ląstelės į terpę yra aprašomas modifikuota lygtimi lyginant su APV (5) lygtimi:

$$R = (R_m - R_0)(1 - e^{-k'N^b}) + R_0; \quad (6)$$

kur b - parametras kuriuo skiriasi APV ir MS lygtys, tiesiškai priklauso nuo ląstelių koncentracijos ir auginimo stadijos. Šiuo atveju $b=1$, nes abejais metodais ardytos tos pačios, vienodos koncentracijos ląstelės.

Kadangi yra žinoma, kiek trunka ardymo ciklas, visiems metodams galima pritaikyti (3) lygtį, kuri aprašo eksperimentinius duomenis, gautus ardant *Neisseria denitrificans* skirtingais mechaniniais metodais. Todėl šiuo atveju ardymo greičio konstanta apjungia du parametrus:

$$k = k' \cdot P^a; \quad (7)$$

kur P – slėgis, MPa, a – ląstelių jautrumas suardymui.

Gauti rezultatai patvirtino, jog MS yra našesnis nepertraukiamo veikimo metodas. Norint įvertinti ląstelių suardymo greitį, taikome 8 lygtį:

$$V = k \cdot R_m. \quad (8)$$

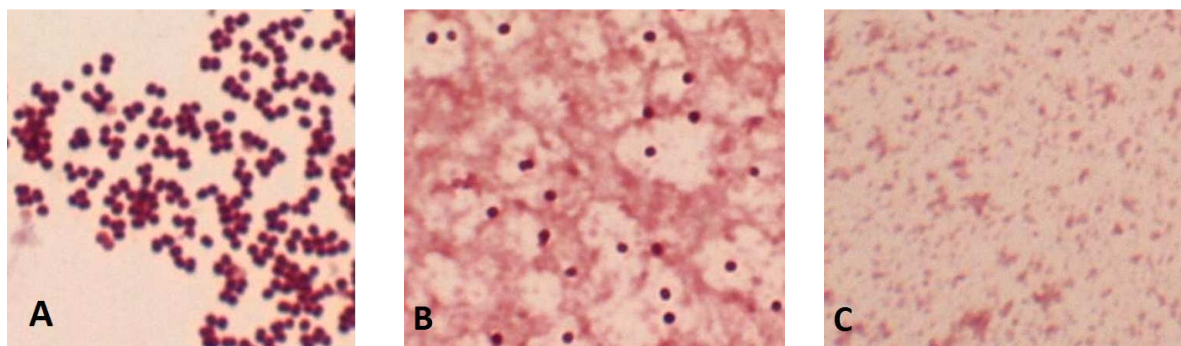
Panaudojant iš (3) ir (5) lygties gautomis pirmo laipsnio kinetinėmis konstantomis ir panaudojant jas (8) lygtyje bus vertinamas *Neisseria denitrificans* ląstelių suardymo greitis. Keisdami įvairius faktorius nustatomas suardymo efektyvumas.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Ardymo metodo parinkimas

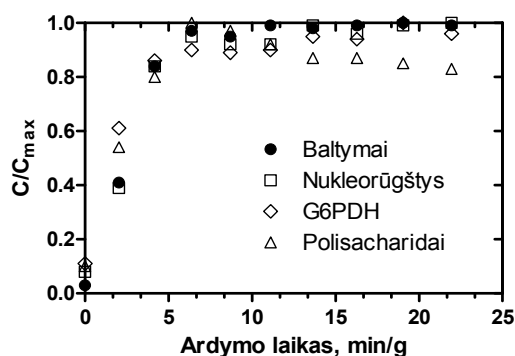
3.1.1. Fermentinis ardymo metodas

Pailgintas *Neisseria denitrificans* ląstelių inkubavimas su lizocimu panaudotas siekiant maksimaliai suardyti jas ir nustatyti maksimalias suardymo efektyvumą nusakančių parametrų vertes. Nustatyta, jog po 7 min. inkubacijos su lizocimu 1g ląstelių yra pilnai suardomas, ir suspensijoje nebeaptinkama sveikų ląstelių analizuojant mikroskopu. Ardymo efektyvumas laiko atžvilgiu pateiktas mikroskopinėje analizėje 9 pav.



9 pav. Ląstelių suspensijos *Neisseria denitrificans* hidrolizė su lizocimu mikroskopinė analizė. A - prieš ardymą, B - po 5 min./g ir C - po 10 min./g

Iš mikroskopo nuotraukų matyti, kad po 5 min./g dar yra nesuardytų ląstelių, tačiau po 10 min./g jau nebesimato sveikų ląstelių. Nustatyta, kad viduląstelinį produktų kiekis išorėje, ardant ląsteles lizocimu, kinta pagal pirmo laipsnio eksponentės dėsningumus ir yra pateiktas grafiškai (10 pav.), kur maksimali parametrų reikšmė prilyginta vienetui.



10 pav. Bioproduktų koncentracijos kitimas terpeje ardant lizocimu.

Nustatyta, jog viduląstelinį produktų: baltymų (B), nukleorūgščių (NR), polisacharidų (PS) bei gliukozės-6-fosfato dehidrogenazių (G6PDH) koncentracija nusistovėjo

ardant ląsteles ~ 7 min/g ir tai atitiko mikroskopavimo rezultatus. Gautos maksimalios parametrų reikšmės pateiktos lentelėje (7 lentelė).

7 lentelė. *Neisseria denitrificans* ląstelių suspensijos ardymo lizocimu analizės duomenys

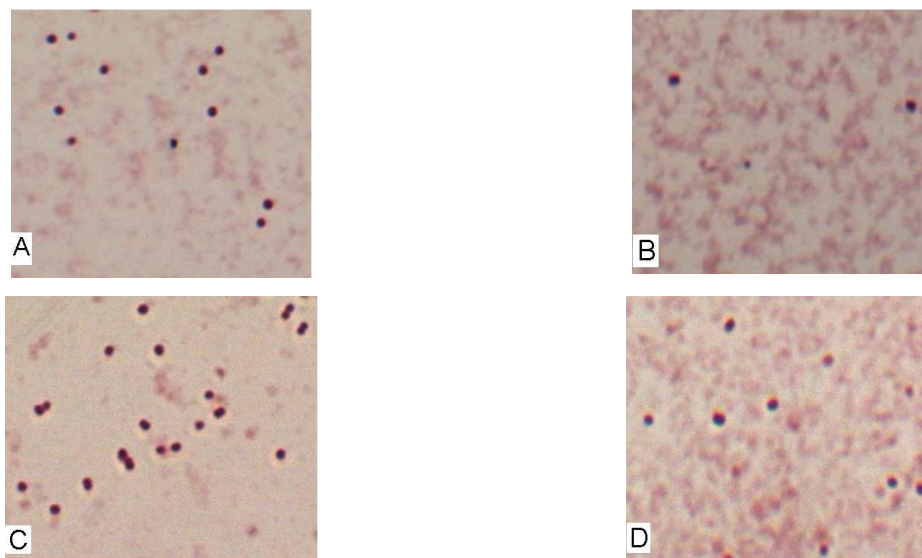
Ardymo trukmė, min/g	1 g biomasės baltymų kiekis, mg	1 g biomasės nukleorūgščių kiekis, mg	1 g biomasės polisacharidų kiekis, mg
7	92,52	10,22	22,89

Gautos maksimalios kiekvieno parametro reikšmės, toliau naudojamos kaip atskaitos taškas lyginant ardymo metodus.

Po 7 min/g lizavimo, polisacharidų koncentracija ima kristi, nes lizocimas pradeda hidrolizuoti polisacharidus. Gautos maksimalios reikšmės panaudotos lyginant tarpusavyje mechaninių ardymo metodo efektyvumus ardant *Neisseria denitrificans*.

3.1.2. Mechaninių ardymo metodų efektyvumas ardant *Neisseria denitrificans*

Atlikus kontrolinį bandymą, naudojant lizocimą, buvo tirtas *Neisseria denitrificans* ląstelių ardumas mechaniniais metodais. Laboratorinių prietaisų efektyvumas palygintas naudojant RM ir UG. *Neisseria denitrificans* ląstelės suardytos UG bei RM ir mikroskopiškai įvertintas suardymo efektyvumas (11 pav.).



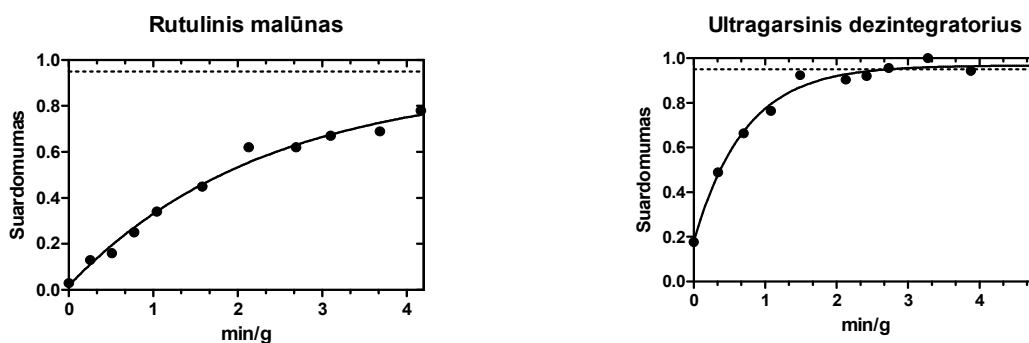
11 pav. Ardamos *N. denitrificans* suspensijos UG bei RM mikroskopinė analizė. A - UG 2,4 min/g, B - UG 4,6 min/g, C - RM 2 min/g, D - RM 4 min/g

Iš rezultatų matyti, jog ardant ultragarsiniu dezintegratoriumi 4,6 min/g dar yra sveikų ląstelių. Tai dar kartą įrodo, jog šios ląstelės yra atsparios suardymui, tačiau dar daugiau sveikų ląstelių matoma po ardymo RM. Metodai palyginti pagal viduląstelių produktų kiekius terpėje.

Bendras baltymų ir nukleorūgščių kiekis ardant UG, pasiekia 100%, o polisacharidų – 88%. Ardant 1 gramą *Neisseria denitrificans* biomasės RM 4500 aps/min greičiu daugiau nei 4 min, maksimali nukleorūgščių koncentracija yra tik 35%. Ardymui naudojami plastikiniai rutuliukai, kurie turi silpnai teigiamą krūvį, todėl NR sorbuojasi ir centrifugavimo metu yra pašalinamos su nuosėdomis. Naudojamų rutuliukų skersmuo yra 0,25–0,5 mm, dėl to didžiosios dalies ląstelių sienelės yra tik pažeistos, o ne susmulkintos ir todėl polisacharidų koncentracija siekia tik 38%. Baltymai pasiekia tik 78% bendro kiekio, o ardant esant 3000 aps/min. greičiu, po 8,5 min/g pasiekama tik 24%. Todėl naudojant rutulinį malūną, reikia rasti optimalų ardymo greitį, nes naudojant didesnes apskukas, mėginys kaista ir baltymai ima denatūruoti (Middelberg 1995).

Ardant ląsteles skirtingais ardymo metodais, labiausiai varijuoja polisacharidų ir nukleorūgščių koncentracijos, taip pat jų matavimui turi įtakos įvairūs buferinio tirpalo komponentai ir jų koncentracijos, todėl buvo nuspręsta ląstelių suardomumą stebėti pagal baltymų koncentraciją.

Maksimalus ardymo efektyvumas pasiekiamas ardant ląsteles RM 4,57 min/g yra 78% lyginant pagal kontrolę. Nustatyta pagal 2 lygtį, kad 95% *Neisseria denitrificans* ląstelių suardomumą RM pasiektų ties 7,02 min/g. Energijos sąnaudų skaičiavimas parodė, kad norint suardyti 1 g biomasės reikia 33696 J energijos. Naudoti stiklinių rutuliukų šiuo atveju negalima, nes kontakto trinties metu tarp rutuliukų į suspensiją patenka silikatų, kurie gali inaktyvuoti fermentus, ypač reikalingas endonukleazės. *N. denitrificans* ląstelių suardymo RM bei UG rezultatai pateikti 12 paveiksle.

