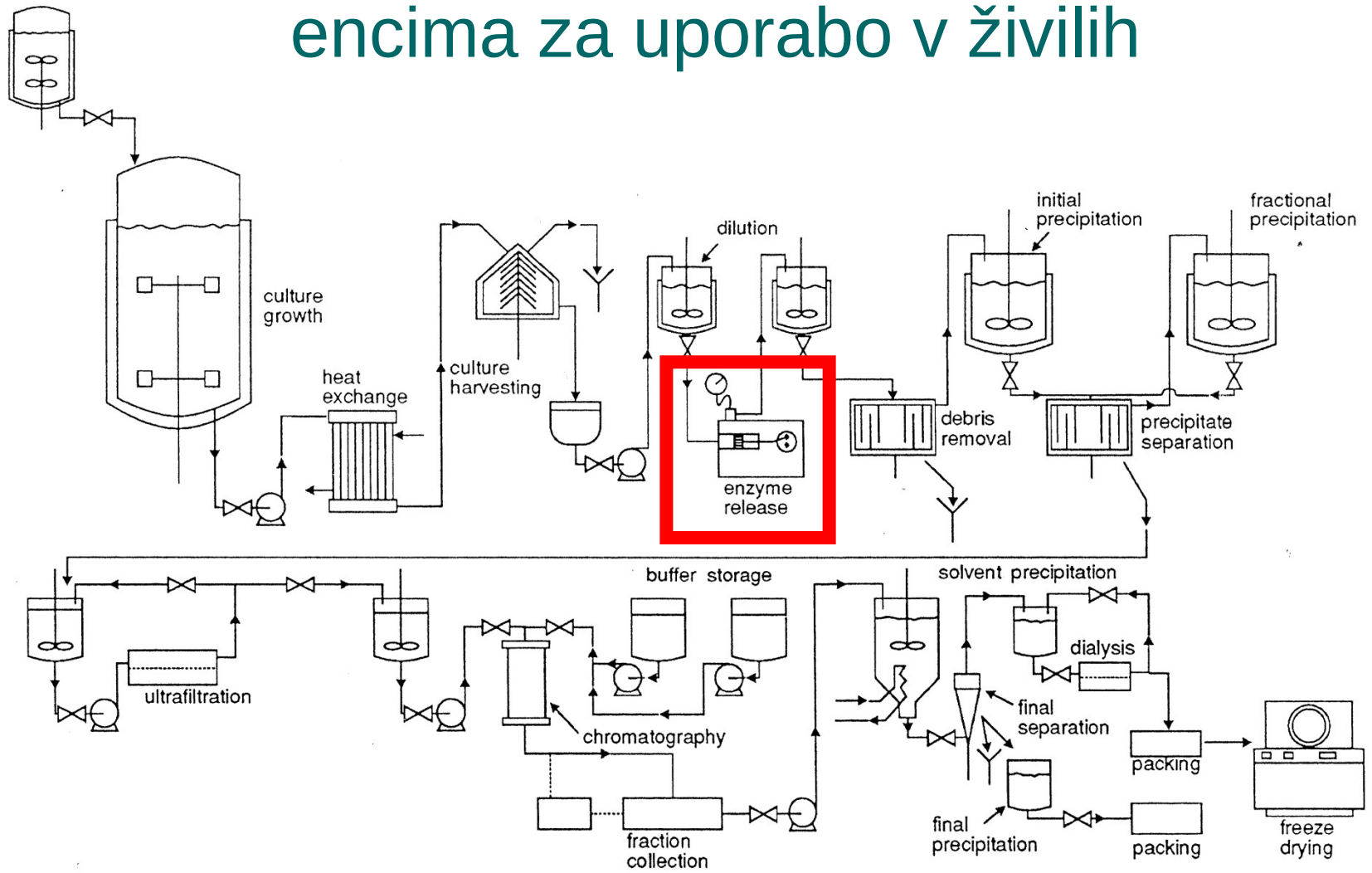


ZAKLJUČNI PROCESI V BIOTEHNOLOGIJI

Razbitje celic za izolacijo intracelularnih
produktov

Izolacija in čiščenje intracelularnega encima za uporabo v živilih



Intracelularni produkti

- proteini (inkluzijska telesa)
- lipidi
- antibiotiki

tradicionalni intracelularni produkti

glukoza-izomeraza
 β -galaktozidaza
fosfataza
etanol-dehidrogenaza (ADH)
NADH/NAD⁺
alkaloidi

rDNA intracelularni produkti

inzulin (*E. coli*/živalske celice)
imunoglobulin
interferoni (živalske celice)
hormon rasti (*E. coli*)
humani serum albumin
faktor VIII (živalske celice)
streptokinaza (živalske celice)