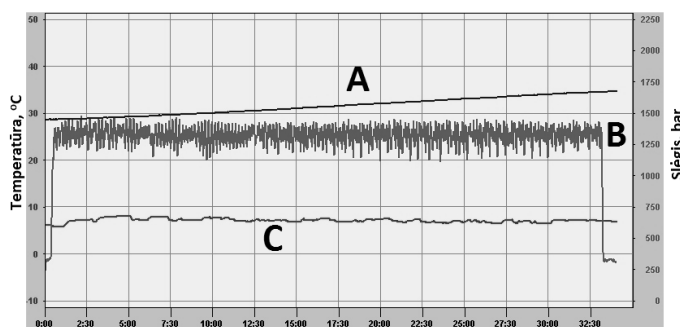


12 pav. UG ir RM ardymo metodų palyginimas. Ardymo efektyvumas nustatomas pagal ardymo trukmę 1 g *Neisseria denitrificans* biomasės. • - suardytų ląstelių dalis; ---- 95%

Iš rezultatų matoma, jog UG yra efektyvesnis laboratorinių kiekių ardymo metodas lyginant su RM. Ardant 80% amplitude ir naudojant 8mm ardymo strypą, 100% suardymo lygis pasiekiamas po 2,4 min/g. Atitinkamai 1g biomasės suardyti, naudojant 8mm ardymo strypą, reikia apie 28512 J, t.y. 15% mažiau nei ardant rutuliniu malūnu. Ardymas UG dėl kavitacijos vyksta tik labai mažame atstume nuo ardymo stripo, tai apsunkina didesnių biomasių kiekių

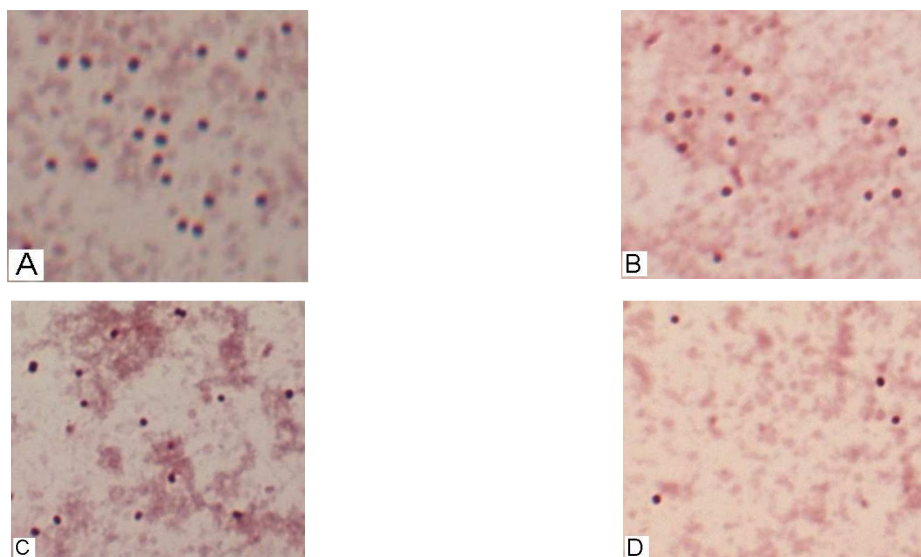
ardymą, bet tai yra nepakeičiamas ardymo metodas laboratoriniams biomasės kiekiams. Rezultatai parodė, jog *Neisseria denitrificans* ląstelių suardymo efektyvumas yra mažiausias ardant ląsteles rutuliniu malūnu. Priežastimi galima įvardinti maksimalaus efektyvumo pasiekimą, kuris sąlygojamas geometrinės rutulių formos. Tai gali būti išvelgta rutulių kolizijos dažnio lygtyje, kurioje rutulių skersmuo yra pagrindinis susidūrimų dažnį limituojantis faktorius (Garrido *et al.* 1994). Antroji priežastis ląstelių geometrinė forma, dėl kurios ląstelės patenka į neardomumo zoną, atsirandančią susidūrus rutuliams, nes *N. denitrificans* yra ~300 kartų mažesnės už naudojamus rutuliukus. Tiek iš mikroskopo nuotraukų, tiek iš gautų duomenų matyti, kad rutulinis malūnas nėra pats tinkamiausias ardymo metodas rutulinėms bakterijoms ardyti.

Fermentinis ląstelių ardymo būdas labiau tinka laboratoriniams ardymams, nes yra lėtas ir brangus, o ultragarsinis dezintegratorius ir rutulinis malūnas yra gana sunkiai pritaikomas didelių ląstelių kiekių ardymui. Todėl gamyboje naudojami našesni ardymo metodai. Populiariausi yra tradicinis vožtuvo tipo didelio slėgio homogenizatorius (APV-2000) ir specialios konstrukcijos slėginis ardymo prietaisas - mikroskystintuvas. Nuo tradicinio slėgio homogenizatoriaus jis skiriasi tuo, kad jame slėgis reguliuojamas siurblio pagalba, o ne pačiame ardymo vožtuve. Taip pat ląstelių suspensija ardoma be paruošiamojo ciklo, o iškart darbinio slėgiu 130–140 MPa. Naudojant DaisyLab programinį paketą, sekamas ardymo mikroskystintuvu proceso slėgio kitimas, išeinančios suspensijos temperatūra ir MS tepalų temperatūra (13 pav.)



13 pav. Ląstelių suspensijos ardymo mikroskystintuvu proceso grafikas. A – mikroskystintuvo tepalų temperatūra, B – ardymo slėgis, C – išeinančios iš MS ląstelių suspensijos temperatūra

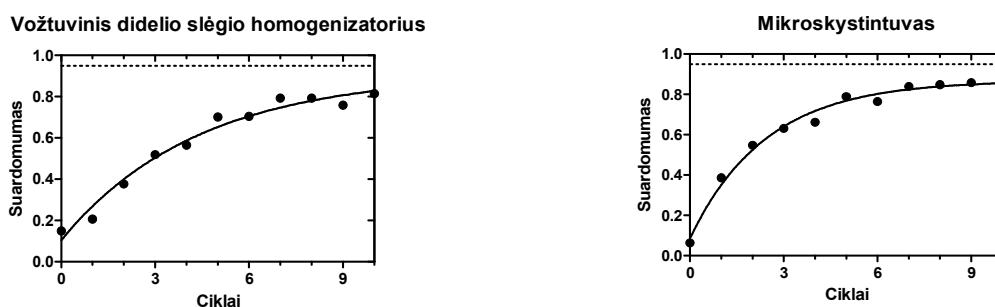
Po ardymo APV ir MS mikroskopiškai įvertintas ląstelių suardymo efektyvumas (14 pav.). Taip pat atlikti baltymų, nukleorūgščių, polisacharidų koncentracijos matavimai ir G6PDH aktyvumo matavimas supernatante.



14 pav. Ardamos *N. denitrificans* suspensijos APV bei MS mikroskopinė analizė. Su APV po 4 ciklo (A) ir po 10 ciklo (B), bei su MS po 4 ciklo (C) ir po 10 ciklo (D)

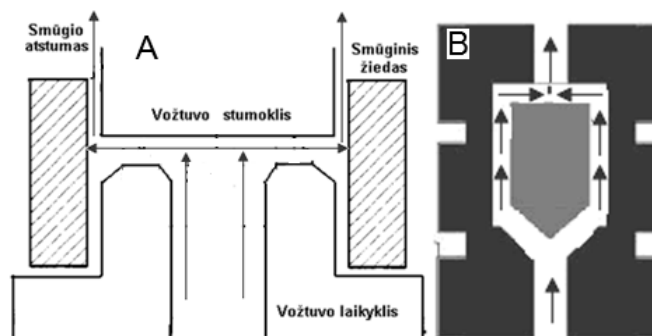
Iš mikroskopo nuotraukų matyti, kad ardant su slėginiais preitaisiais dar po 10 ardymo pasąžo yra nesuardytų ląstelių, tačiau po ardymo su MS sveikų ląstelių užfiksuota mažiau nei po ardymo su APV.

Ardant APV baltymų kiekis pasiekė 81%, nukleorūgščių 67%, o polisacharidų 39% (pagal kontrolinį metodą). Vadinasi, ląstelės nebuvo suardytos į labai smulkias daleles, o padarytos tik pažaidos, todėl didelė dalis polisacharidų liko ląstelės sienelėje. Taip pat centrifuguojant dalis nukleorūgščių pateko į nuosėdas. Gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės aktyvumo sumažėjimas nepastebėtas nei po ardymo su APV nei po MS. Po ardymo su mikroskystintuvu baltymų kiekis buvo 87%, nukleorūgščių – 89%, polisacharidų – 55%. Didesnis polisacharidų kiekis nei ardant APV reiškia, jog ląstelės suardomos į smulkesnes daleles. Palyginus viduląstelinį produktų koncentracijos kitimą po kiekvieno ciklo, nustatyta, kad MS suardė *Neisseria denitrificans* ląsteles efektyviau nei APV (15 pav.). Taip pat mikroskystintuvo sanitizavimas yra žymiai paprastesnis lyginant su APV: nereikia po kiekvieno ardymo išrinkti ardymo celes.



15 pav. Slėginių ardymo metodų palyginimas. • - Suardytų ląstelių dalis; ---- 95%

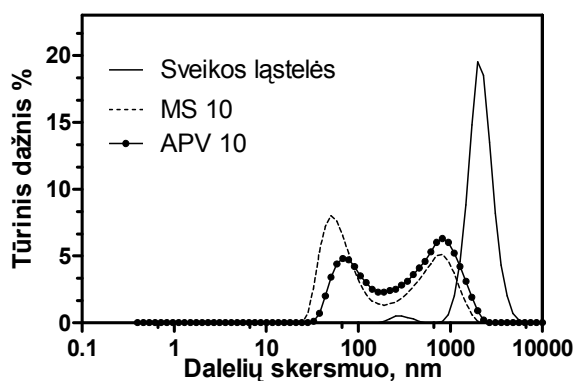
Ardymo efektyvumą lemia sistemos slėgis, ląstelių koncentracija, ardymo celės konstrukcija, ląstelių forma ir sudėtis. Kadangi ardamos tos pačios, vienodos koncentracijos ląstelės, panašiu slėgiu, vienintelis lemiantis parametras lieka ardymo celė (16 pav.).



16 pav. Slėginių ardymo prietaisų celių konstrukcija. A - APV ardymo celės padidintas vaizdas; B – MS ardymo celės padidintas vaizdas

Ardant MS, ląstelės siaurais kapiliarais didelių slėgiu nukreipiamos viena į kitą, o APV ląstelės nukreipiamos į vožtuvo sienelę.

Slėginiai ardymo metodai, suardo ląsteles iki skirtingo skersmens dalelių. Matuojant dalelių dydį, galima nustatyti, kada ląstelės visiškai suardytos (17 pav.).



17 pav. Ląstelių nuolaužų dydžių pasiskirstymas po suardymo slėginiais metodais

Ardant MS, ląstelės suardomos iki mažesnio skersmens, o po APV gaunamas platesnis nuolaužų dydžių intervalas. Nuo dalelių dydžio priklauso tolimesnis ląstelių skaidrinimo efektyvumas ir trukmė.

Mechaninių ardymo metodų efektyvumas ardant *Neisseria denitrificans* pateiktas 8 lentelėje.

8 lentelė. Metodų palyginimas. Metodai palyginti pagal tai kiek reikia laiko ir energijos 1 g *Neisseria denitrificans* biomasės suardyti

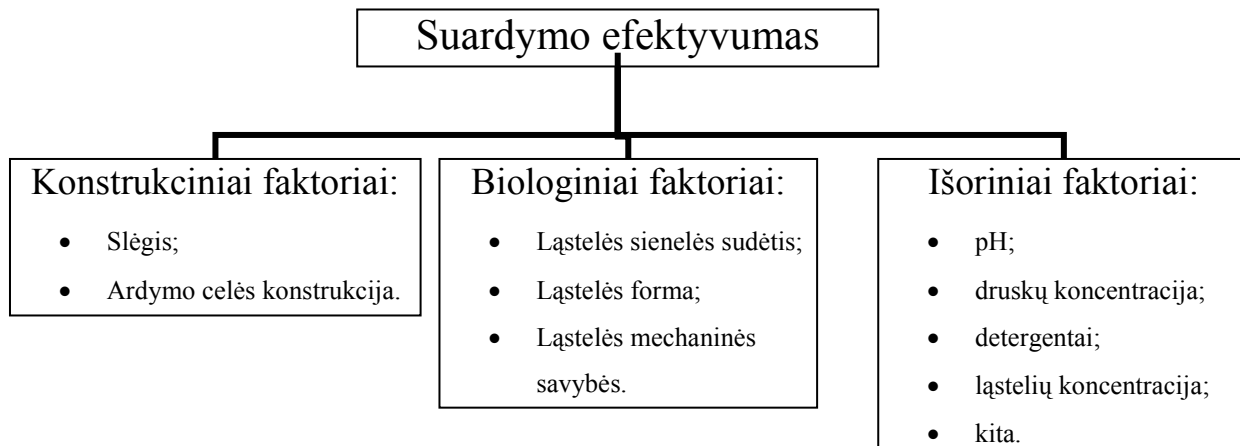
Metodas	Efektyvumas ^a , %	k, min ⁻¹	R _m	Našumas t ^b , min/g	V ^c , suardymas/min	Našumas ciklais, N	J/g
Fermentinis	100	0,35	1	7	0,35	-	6300
UG	100	1,40	0,97	2,4	1,36	-	28513
RM	78	0,43	0,91	7,02	0,39	-	33696
MS	87	16,47	0,87	0,14	14,28	6	13749
APV	81	7,07	0,91	0,4	6,41	13	16500

a – lyginant su lizocimo metodu pagal baltymus; b - ardymo trukmė iš 3 lygties, kai suardyta 95%; c - ardymo greitis iš 8 lygties, kai suardyta 95%;

Efektyviausiai *N.denitrificans* ląstelės suardomos naudojant mikroskystintuvą. Naudojant šį metodą 1 g *Neisseria denitrificans* biomasės suardomas per 8,4 s ir tam sunaudojama 13749 J energijos, t.y. mažiausiai iš visų tirtų mechaninių ardymo metodų. Taip pat literatūroje nerasta jokių optimizavimo darbų naudojant MS, todėl toliau bus atliekamas *Neisseria denitrificans* ląstelių ardymo optimizavimas su mikroskystintuvu.

3.2. Faktoriai, lemiantys suardymo efektyvumą

Gamyboje, ląstelių suardymui, dažniausiai naudojami mechaniniai metodai. Didinant mastelį, dažnai dėl laiko stokos sumažėja ardymo ciklų skaičius, o tai lemia didelį nesuardytų ląstelių kiekį. Taip pat energijos sąnaudų prasme, mechaniniai metodai yra labai neefektyvūs, nes didžioji dalis virsta šiluma ir toliau neigiamai veikia specifinį produktą. Todėl būtina, keičiant įvairius faktorius (18 pav.), sumažinti ardymo trukmę.



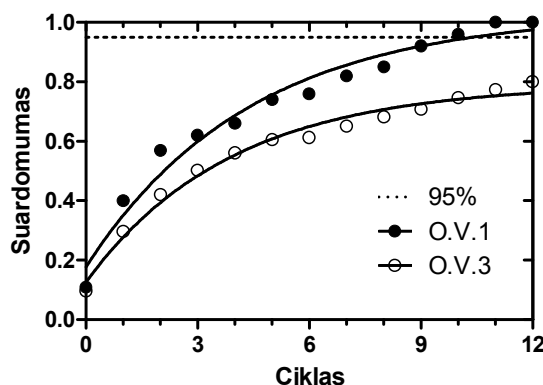
18 pav. Faktoriai lemiantys suardymo efektyvumą

Nustatyta, jog suardymo efektyvumą lemia kelios pagrindinės faktorių grupės: biologiniai, mechaniniai ir išoriniai.

Optimizuojant *Neisseria dentrificans* ardymą MS, bus stebimas baltymų koncentracijos kitimas, G6PDH ir NdeI restriktazės aktyvumas, dalelių nuolaužų dydis ir atliekama mikroskopinė analizė.

3.2.1. Biologiniai faktoriai

Ląstelių, kurios auga lėtai arba ilgą laiką stacionarioje stadijoje, didesnis peptidoglikano polimerizacijos laipsnis, todėl jos tampa atsparesnės aplinkos veiksniams ir suardymui, todėl *Neisseria denitrificans* buvo auginta iki 1 ir 3 optinių vienetų ir patikrinta ar tai turi įtakos suardymo efektyvumui (19 pav.).



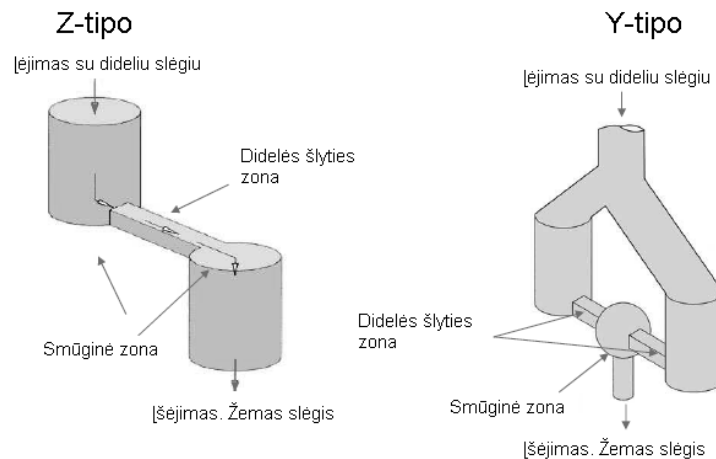
19 pav. *Neisseria denitrificans*, augintos iki 1 ir 3 optinių vienetų, suardymo efektyvumas

Biomasės, augintos iki 1 optinio vieneto, suardymo greitis (pritaikius 6 ir 8 lygtis) $V_1=0,307$, o iki 3 optinių vienetų $V_3=0,251$, t.y. 18% mažesnis. Ląstelės, augintos iki 3 optinių vienetų, nesuardytos net po 12 ciklų, o bendras baltymų kiekis pasiekė tik 70%, todėl ląstelės yra tikslinga auginti iki 1 optinio vieneto.

3.2.2. Mechaniniai faktoriai

3.2.2.1. Ardymo celes konstrukcija

Mikroskystintuvas turi kelių tipų ardymo celes: Z ir Y tipo (20 pav.), kurios buvo panaudotos ardymo efektyvumo tyrimams.

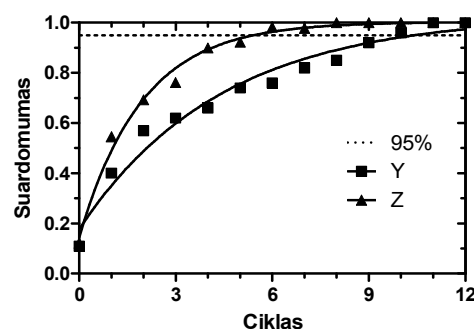


20 pav. Mikroskystintuvo ardymo Z ir Y celių principinės konstrukcijos

Z tipo celė yra 100 μm , o Y tipo 75 μm skersmens. Veikimo principas abiejų celių yra panašus: ląstelių suspensija dideliu slėgiu paduodama į celę, joje yra didelės šlyties ir smūginės zonos, tada suspensija išeina iš didelio slėgio į atmosferinį ir dėl dekompresijos plyšta.

Buvo atlikti eksperimentai su vienodos koncentracijos ląstelių suspensija. Ląstelės ardytos 12 pasažų, 125 – 130 MPa.

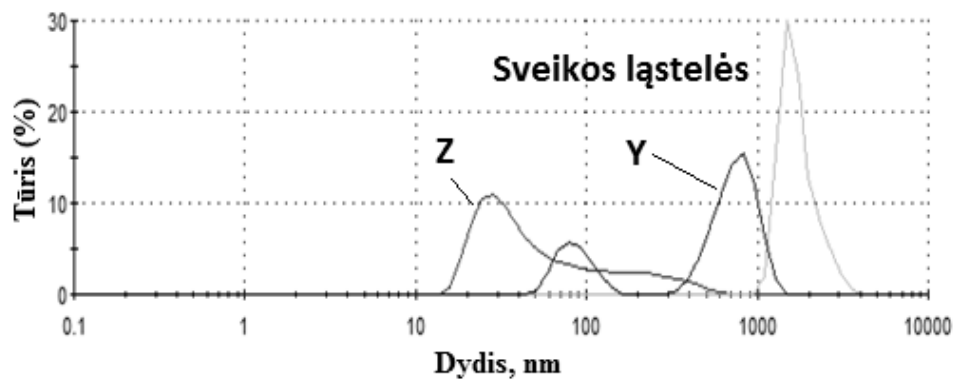
Nustatytas našumas, ardant Z tipo cele, yra 270 mL/min, o Y – 200 mL/min. Taip pat Z tipo celė pasižymėjo ir efektyvesniu suardymu (21 pav.).



21 pav. Y ir Z tipo celių suardymo efektyvumas. *Neisseria denitrificans* biomasė buvo ardyta vienodu slėgiu, keičiant ardymo celes

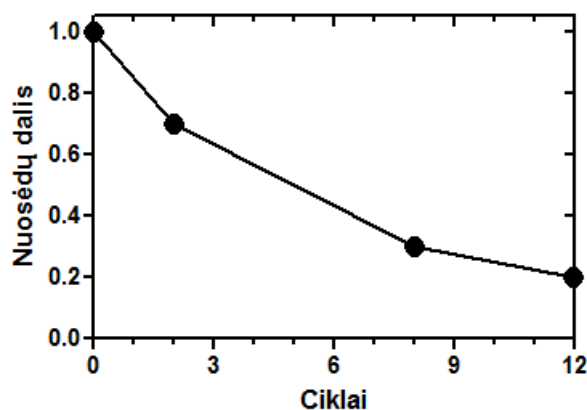
Pritaikius 8 lygtį, buvo nustatyti suardymo greičiai: Z tipo celės $V=0,515$, o Y $V=0,307$ esant 125 MPa slėgiui, t.y. Z tipo celė suardo 68% efektyviau.

Pamatavus nuolaužų dydį (2.5.6), nustatyta, jog ardant su Z tipo cele ląsteles suardomos smulkiau, nei su Y tipo cele (22 pav.).