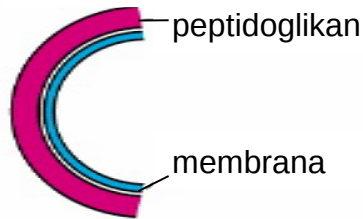
Industrij-sko
uporabni
intracelu-larni
encimi

encim	EC število	Vir	Intra/ekstra -celularni	Velikost proizvodnje	Industrijska uporaba
encimi živalskega izvora					
katalaza	1.11.1.6	jetra	I	< 1 tona/leto	živila
encimi rastlinskega izvora					
lipoksigenaza	1.13.11.12	soja	I	< 1 tona/leto	živila
encimi bakterij					
asparaginaza	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	I	< 1 tona/leto	zdravje
glukoza-izomeraza	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	I	> 10 ton/leto	fruktozni sirup
penicilin-amidaza	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	I	< 1 tona/leto	farmacevtska ind.
encimi nitastih gliv					
aminoacilaza	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	I	< 1 tona/leto	farmacevtska ind.
katalaza	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	I	< 1 tona/leto	živila
glukoza-oksidaza	1.1.3.4	<i>Aspergillus</i>	I	< 1 tona/leto	živila
α -galaktozidaza (rafinaza)	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	I	< 1 tona/leto	živila
encimi kvasovk					
β -fruktofuranozidaza (invertaza)	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	I/E	< 1 tona/leto	slaščičarne
β -galaktozidaza (laktaza)	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	I/E	< 1 tona/leto	mlekarne
α -galaktozidaza (rafinaza)	3.2.1.22	<i>Saccharomyces</i>	I	< 1 tona/leto	živila

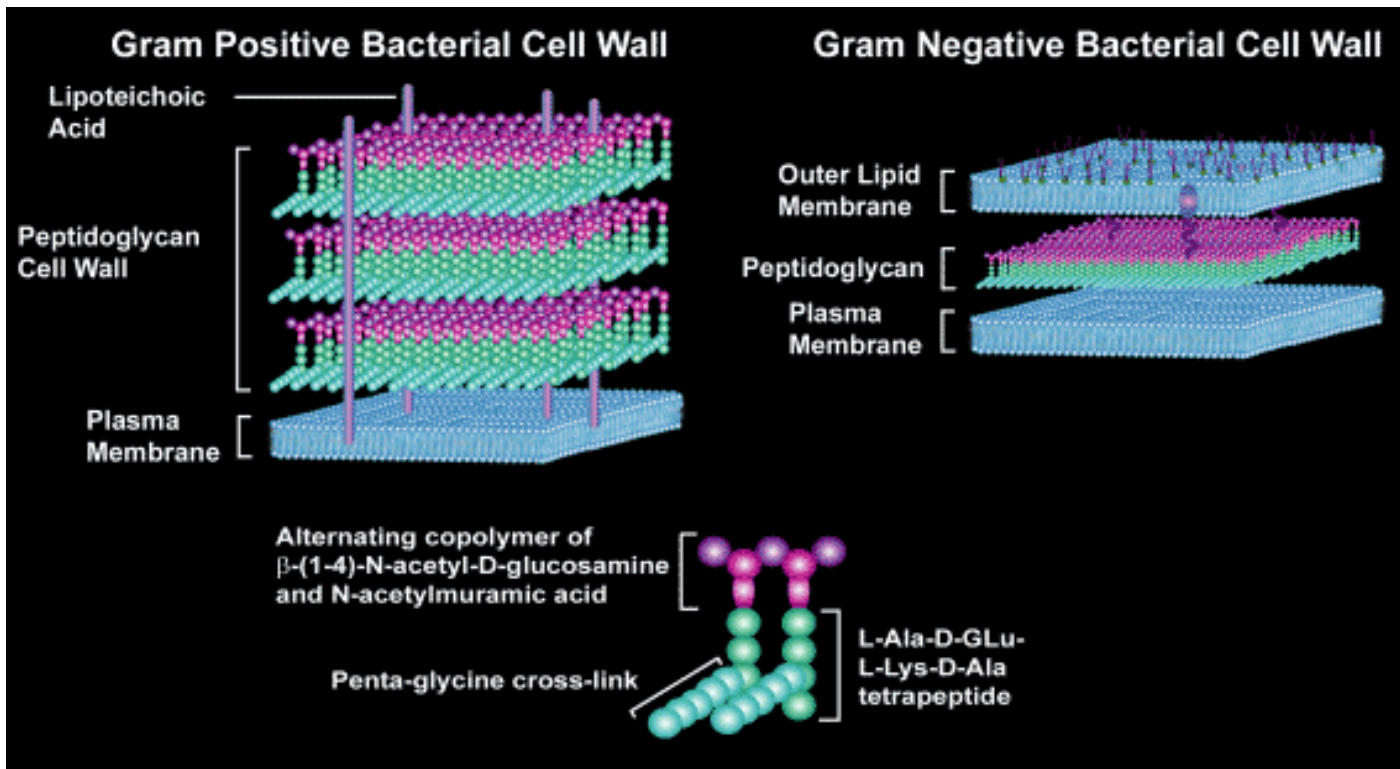
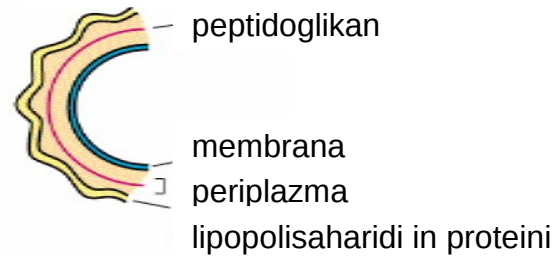
Zgradba celične stene - bakterije