22 pav. Nuolaužų dydžių pasiskirstymas po ardymo su Z ir Y tipo cele

Po kiekvieno ardymo ciklo, ląstelė suardoma į vis smulkesnes nuolaužas, todėl apsunkinamas, tolimesnis ląstelių skaidrinimas (23 pav.). Nusėdimo greitis priklauso nuo dalelių parametrų (masės, dydžio, tankio), taip pat tirpalo, kuriame suspenduotos dalelės, klampumo (van Hee *et al.* 2004)

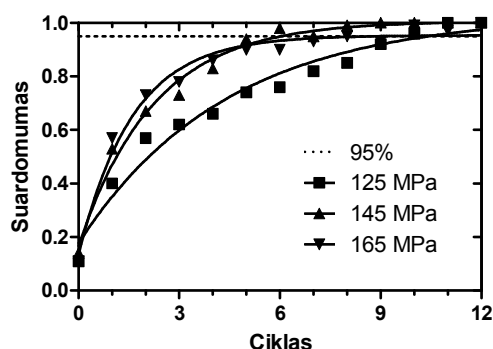


23 pav. Nuosėdų dalis po centrifugavimo

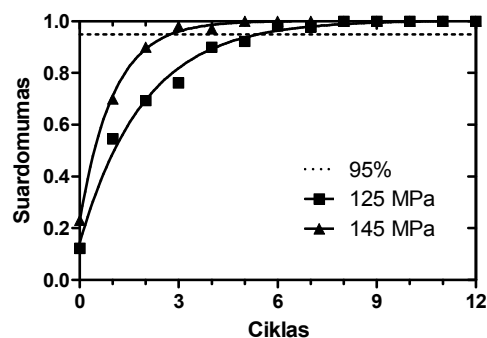
Ardant su Z tipo cele susiduriama su sedimentacijos greičio sumažėjimu: po kiekvieno ciklo vis mažėjo nuosėdų, jos buvo lengvai sudrumsčiamos, didėjo tirpalo drumstumas. Norint padidinti tirpalo skaidrumą, reikia papildomai centrifuguoti.

3.2.2.2. Slėgis ląstelių suardymui

Su Y tipo cele buvo ardyta su 125, 145 ir 165 MPa slėgiu ir gauti atitinkami suardymo greičiai $V_{125}=0,307$, $V_{145}=0,449$ ir $V_{165}=0,592$. Viduląstelinio produkto kitimas ardam pateiktas 24 A pav.



A



B

24 pav. *Neisseria denitrificans* suardymo greitis nuo slėgio naudojant Y tipo celę (A) ir Z tipo celę (B)

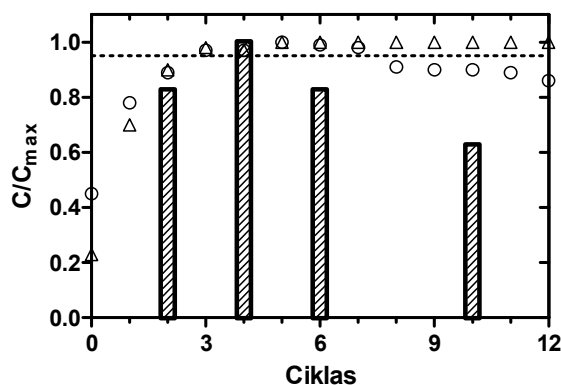
Ardymo metu naudojant skirtingus slėgius, nepastebėta gliukozės-6-fosfato dehidrogenazių inaktyvacijos, tačiau gautas skirtingas ardymo efektyvumas. Naudojant 165 MPa slėgį, ląstelės buvo suardytos našiausiai, tačiau derinant su vėliau sekančia stadija – suspensijos skaidrinimu – susidurta su sedimentacijos greičio sumažėjimu, dėl mažų nuolaužų.

Atlikus restriktazių testą (2.5.9) pastebėtas aktyvumo kritimas. Po 2 ciklo aktyvumas 0,25 v/μl, po 4 – 0,4 v/μl, po 6 – 0,4 v/μl, po 12 – 0,25 v/μl.

Su Z tipo cele buvo ardyta su 125 ir 145 MPa slėgiu (24 B pav.). Didesnis slėgis nenaudotas, nes dėl didesnio celės skersmens siurblys yra labiau apkrautas ir ima sparčiai kaisti mikroskystintuvo tepalai, taip pat ląstelių suspensija nepakankamai atšaldoma.

Gauti atitinkami suardymo greičiai $V_{125}=0,515$, $V_{145}=0,981$. Padidinus slėgį nuo 125 iki 145 MPa, našumas padidėja 30% t.y. iki 350 mL/min, o suardymo efektyvumas 90%.

Ardant *Neisseria denitrificans* ląsteles Z tipo cele 145 slėgiu, po 5 ciklų pastebėtas G6PDH aktyvumo sumažėjimas (25 pav.), nors toks aktyvumo kritimas nebuvo pastebėtas anksčiau ardant su Y tipo cele. Tai gali būti susiję pakilusią suspensijos temperatūrą, nes termostatas nespėja atšaldyti suspensijos. Ardant Z tipo cele 145 MPa slėgiu, išeinančios suspensijos temperatūra didesnė 5 °C nei įprastai.



25 pav. Fermentų aktyvumo sumažėjimas. Δ - baltymai, $\circ$ – G6PDH, stulpeliu – NdeI restriktazės vienetai

Dalinis NdeI restriktazės aktyvumo kritimas pastebėtas ir ardant su Z tipo cele esant 125 MPa slėgiui ir su Y cele ardant didesniu nei 160 MPa slėgiu, todėl Z tipo celė netinkama visiškam ląstelių suardymui.

Apibendrinant, galima daryti išvadas, jog ardymas Y tipo cele yra „švelnesnis“, nestebimas fermentų aktyvumo kritimas, todėl baltymai ilgiau išlieka stabilūs, ląstelės nuolaužos yra didesnės, o tai palengvina tolimesnį ląstelių skaidrinimą ir gryninimą. Z tipo celė ardo našiau ir efektyviau, tačiau dėl NdeI restrikcijos endonukleazės inaktyvacijos toliau bus dirbama su Y tipo. Be to ardant su Y cele yra lengviau stebima skirtingų faktorių įtaka. Taip pat nustatyta jog gliukozės-6-fosfato dehidrogenazė yra stabilesnis baltymas, nes šio fermento aktyvumo kritimas nepastebėtas ardant 160 MPa.

3.2.3. Išoriniai faktoriai

Nemechaniniai suardymo metodai reikalauja mažiau energijos ir dažnai būna labai selektyvūs, bet jų panaudojimą riboja mastelis ar efektyvumo trūkumas. Nemechaninių ir mechaninių metodų kombinacija turėtų šias problemas išspręsti: nemechaniniais metodais padarius pažaidas mikroorganizmų sienelėje, sumažėtų energijos sąnaudos toliau ardant mechaniniais metodais. Sudaryta eksperimentinių faktorių lentelė (9 lentelė), su faktoriais, kurie turi įtakos ląstelės suardymui.

9 lentelė. Išoriniai faktoriai						
Parametrai	Faktoriai		-1	0	+1	Vienetai
Išoriniai	pH	X ₁	5	7,4	9	pH
	Brinkinimo trukmė	X ₂	30	60	90	min
	Ląstelių koncentracija	X ₃	1:8	1:4	1:2	g/mL
	NaCl	X ₄	50	275	500	mM
	Triton X-100	X ₅	0	0,1	0,2	%
	EDTA	X ₆	1	5,5	10	mM

Analizei panaudotas platus analizuojamų faktorių intervalas, siekiant išgauti didžiausią kiekį informacijos apie jų įtaką. Faktoriai derinti tarpusavyje pagal įtaką vienas kitam: buferinio tirpalo pH pokyčio poveikis nuo papildomos ląstelių inkubacijos, koreliacija tarp ląstelių ir druskos koncentracijos ir priklausomybė tarp detergentų ir chelantų koncentracijos. Taikant faktorialinį eksperimentų planavimo metodą sumažinamas matavimų skaičius: vietoj 9 matavimų užtenka 5.

3.2.3.1. pH ir ląstelių brinkinimo trukmė

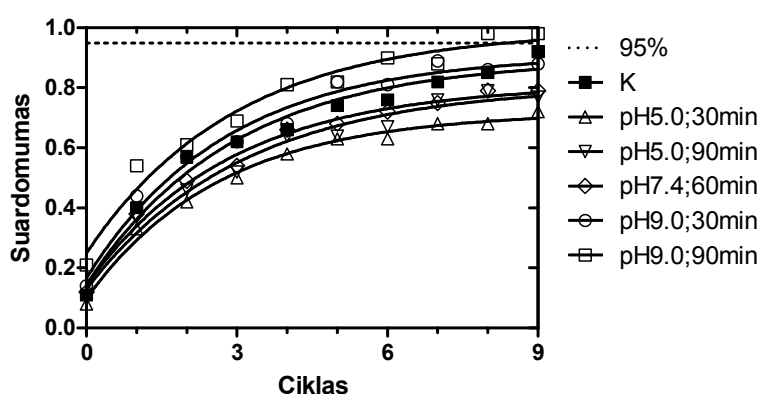
Prieš ardymą ląstelės suspenduojamos buferiniame tirpale, kurio pH kaip fiziologinio tirpalo 7,2–7,4, tačiau ląstelių sienelės galima paveikti naudojant rūgštinę arba šarminę terpę (Harrison 1991). Norint įvertinti pH ir brinkinimo įtaką jos suspenduojamos skirtingo pH buferiniame tirpale ir brinkinamos fiksuotą laiką +4 °C temperatūroje. Pritaikius matematinį modeliavimą, iš suardymo efektyvumo kreivių (26 A pav.) gauti suardymo greičiai (10 lentelė):

10 lentelė. pH ir brinkinimo trukmės įtaka ląstelių suardomumui		
pH, X_1	Brinkinimo trukmė, X_2	Suardymo greitis
5,0	30	0,270
5,0	90	0,260
7,4	60	0,285
9,0	30	0,328
9,0	90	0,335

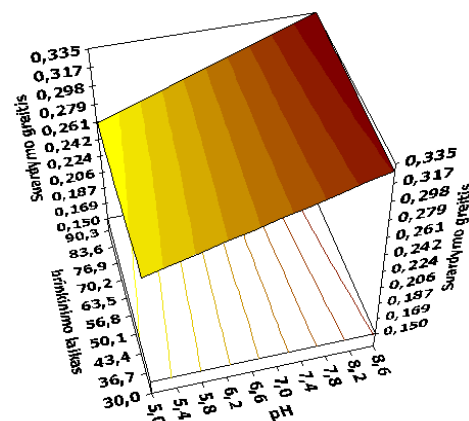
Ląsteles galima ardyti pasirinktame pH intervale, nes nebuvo pastebėtas restrikcijos endonukleazių aktyvumo sumažėjimas (duomenys nepateikti).

Brinkinant ląsteles 90 min. su buferiniu ardymo tirpalu kurio pH 9,0, suardymo efektyvumas padidėja 9%, o po tokios inkubacijos su pH 5,0 suardymas sumažėja 15% (pagal kontrolinį bandymą).

Naudojant ReliaSoft DOE++ programinį paketą, gautas suardymo greičio priklausomybės nuo buferinio tirpalo pH ir brinkinimo trukmės po ląstelių suspendavimo grafikas (26 B pav.).