težje
mehansko
razgradljiva

Gram pozitivne

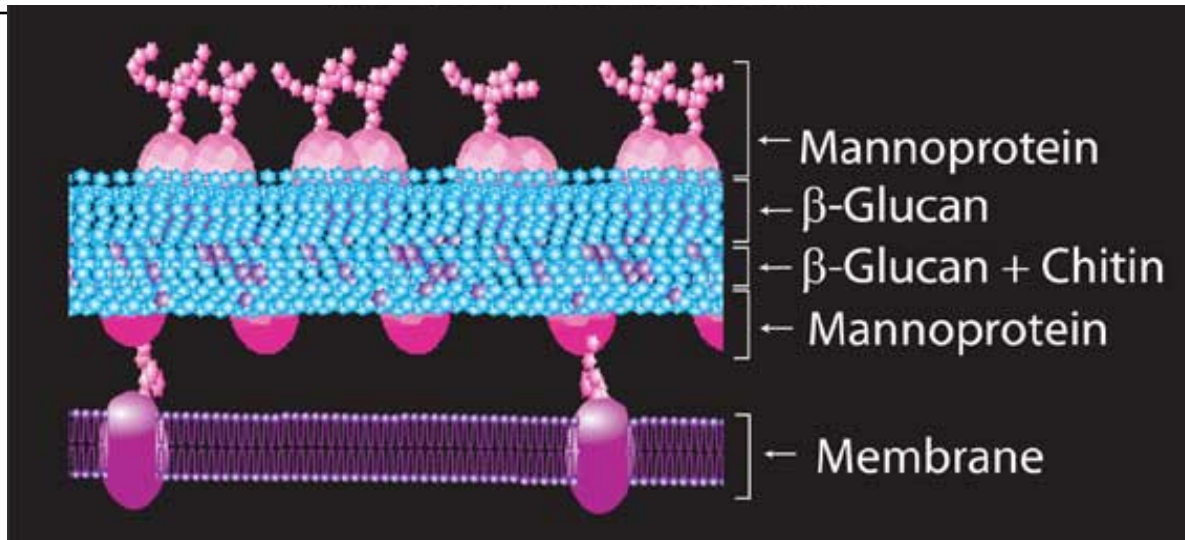


Gram negativne

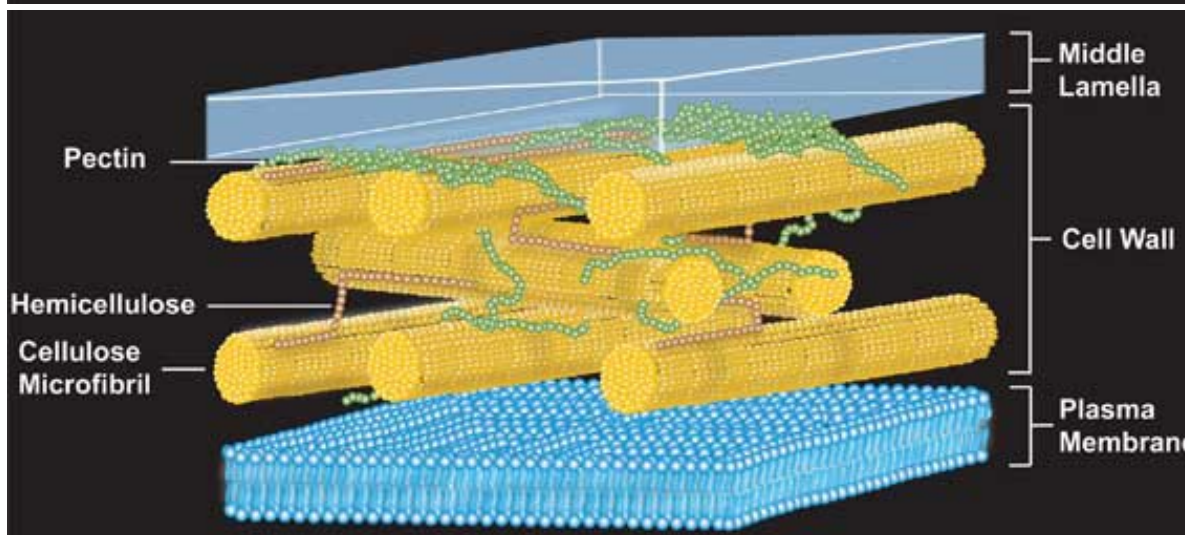


Zgradba celične stene eukariontov – kvasovke, rastline

velike razlike
med
različnimi
vrstami!

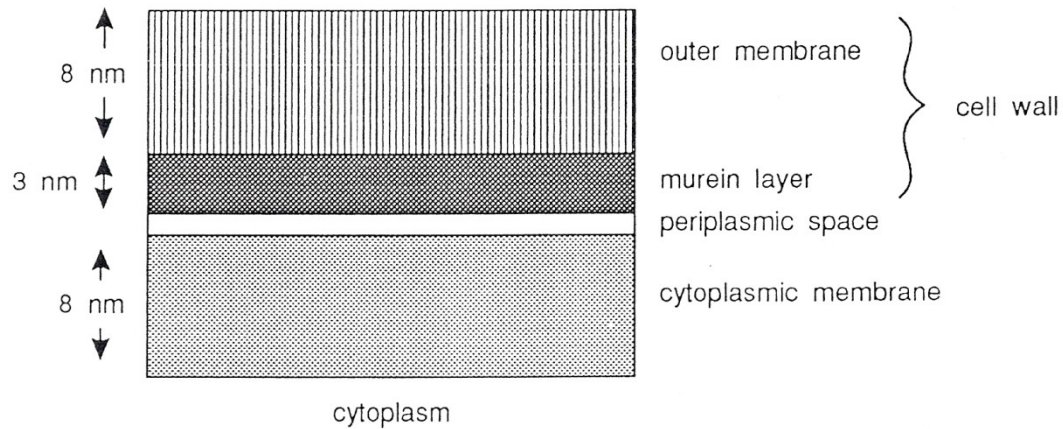


kvasovke



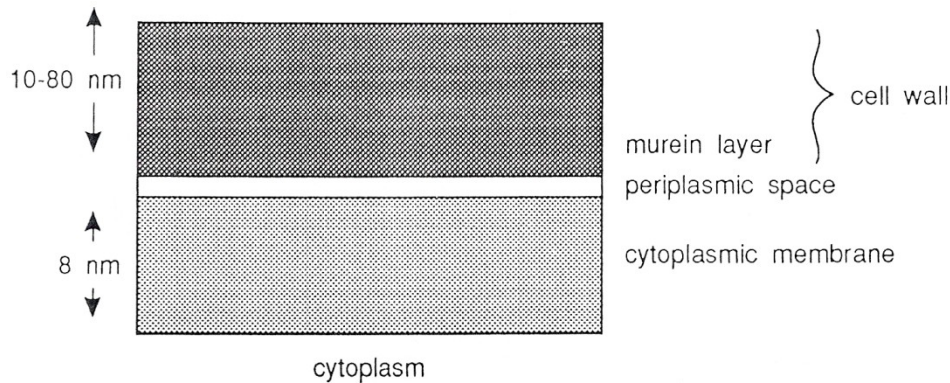
rastline

Zgradba celične stene - primerjava

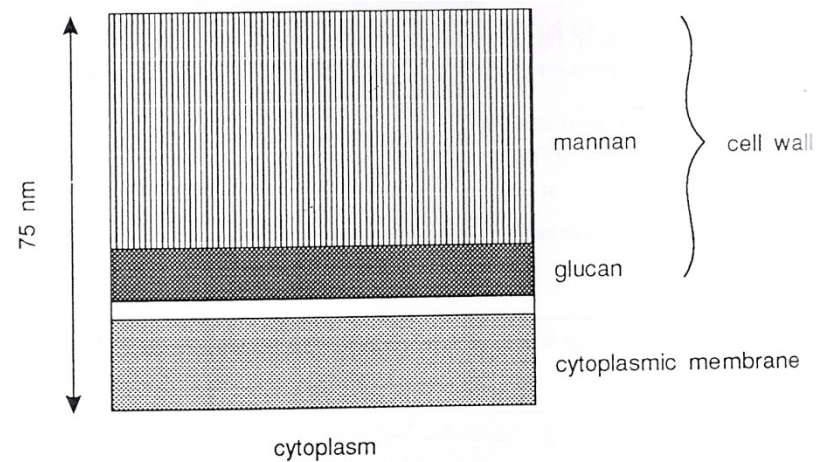


velike razlike
med
različnimi
vrstami!