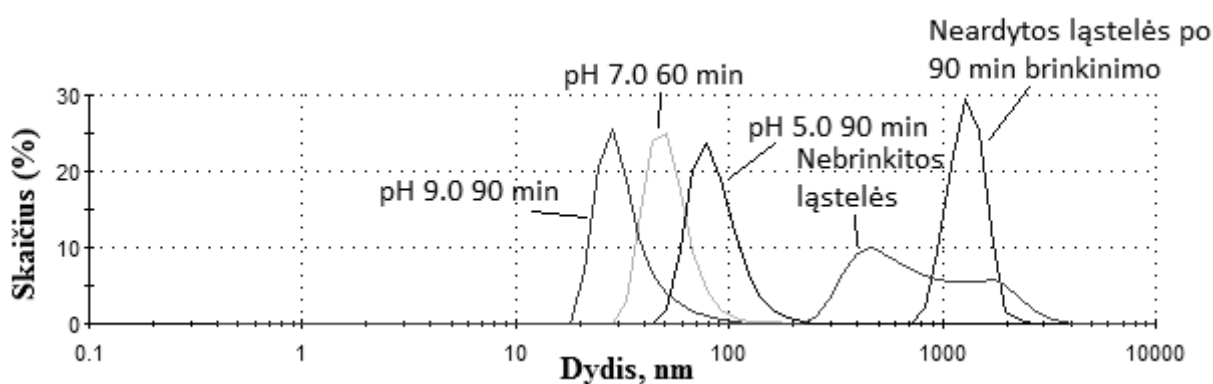
A



B

26 pav. Suardymo greičio priklausomybė nuo buferinio tirpalo pH ir brinkinimo trukmės po ląstelių suspendavimo

Ardant ląsteles po 90 min. inkubacijos su buferiniu tirpalu kurio pH 9,0, pasiekiamas 100% baltymų kiekis. Taip pat pastebėtas padidėjęs G6PDH aktyvumas. Po inkubacijos paimtame mėginyje, buvo 47% visų gliukozės-6-fosfato dehidrogenazių (įprastai visuose mėginiuose po suspendavimo randama ~20%), tai gali reikšti, jog vyksta ląstelės sienelės hidrolizė, atsiranda pažaidos. Brinkinti ląsteles tikslinga tik tada, kai jo metu hidrolizuojamos ląstelės sienelė t.y. šiuo atveju kai naudojamas pH 9,0 buferinis tirpalas. Priešingą poveikį turi inkubacija, jei naudojamas buferinis tirpalas kurio pH 5,0, nes ląstelės tampa atsparios aplinkos poveikiams. Po 90 min. brinkinimo buferiniu tirpalu kurio pH 5,0, maksimalus baltymų kiekis po 9 ciklų siekia 70%, tačiau ląstelės nuskaidrinamos lengviau nei po ardymo su buferiniu tirpalu kurio pH 9,0, kadangi pH turi įtakos ląstelių nuolaužų dydžių pasiskirstymui po ardymo (27 pav.).



27 pav. Ląstelių nuolaužų dydžių pasiskirstymų priklausomybė nuo pH po 8 suardymo ciklų

Nuolaužos, ląstelių suspenduotų su ardymo buferiniu tirpalu, kurio pH 5,0, yra didesnės nei lyginant su pH 9,0 ar pH 7,4. Norint pagreitinoti centrifugavimą, ląsteles yra tikslinga brinkinti pH 5,0 buferiniame tirpale.

Brinkinimo trukmė neturi tokio poveikio kaip pH pokytis: suardymo efektyvumas, tarp ląstelių inkubacijos pH 9,0 buferiniame tirpale 30 ir 90 min. yra tik 2%. Naudojant pH 5,0 buferinį tirpalą, ląstelės atsparios suardymui tampa per pirmas 30 min, nes papildomai inkubuojant iki 90 min. suardymas krenta tik 3,7%. Inkubuojant ląstelės 60 min. buferiniame tirpale kurio pH 7,4 suardymo efektyvumas krenta 7%, lyginant su ląstelėmis, kurios buvo ardytos iškart po suspendavimo.

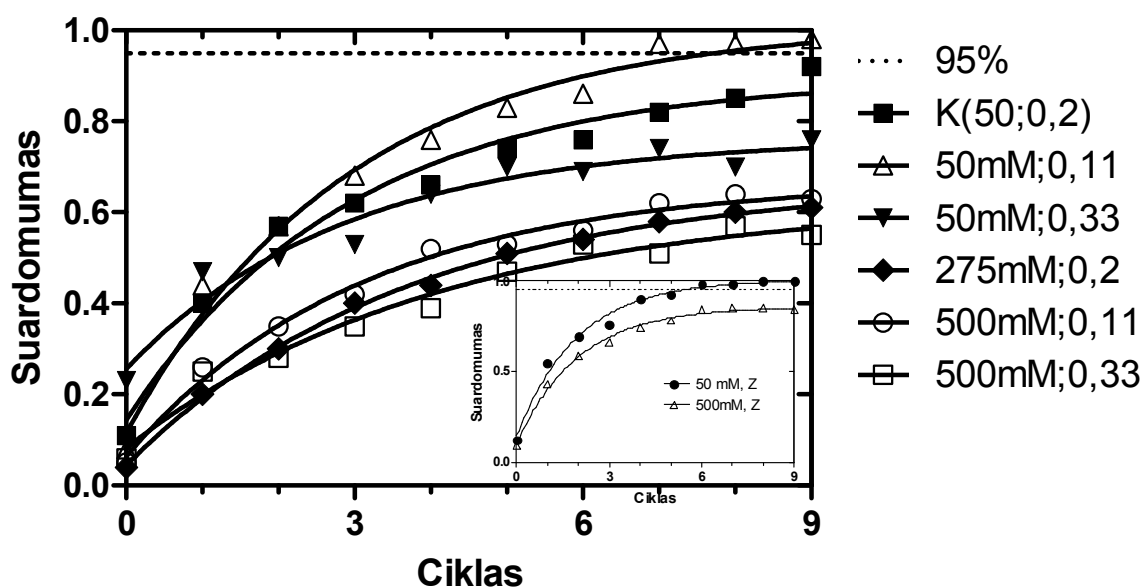
3.2.3.2. Druskų ir ląstelių koncentracija

Ardant slėginiais ardymo prietaisais, vienas iš faktorių yra ląstelių koncentracija. Sumažinus koncentraciją, sumažėja suspensijos klampa, tačiau sumažėja ir ląstelės kolizijos

dažnis. Taip pat ląstelės sienelės tvirtumas priklauso nuo terpėje esančių druskų ir jos koncentracijos. Įprastai ląstelės suspenduojamos fiziologiniame tirpale (100–150 mM bendra druskų koncentracija). Buvo atlikti bandymai su 3 skirtingomis ląstelių ir druskos koncentracijomis (11 lentelė).

11 lentelė. Druskos ir ląstelių koncentracijos įtaka ląstelių suardomumui		
NaCl mM, X_3	Ląstelių koncentracija g/mL, X_4	Suardymo greitis
50	0,11	0,349
50	0,33	0,266
275	0,20	0,180
500	0,11	0,216
500	0,33	0,152

Suardymo greičiai gauti iš suardymo grafikų (28 pav.). Nustatyta, jog ląstelės, suspenduotos buferiniame tirpale, kuriame yra 500 mM NaCl, tampa atsparios suardymui. Papildomai buvo atliktas ardyimas su Z tipo cele. Ląstelės suspenduotos santykiu 1:4 (pagal svorį) su ardyimo buferiniu tirpalu, kuriame yra 500 mM NaCl. Suardymo greitis $V=0,43$ t.y. sumažėjo 16%. Baltymų išsiskyrė 85%. Stebint mikroskopu, matoma didelė dalis nesuardytų ląstelių.

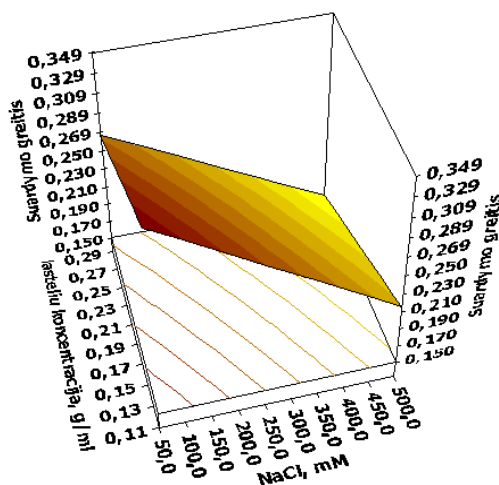


28 pav. Suardymo efektyvumo priklausomybė nuo NaCl ir ląstelių koncentracijos. Ardyta su Y tipo ardyimo cele. Papildomai patikrinta ardant su Z tipo cele

Ardant su Y tipo cele ląstelės suspenduotas 1:8 (w/w) buferiniu tirpalu, kuriame yra 50 mM NaCl, pasiekiamas 100% baltymų kiekis. Padidinus ląstelių koncentraciją 3 kartus, baltymų kiekis po 9 ciklų siekia tik 76%, o suardymo greitis sumažėja 24%. Dar mažesnė baltymų koncentracija ardant su 500 mM NaCl: kai ląstelių koncentracija 0,33 g/mL, baltymų

išeiga - 55%, sumažinus ląstelių iki 0,11 g/mL, baltymų kiekis padidėja iki 63%, tačiau suardymo greitis padidėja 42%.

Naudojant ReliaSoft DOE++ programinį paketą, gautas suardymo greičio priklausomybės nuo NaCl ir ląstelių koncentracijos grafikas (29 pav.).



29 pav. Suardymo greičio priklausomybė nuo NaCl ir ląstelių koncentracijos

Nustatyta, jog tiek ląstelių, tiek NaCl koncentracija turi didelės įtakos suardymo veiksmingumui. Padidinus ląstelių koncentraciją nuo 0,11 g/mL iki 0,33 g/mL, o NaCl koncentraciją iki 500 mM, ląstelės suardomos 56% lėčiau. Ląstelės sienelės struktūra keičiasi nuo NaCl koncentracijos netik augimo fazėje, bet ir būdama stacionarioje (Medelson *et al.* 1984; Medelson *et al.* 1987). Proceso metu pasikeičia ląstelės sienelėje esančių polimerų struktūra, taigi ir visos ląstelės mechaninės savybės (Thwaites *et al.* 1991). Tirtose ląstelių koncentracijos ribose (0,11 – 0,33 g/mL) nustatyta, jog *N.denitrificans* efektyviau suardomos esant 0,11 g/mL, tačiau sekanti stadija – centrifugavimas – turi ribojantį tūrio veiksnį, todėl ląstelių koncentracija turi būti parinkta siakiant gauti kuo mažesnę tūrį po suardymo.

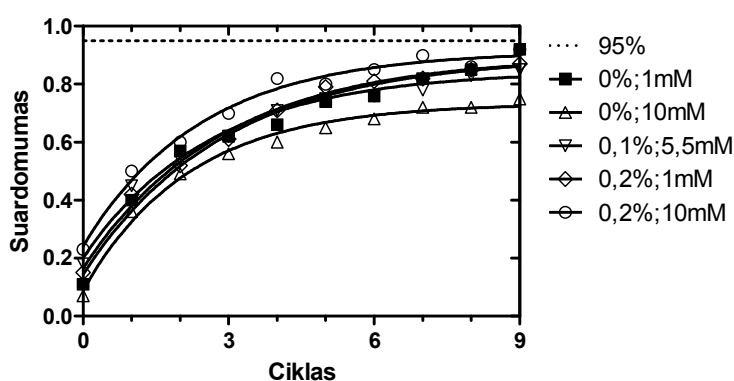
3.2.3.3. Detergentai ir chelatai

Dažnai norint pagerinti ląstelių suardymą, į buferinį tirpalą pridedama detergentų (toliau – PAM) ir/ar chelatuojančių agentų. Vienas iš dažniausiai naudojamų PAM yra Triton X-100. Kartu dažnai naudojamas su chelatais, pvz. EDTA, kuris taip pat naudojamas, kaip metalo proteazių inhibitorius, nes suriša metalų jonus esančius aktyviajame centre. Buvo atlikti bandymai su skirtingomis detergento ir chelato koncentracijomis (12 lentelė)

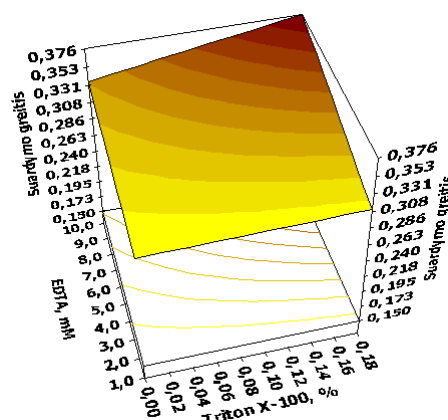
12 lentelė. Detergentų ir chelatų įtaka ląstelių suardomumui		
Triton X-100, %, X_5	EDTA, mM, X_6	Suardymo greitis
0	1	0,307
0	10	0,337
0,1	5,5	0,322
0,2	1	0,311
0,2	10	0,376

Suardymo greičiai gauti iš suardymo grafikų (30 A pav.). Tiek pridėjus papildomai EDTA tiek įdėjus Triton X-100, suardymo veiksmingumas pagerėja, tačiau kartu šie faktoriai veikia efektyviau nei kiekvienas atskirai. Taip yra todėl, kad EDTA suriša metalo jonus membranoje ir taip palengvina detergentui priėjimą prie membranos baltymų ir išorėje esančių lipopolisacharidų.