Gram negativne bakterije



Gram pozitivne bakterije

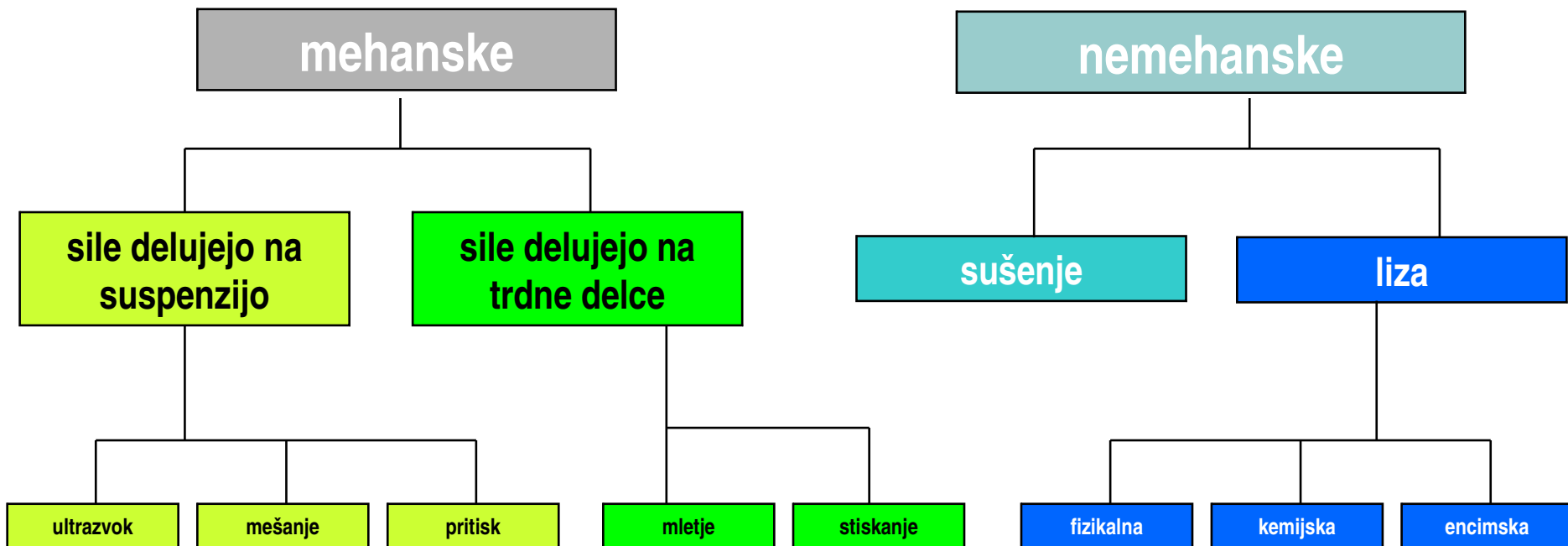


kvasovke

Razbitje celične stene

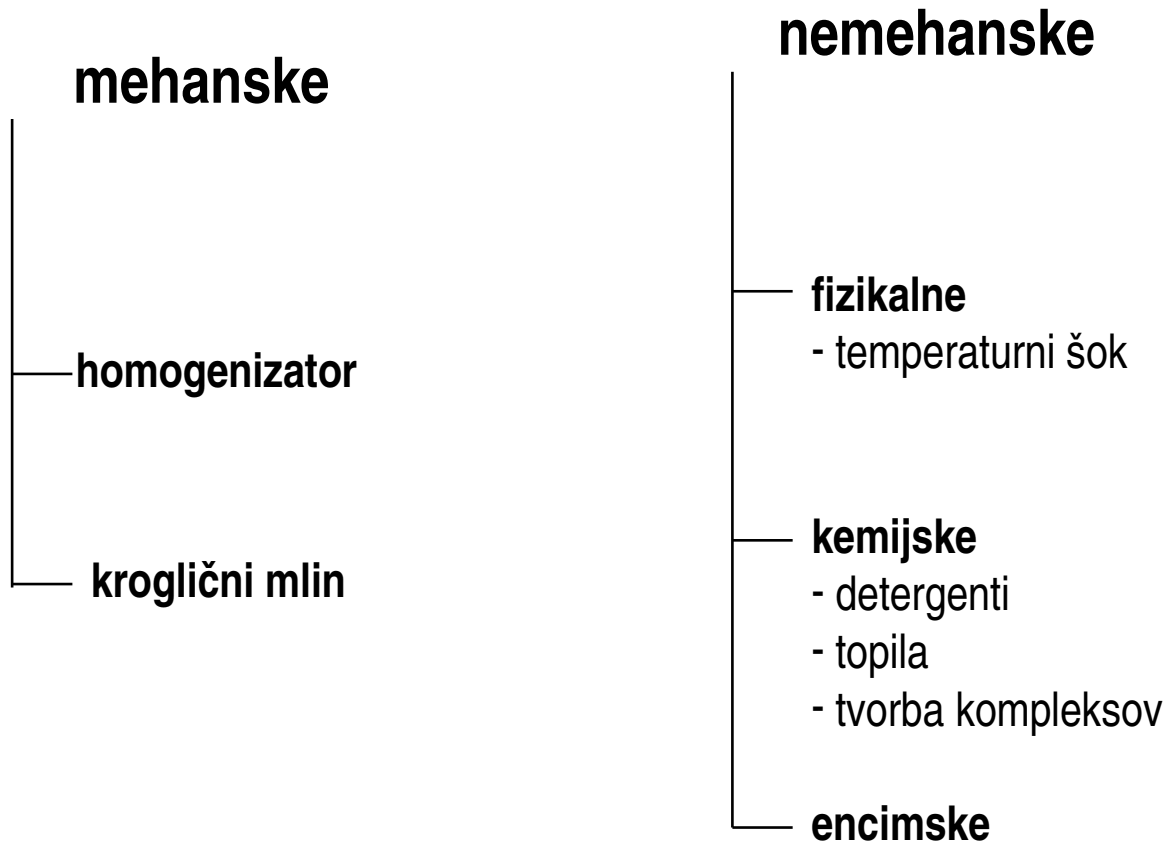
- Vnos energije za razbitje močno odvisen od organizma in do neke mere od njegove fiziologije.
 - Nekateri tipi celic se zelo hitro razbijejo, lahko že z nežno obdelavo kot npr. z osmotskim šokom (npr. živalske celice in nekatere gram-negativne bakterije kot npr. iz vrst *Azotobacter*)
 - Druge celice so močno odporne na mehansko silo: kvasovke, zelene alge, miceliji nitastih gliv, nekatere gram-pozitivne bakterije. Njihove celične stene in membranske strukture lahko prenesejo notranji osmotski pritisk do 20 atm (2 MPa), kar ustreza moči ojačanega betona (ista masa).
- Razvite številne različne metode za razbitje celic.

Metode razbijanja celične stene



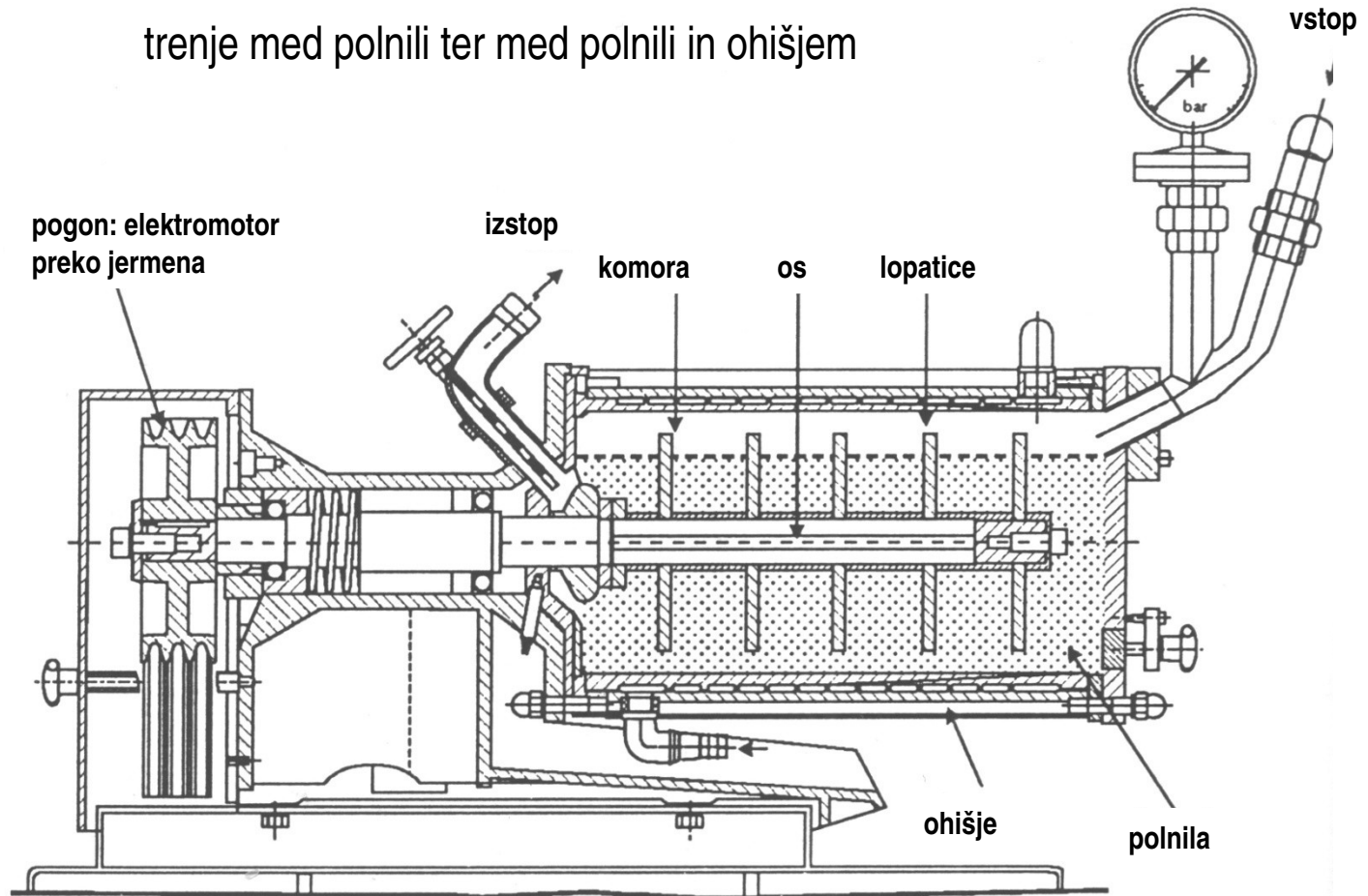
- prevzete iz prehranske industrije (homogenizacija mleka), kemijske industrije (drobljenje pigmentov) ipd.