Naudojant ReliaSoft DOE++ programinį paketą, gautas suardymo greičio priklausomybės nuo Triton X-100 ir EDTA koncentracijos grafikas (30 B pav.).



A



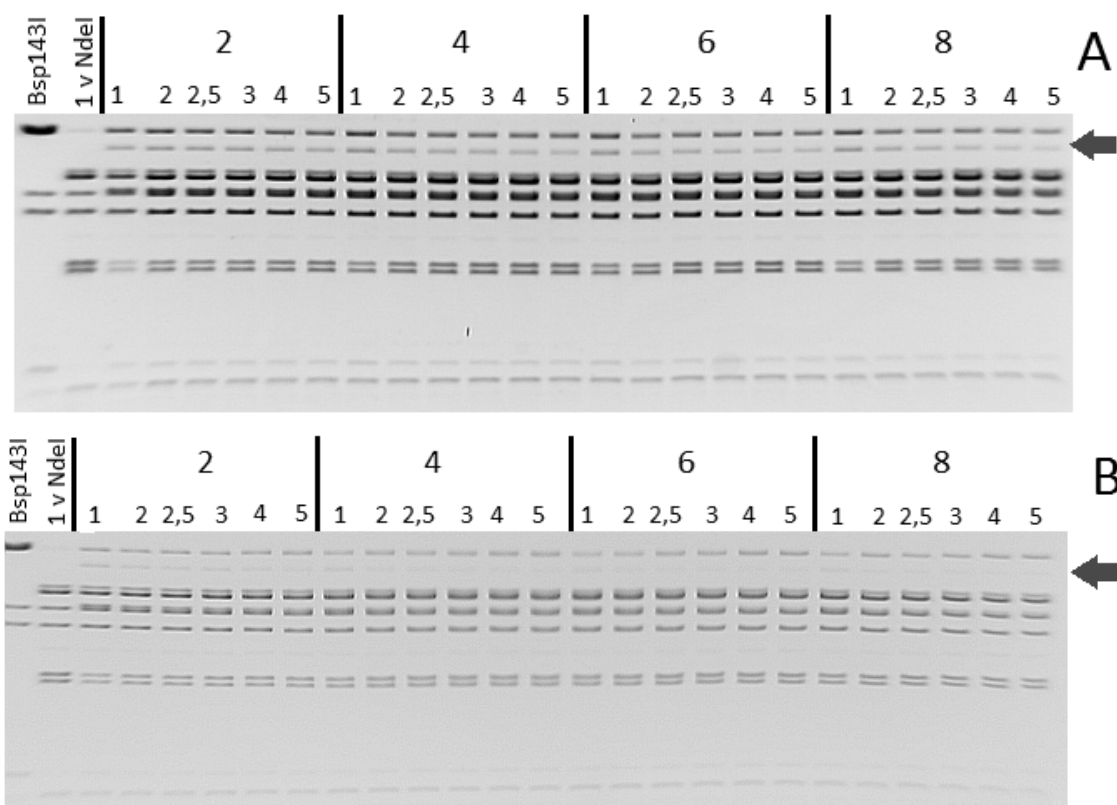
B

30 pav. Suardymo efektyvumo priklausomybė nuo detergentų ir chelatų koncentracijos (A) ir suardymo greičio priklausomybės (B)

Atskirai detergentai ir chelatai veikia ląstelę silpniau nei kartu: padidinus EDTA koncentraciją iki 10 mM, suardymo greitis padidėja ~10%, pridėjus tik Triton X-100 (EDTA lieka minimali koncentracija 1 mM) greitis padidėja tik ~1%, tačiau naudojant kartu, suardymą pagerina ~22%.

Pridėjus PAM, ardymo metu vyksta smarkus putojimas, kas apsunkina pati procesą ir gali sukelti baltymų denatūraciją (Mojsin *et al.* 2005). Po suardymo, supernatante gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės aktyvumas nesumažėjo, o priešingai: Triton X-100 padidino aktyvumą 1,5 karto. PAM netik padidina policiklinių angliavandenių tirpumą, bet ir lemia fermento katalitinį aktyvumą ir baltymo stabilumą (Kulys *et al.* 2000). Restrikcijos endonukleazės

aktyvumas buvo didesnis tuose bandymuose, kur EDTA koncentracija padidinta iki 10 mM (31 pav.)



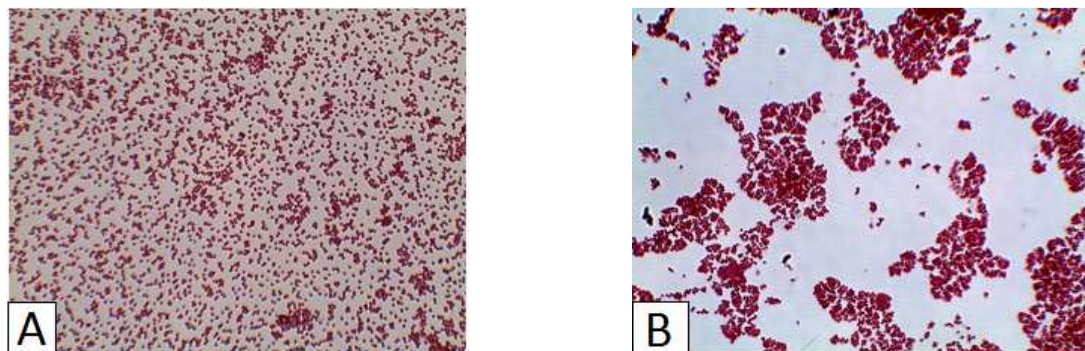
31 pav. Restrikcijos endonukleazių aktyvumas su EDTA ir Triton X-100. Aktyvumas matuotas po 2, 4, 6 ir 8 ardymo ciklo (2.5.9). A – ląstelės spenduotos buferiniame tirpale su 0,2% Triton X-100 ir 1 mM EDTA; B - ląstelės spenduotos buferiniame tirpale su 0,2% Triton X-100 ir 10 mM EDTA. Aktyvumas stebimas ties 4032 bp juostelės išnykimu (rodyklė)

Į ardymo buferinį tirpalą papildomi pridėjus EDTA ir Triton X-100 pagerėja suardymo efektyvumas ir fermentų stabilumas ardymo metu.

3.2.3.4. Polietileniminas

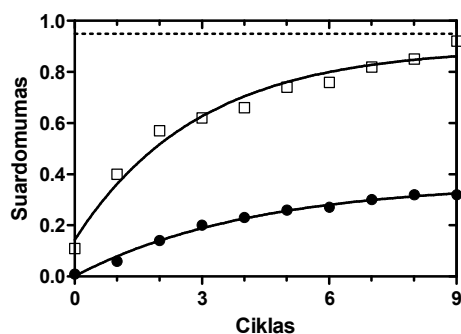
Polietileniminas (toliau – PEI) yra teigiamą krūvį turintis polimeras, dažniausiai naudojamas DNR išsodinimui po ląstelių suardymo. Dėl savo polikationinės prigimties, PEI sąveikauja su gram-neigiamų ląstelių išorinėje membranoje esančiais polisacharidais, fosfolipidais bei baltymais ir taip keičia sienelės struktūrą (Helander *et al.* 1998; Helander *et al.* 1997). Todėl buvo nuspręsta suspenduoti ląsteles ardymo buferiniame tirpale A ir pridėti PEI iki 0,4%, nes bet koks ląstelės sienelės struktūros pakitimas turi įtakos suardymo efektyvumui, taip pat po kiekvieno ardymo ciklo į terpę patenka DNR, kuri didina klampą ir apsunkina suardymą. Pridėjus PEI, klampa turėtų sumažėti.

Buvo ardyta 9 ciklai (slėgis 125 MPa) su Y ardymo cele. Po suspendavimo ir ardant ląstelių suspensija buvo klampesnė nei įprastai. Susidarė ląstelių agregatai, todėl didelė dalis ląstelių nebuvo suardyta (32 pav.).

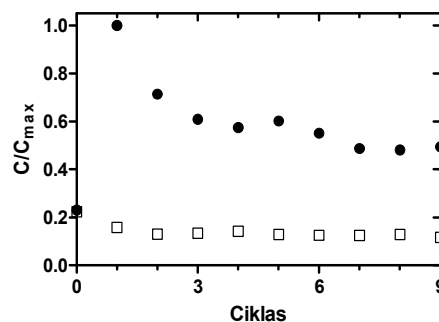


32 pav. Ardamos *N. denitrificans* ląstelių suspensijos be PEI ir su PEI mikroskopinė analizė. A - be PEI, B - su 0,4% PEI

Mikroskopinė analizė parodė, kad be PEI ląstelės pasklinda atskirai viena nuo kitos, o pridėjus 0,4% PEI ląstelės agreguojasi. Ląstelių suardymo efektyvumas sumažėjo (33 A pav.).



A



B

33 pav. PEI įtaka ląstelių suardymui. A – ląstelių suardymas, B – G6PDH santykinis aktyvumas, • – su 0,4% PEI, □ - be PEI 0%

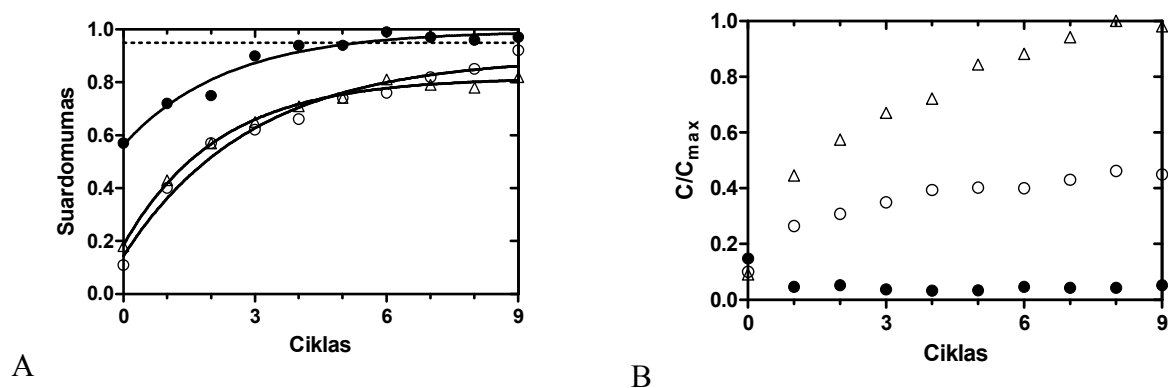
Nepridėjus PEI suardymo greitis $V_{0\%}=0,307$, o su 0,4% PEI $V_{0,4\%}=0,088$ t.y. 3,5 karto mažesnis. Po 9 ciklo baltymų buvo tik 32%. Tačiau G6PDH aktyvumas biomasės gramui išliko toks pats kaip pilnai suardytoms ląstelėms. Todėl santykinis aktyvumas didesnis 4 kartus (33 B pav.). Toks suardymo metodas tiktų jei tikslinis produktas būtų gliukozės-6-fosfato dehidrogenazė, nes jau ardymo metu pašalinama didelė dalis pašalinių baltymų.

Restrikcijos endonukleazės aktyvumas buvo labai mažas. Dalis restriktazių yra sąveikoje su DNR, todėl galėjo su ją pasišalinti su nuosėdomis.

3.2.3.5. Chaotropai

Guanidino hidrochloridas yra druska, dažniausiai naudojama baltymų denatūracijai. Esant >4 M koncentracijai, išlankstoma baltymų tretinė struktūra. Taip pat jis inhibuoja peptidoglikano polimerizaciją ir tolimesnę sienelės sintezę. Dėl hidrofobinės sąveikos, baltymai esantys membranoje yra ištirpdomi. Nustatyta, jog suspendavus *E.coli* ląstelės su buferiniu tirpalu, kuriame yra 1,5 M GuHCl ir ardant ląstelių suspensiją su APV esant 41 MPa slėgiui, gaunami rezultatai panašūs į tuos kur ląstelės buvo ardyto be GuHCl esant 62 MPa slėgiui (Bailey *et al.* 1995).

Neisseria denitrificans ląstelės buvo suspenduotos ardymo buferiniame tirpale, kuriame yra 1,5 M ir 4 M GuHCl, santykių 1:4 (w/w). Suardymo efektyvumas nustatytas matuojant baltymų koncentraciją (34 A pav.).



34 pav. GuHCl įtaka ląstelių suardymui. A – ląstelių suardymas, B – G6PDH santykinis aktyvumas, ○ – kontrolė, △ – 1,5 M GuHCl, ● – 4 M GuHCl

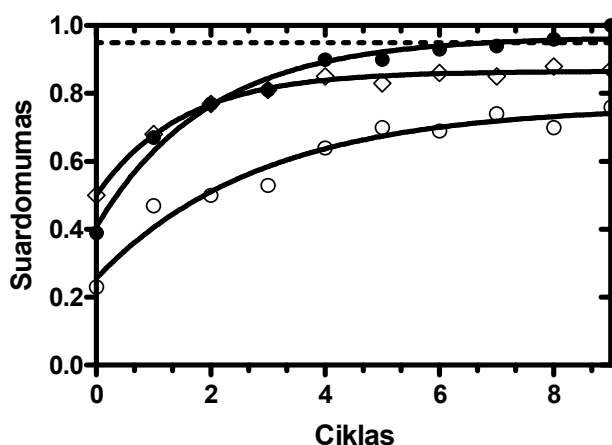
Pridėjus 1,5 M GuHCl, suardymo greitis padidėja 23% t.y. iki $V=0,378$, o G6PDH aktyvumas 2 kartus (34 B pav.). Ląstelės nesuardytos iki labai smulkių dalelių, o padarytos tik pažaidos, todėl pagerėja jų centrifugavimas. Taip pat išliko ir restrikcijos endonukleazės aktyvumas.

Atlikus ardymą, kur ląstelės buvo suspenduotos 4 M GuHCl, baltymai agregavosi ir iškrito į nuosėdas. Gliukozės-6-fosfato dehidrogenazės aktyvumas po kiekvieno ardymo ciklo buvo vis mažesnis. Po ląstelių suspendavimo baltymų koncentracija siekė $>50\%$, vadinasi GuHCl specifiskai veikia ląstelės sienelės baltymus.

3.3. Suardymas panaudojant tirtų faktorių optimalias reikšmes

Neisseria denitrificans ląstelės suardytos su optimaliomis faktorių koncentracijomis, t.y. buferinio ardymo tirpalo pH 9,0, NaCl koncentracija 50 mM, EDTA pridėta iki 10 mM, 0,2% Triton X-100, ląstelių koncentracija 0,2 g/mL, 0,5 M guadinino hidrochlorido. Nors efektyviau suardoma, kai ląstelių koncentracija mažesnė, bet dėl limituojančio centrifugavimo tūrio ją padidinam. Ląsteles suhomogenizavus su tokiu buferiniu tirpalu, dar inkubuojam 90 min. + 4 °C lėtai maišydami magnetine maišykle. Ardome 5 ciklus, nes lyginam su gamybinio ardymo.

Nustatyta, jog bendra baltymų koncentracija nedidėja jau po 4 ardymo ciklo. G6PDH aktyvumo kritimas nepastebėtas, tačiau atlikus baltymų gryninimą gauta išeiga 7,8 kvnt/g, t.y. 12% buvo sumažėjęs NdeI restriktazės aktyvumas, lyginant su gamybinio ardymo (8,87 kvnt/g). Sumažinus GuHCl koncentraciją iki 0,25 M, po suardymo bendra baltymų koncentracija buvo didesnė, lyginant ardymą kai GuHCl buvo 0,5 M. Sumažinus GuHCl koncentraciją, suardymo efektyvumas padidėjo 33% ($V_{0,5}=0,38$, $V_{0,25}=0,57$) (35 pav.).



35 pav. *Neisseria denitrificans* ląstelių suardymas optimaliomis sąlygomis. ○ - gamybinis ardymas, ◇ - su optimaliomis faktorių koncentracijomis ir 0,25 M GuHCl, ● - su optimaliomis faktorių koncentracijomis ir be GuHCl

Abu kartus jau pradinėje ląstelių suspensijoje buvo didelė (apie 50%) baltymų ir G6PDH koncentracija, vadinasi inkubacijos metu atsiranda pažaidos ląstelių sienelėje. Ilgesnį laiką pastovėjęs supernatantas ima drumstis ir baltymai krenta į nuosėdas, todėl gamybiniam ardymui toks metodas netinka. Dėl galimų limitacijų proceso eigoje ir kalendoriniame grafike dažnai chromatografiniai metodai užtrunka kelias dienas ir dėl suspensijoje esančio guanidino chlorido gali specifinis baltymas denatūruoti, todėl buvo nuspręsta jo visai atsisakyti. Konkrečiu atveju mūsų specifinis baltymas yra pakankamai jautrus įvairiems faktoriams, tačiau gryninant stabilesnį baltymą GuHCl gali būti panautojas kaip papildomas priedas palengvinantis suardymą.

Ardant optimaliomis parinktų faktorių koncentracijomis be GuHCl , suardymo efektyvumas pagal gamybinį, padidėjo 83%, iki $V=0,489$. Po chromatografinio gryninimo NdeI restrikcijos endonukleazės išeiga 11,78 kvnt/g t.y. didesnė 26% nei gauta po gamybinio ardymo.

IŠVADOS

- 1) Tyrimo metu nustatyta, jog analitiniai baltymų, dehidrogenazių ir specifinio gryninamo baltymo koncentracijos matavimo metodai bei dalelių dydžio matavimas ir mikroskopinė analizė yra tinkamiausi metodai ardymo efektyvumui įvertinti. Nukleorūgščių ir polisacharidų koncentracijos nustatymui įtakos turi buferinio tirpalo komponentai ir jų koncentracijos. Polisacharidų kiekis kinta nuo ląstelės sienelės pažeidimo lygio, o suardymo tikslas yra specifinio bioproducto išleidimas į išorę.
- 2) Nustatyta, jog laboratoriniams *Neisseria denitrificans* ląstelių kiekiams ardyti efektyviau naudoti ultragarsinį dezintegratorių, kuriuo 1 gramas *Neisseria denitrificans* ląstelių suardomas per 2,4 min., t.y. beveik 3 kartus greičiau nei rutuliniu malūnu, ir ardymui sunaudojama 28513 J energijos. Gamyboje tikslinga naudoti mikroskystintuvą: jo našumas 12 L/val, suardo 1 gramą *Neisseria denitrificans* per 8,4 s, t.y. 71% greičiau nei didelio slėgio homogenizatorius APV–2000 ir tam sunaudojama 13749 J energijos.
- 3) Ardymo efektyvumui įvertinti buvo modifikuota pirmo laipsnio kinetinė lygtis. Panaudojant gautas pirmo laipsnio kinetines konstantas, nustatyti suardymo greičiai visiems naudotiems ardymo metodams: fermentinis – 0,35, RM – 0,39, UG – 1,36, APV – 6,41, MS – 14,28 suardymas/min.
- 4) Keičiant biologinius, konstrukcinius ir išorinius parametrus, buvo optimizuotas *Neisseria denitrificans* ląstelių ardymo mikroskystintuvu procesas:
 - ląstelių augintų iki 1 O.V. ardymo greitis 22% didesnis nei augintų iki 3 O.V.;
 - Z tipo celė suardo ląsteles 68% efektyviau nei Y tipo celė, tačiau pasireiškė nuolaužų sedimentacijos greičio sumažėjimas ir pastebėtas NdeI restrikcijos endonukleazės aktyvumo kritimas;
 - naudojant didesnę nei 125 MPa slėgį, ląstelės suardomos greičiau, bet pasireiškia baltymų stabilumo sumažėjimas ir po suardymo gaunamos mažesnės ląstelių nuolaužos, kas apsunkina tolesnį ląstelių suspensijos skaidrinimą;
 - patikrinus 8 išorinius ardymo efektyvumą lemiančius faktorius plačiuose intervaluose, nustatytos optimalios jų reikšmės: buferinio ardymo tirpalo pH 9,0, NaCl koncentracija 50 mM, 10 mM EDTA, 0,2% Triton X–100, ląstelių koncentracija 0,2 g/mL, brinkinimo trukmė 90 min. Efektyvumas pagal gamybinį suardymą padidėjo 83%, iki V=0,489. Po chromatografinio gryninimo NdeI restrikcijos endonukleazės išeiga 11,78 kvnt/g, t.y. didesnė 26% nei gauta po gamybinio ardymo. Su GuHCl ardymo efektyvumas padidėja, tačiau dėl specifinio baltymo denatūravimo, jo atsisakyta. Pridėjus 0,4% PEI suardymo

greitis krito 3,5 karto. Restrikcijos endonukleazė iškrito į nuosėdas, bet G6PDH santykinis aktyvumas padidėjo 4 kartus.

Nerijus Makauskas

.....

LITERATŪRA

1. Ahmad-Raus R.; Mel M.; Mohd-Abdullah S.N.; Yusoff K. 2010. *Cell Rupture of Recombinant Escherichia coli using High Pressure Homogenizer*. Journal of Applied Sciences, Volume: 10, Issue: 21, Page No.: 2717-2720.
2. Ahmed H. 2005. *Principles and reactions of protein extraction, purification, and haracterization*. CRC press, JAV.
3. Alberts B.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 5 leidimas.
4. Anand H.; Balasundaram B.; Pandit A.B.; Harrison S.T.L. 2007. *The effect of chemical pretreatment combined with mechanical disruption on the extent of disruption and release of intracellular protein from E. coli*. Biochemical Engineering Journal Volume 35, Issue 2, Pages 166-173.
5. Bailey S.M.; Blum P.H.; Meagher M.M. 1995. *Improved homogenization of recombinant Escherichia coli following pretreatment with guanidine hidrochloride*. Biotechnol Prog. Sep-Oct;11(5):533-9.
6. Balasundaram B.; Harrison S. T. L. 2006. *Study of physical and biological factors involved in the disruption of E. coli by hydrodynamic cavitation*. Biotechnol. Prog.22: 907-913.
7. Balasundaram B.; Pandit A. B. 2001. *Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation*. Biochem.Eng. J. 8: 251-256.
8. Baldwin C. V.; Robinson C.W. 1994. *Enhanced disruption of Candida utilis using enzymatic pretreatment and high-pressure homogenization*. Biotechnology and Bioengineering Volume 43, Issue 1, pages 46–56.
9. Baldwin, C.; Robinson C. W. 1990. *Disruption of Saccharomyces cerevisiae using enzymatic lysis combined with high-pressure homogenization*. Biotechnology Techniques, 4(5), 329–334.
10. Belo I.; Santos J.A.; Cabral J.M.; Mota M. 1996. *Optimization Study of Escherichia coli TBI Cell Disruption for Cytochrome b5 Recovery in a Small-Scale Bead Mill*. Biotechnol Prog. 12(2):201-4.
11. Benov L.; Al-Ibraheem J. 2002. *Disrupting Escherichia coli: A comparison of methods*. J. Biochem. Mol. Biol. 35: 428-431.
12. Brookman J. S. G. 1975. *Further studies on the mechanism of cell disruption by extreme pressure extrusion*. Biotechnol Bioengng Nr. 17, P: 465-479.

13. Bruckner A. 1980. *The kinetic determination of glucose with the glucose dehydrogenase method using the Eppendorf automatic analyzer 5040*. J Clin Chem Clin Biochem. (5):275-8.
14. Bury D.; Jelen P.; Kalab M. 2001. *Disruption of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: A comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling*. Innovat. Food Sci. Emerg. Technol. 2: 23-29.
15. Buttcher V.; Quanz M.; Willmitzer L. 1999. *Molecular cloning, functional expression and purification of a glucan branching enzyme from Neisseria denitrificans*. Biochimica et Biophysica Acta. 406-412.
16. Chang Y. K.; Chu L. 2007. *A simple method for cell disruption by immobilization of lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite*. Biochem. Eng. J. 35: 37-47.
17. Chisti Y.; Moo-Young M. 1986. *Disruption of microbial cells for intracellular products*. Enzyme Microbiology and Technology, 8,194–204.
18. Collis M. A.; O'Neill B. K.; Middelberg A. P. J. 1995. *Thermal deactivation affects disruption of E. coli*. Biotechnology Techniques, 9(2), 91–94.
19. Doulah M.S. 1977. *Mechanism of Disintegration of Biological Cells in Ultrasonic Cavitation*. Biotechnology and bioengineering, Nr.19, P:649-660.
20. Durieux A.; Simon J.-P. 2002. *Focus on biotechnology: Applied Microbiology*, Nr. 2. Kluwer academic publishers, JAV. P: 155-180.
21. Engler C. R. 1985. *Disruption of microbial cells in comprehensive biotechnology*. In M. Moo-Young, & C.L. Cooney (Eds.), Vol. 2 (pp. 305–324). UK: Pergamon.
22. Engler C. R., Robinson C. W. 1981. *Effects of organism type and growth conditions on cell disruption by impingement*. Biotechnology Letters, 3(2), 83–88.
23. Farkade V. D.; Harrison S.T.L.; Pandit A. B. 2006. *Improved cavitation cell disruption following pH pretreatment for the extraction of β -galactosidase from Kluyveromyces fragilis*. Biochemical Engineering Journal Volume 31, Issue 1, Pages 25-30.
24. Feliu J. X.; Cubarsi R.; Villaverde A. 1998. *Optimized Release of Recombinant Proteins by Ultrasonication of E.coli Cells*. Biotechnol Bioeng. Jun 5;58(5):536-40.
25. Garrido F.; Chisti Y.; Moo-Young M. 1994. *Disruption of recombinant yeast for the release of β -galactosidase*. Bioseparation, Nr.4.
26. Geciova J.; Bury D.; Jelen P. 2002. *Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - a review*. International Dairy Journal 12 541–553.

27. Guerlava P.; Izac V.; Tholozan J. L. 1998. *Comparison of different methods of cell lysis and protein measurements in Clostridium perfringens: Application to the cell volume determination*. Curr. Microbiol. 36: 131-135.
28. Gurpilhares D.B.; Hasmann F.A.; Pessoa Jr.A.; Roberto I.C. 2006. *Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from Candida guilliermondii by disruption with glass beads*. Enzyme and Microbial Technology Volume 39, Issue 4, 2 August, Pages 591-595.
29. Harris E. L.V.; Angal S. 1989. *Protein purification methods*. New York: Oxford University Press, 317 p.
30. Harrison S. T. L. 1991. *Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products*. Biotech. Adv. Nr. 9, P.: 217-240.
31. Helander I.M.; Alakomi H.L.; Latva-Kala K.; Koski P. 1997. *Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria*. Microbiology. Oct;143 (Pt 10):3193-9.
32. Helander I.M.; Latva-Kala K.; Lounatmaa K. 1998. *Permeabilizing action of polyethyleneimine on Salmonella typhimurium involves disruption of the outer membrane and interactions with lipopolysaccharide*. Microbiology 144, 385-390.
33. Ho C. W.; Chew T. K.; Ling T. C.; Kamaruddin S.; Tan W. S.; Tey B. T. 2006. *Efficient mechanical cell disruption of Escherichia coli by an ultrasonicator and recovery of intracellular hepatitis B core antigen*. Process Biochem. 41: 1829-1834.
34. Ho C. W.; Tan W. S.; Yap W. B.; Ling T. C.; Tey B. T. 2008. *Comparative Evaluation of Different Cell Disruption Methods for the Release of Recombinant Hepatitis B Core Antigen from Escherichia coli*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 13: 577-583.
35. Isaac L.; Ware G.C. 1974. *The flexibility of bacterial cell walls*. J Appl Bacteriol. Sep;37(3):335-339.
36. Isenberg H.D. 1995. *Essential Procedures for clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
37. James C. J.; Coakley W. T.; Hughes D. E. 1972. *Kinetics of Protein Release from Yeast Sonicated in Batch and Flow Systems at 20 kHz*. Biotechnology and Bioengineering Volume 14, Issue 1, pages 33-42.
38. Kapucu H.; Nursel Gulsoy N.; Mehmetogulu U. 2000. *Disruption and protein release kinetics by ultrasonication of Acetobacter peroxydans cells*. Biochemical Engineering Journal Volume 5, Issue 1, Pages 57-62.
39. Kula M. R.; Shutte H. 1987. *Purification of proteins and the disruption of microbial cells*. Biotechnology Progress, 3, 31-42.

40. Kulys J.; Vidžiūnaitė R. 2000. *The role of micelles in mediator-assisted peroxidase catalysis*. Progress in Colloid and Polymer Science, Vol 116, p.137-142.
41. Lanigan M. D.; Vaughan J. A.; Shiell B. J.; Beddome G. J.; Michalski W. P. 2004. *Mycobacterial proteome extraction: Comparison of disruption methods*. Proteomics 4: 1094-1100.
42. Lederberg J. 1956. *Bacterial protoplasts induced by penicillin*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 42, 574–577.
43. Limonet M.; Saffroy S.; Maujean F.; Linder M.; Delaunay S. 2007. *A comparison of disruption procedures for the analysis of phospholipids from Streptomyces pristinaespiralis*. Process Biochem. 42: 700-703.
44. Lodish H.; Berk A.; Kaiser C.A.; Krieger M. 2007. *Molecular Cell Biology*. 6 leidimas, W. H. Freeman.
45. Mackenzie C. R.; McDonald I. J.; Johnson K. G. 1980. *Antibiotic Resistance in Neisseria denitrificans Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Antimicrob Agents Chemother; 17(5): 789-797.
46. Mayerhoff Z.D.V.L.; Franco T.T.; Roberto I.C. 2008. *A study of cell disruption of Candida mogii by glass bead mill for the recovery of xylose reductase*. Separation and Purification Technology Volume 63, Issue 3, Pages 706-709.
47. Martin J.E. Jr.; Peacock W.L. Jr.; Reising G.; Kellogg D.S. Jr.; Ribi E.; Thayer D.J.D. 1969. *Preparation of Cell Walls and Protoplasm of Neisseria with the Ribi Cell Fractionator*. Journal of Bacteriology, p. 1009-1011, Vol. 97, No. 3.
48. Mendelson N. H.; Favre D. 1987. *Regulation of Bacillus subtilis macrofiber twist development by ions: effects of magnesium and ammonium*. J. Bacteriol. 169:519-525.
49. Mendelson N. H.; Favre D.; Thwaites J. J. 1984. *Twisted states of Bacillus subtilis macrofibers reflect structural states of the cell wall*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3562-3566.
50. Middelberg A. P. J. 1995. *Process-scale disruption of microorganisms*. Biotechnology Advances, 13(3), 491–551.
51. Mojsin M.; Nikčević G.; Grujić N.K.; Savic T.; Petrovic I.; Stevanovic M. 2005. *Purification and functional analysis of the recombinant protein Isolated from E. coli by employing three different methods of bacterial lysis*. J. Serb. Chem. Soc. 70 (7) 943–950.
52. Moore E. K.; Hoare M.; Dunnili P. 1990. *Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: New evidence on mechanis*. Enzyme and Microbial Technology Volume 12, Issue 10, Pages 764-770.

53. Ni H.; Chen Q.; He G.; Wu G.; Yang Y. 2008. *Optimization of acidic extraction of astaxanthin from Phaffia rhodozyma*. J Zhejiang Univ Sci B; 9(1): 51–59.
54. Pandolfe W.D. 1993. *Cell disruption by homogenization* Gaulin Rannie APV homogenizer group. 20 p.
55. Ramanan R. N.; Tey B. T.; Ling T.Ch.; Ariff A.B. 2009. *Classification of Pressure Range Based on the Characterization of Escherichia coli Cell Disruption in High Pressure Homogenizer*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology 5 (1): 21-29.
56. Ren X.; Yu D.; Yu L.; Gao G.; Han S.; Feng Y. 2007. *A new study of cell disruption to release recombinant thermostable enzyme from Escherichia coli by thermolysis*. J. Biotechnol. 129: 668-673.
57. Ricci-Silva M.E.; Vitolo M.; Abrahao-Neto J.; 2000. *Protein and glucose 6-phosphate dehydrogenase releasing from baker's yeast cells disrupted by a vertical bead mill*. Process Biochemistry Volume 35, Issue 8, Pages 831-835.
58. Roe S. 2006. *Protein purification techniques*, Sec. Bioseparation, Nr.4.
59. Shynkaryk M.V.; Lebovka N.I.; Lanoisellé J.L.; Nonus M.; Bedel-Clotour C.; Vorobiev E. 2009. *Electrically-assisted extraction of bio-products using high pressure disruption of yeast cells (Saccharomyces cerevisiae)*. Journal of Food Engineering Volume 92, Issue 2, Pages 189-195.
60. Shutte H.; Kroner K. H.; Hustedt H.; Kula M.-R. 1983. *Experience with a 20 litre industrial bead mill for the disruption of microorganism*. Enzyme and Microbial Technology, 5, 143–148.
61. Song D. D.; Jacques N. A. 1997. *Cell disruption of Escherichia coli by glass bead stirring for the recovery of recombinant proteins*. Anal. Biochem. 248: 300-301.
62. Sutherland I. W. 1975. *The bacterial wall and surface*. Process Biochemistry, 10(3), 4–8.
63. Thwaites J. J.; Surana U. C.; Jones A. M. 1991. *Mechanical properties of Bacillus subtilis cell walls: effects of ions and lysozyme*. J. Bacteriol. 173: 204-210.
64. van Gaver D.; Huyghebaert A. 1991. *Optimization of yeast cell disruption with a newly designed bead mill*. Enzyme and Microbial Technology Volume 13, Issue 8, Pages 665-671.
65. Van Hee P.; Middelberg A. P. J.; Van Der Lans R. G. J.; Van Der Wielen L. A. M. 2004. *Relation between cell disruption conditions, cell debris particle size and inclusion body release*. Biotechnol. Bioeng. 88: 100-110.

66. van Hee P.; Middelberg A. P.J.; van der Lans R.G.J.M.; van der Wielen L.A.M. 2004. *Relation between cell disruption conditions, cell debris particle size, and inclusion body release*. Applied Biotechnology and Bioengineering Volume 88, Issue 1, pages 100–110.
67. Weibull C. 1953. *The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme*. J. Bacteriol. 66, 688–695
68. Weidel W.; Frank H.; Martin H. H. 1960. *The rigid layer of the cell wall of Escherichia coli strain B*. J. Gen. Microbiol. 22, 158–166.
69. Weidel W.; Pelzer H. 1964. *Bagshaped macromolecules — a new outlook on bacterial cell walls*. Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 26, 193–232
70. Zhang Z.; Ferenczi M.A.; Lush A.C.; Thomas C.R. 1991. *A novel micromanipulation technique for measuring the bursting strength of single mammalian cells*. Applied Microbiology and Biotechnology, Nr. 36, P:208-210.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju už kantrybę ir kryptingą vadovavimą vadovui Robert Stupak, visam Technologijų vystymo padalinio kolektyvui už pagalbą ir pastabas. Taip pat didžiausia padėka už nuolatinį palaikimą Dianai.