Industrijske metode razbijanja celične stene



Mehansko razbijanje celic – mlin s polnilom (kroglice)

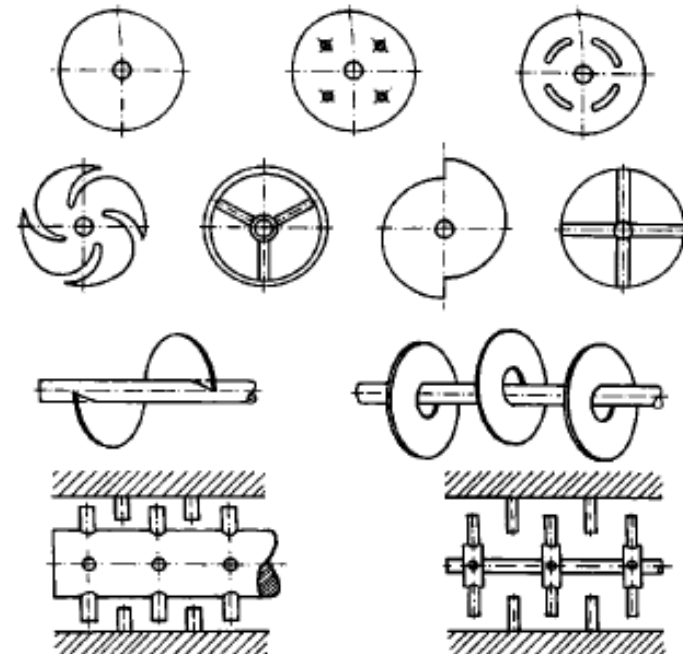
trenje med polnili ter med polnili in ohišjem



Horizontalni mlin s kroglicami

Mehansko razbijanje celic – mlin s polnilom

- horizontalna ali vertikalna izvedba glede na položaj ohišja mlina
 - volumen mlina: od 40 ml do naprav za kontinuirni proces s kapaciteto do 200 kg/h mokrega kvasa ali 20 kg/h mokrih bakterij
 - učinkovitost prenosa energije na polnilo odvisna od oblike rotorja in lopatic (diskov)
-
- ohišje iz jekla (laboratorijski mlin: steklo)
 - polnila:
 - tipična napolnjenost s polnili 80 %
 - iz odpornega materiala: (keramika, steklo, cirkonijev oksid, cirkonijev silikat, titanov karbid)
 - običajni premer polnil: 0,2 -1,0 mm



Geometrije rotorjev in lopatic

Povečanje (*scale-up*) mlina s polnilom:

- problem: toplota, ki se prenaša iz rotorja na celice – potrebno hlajenje (osnovni parameter: A/V)

$$L = \frac{\text{površina } (A)}{\text{volumen mlina } (V)} = \frac{\pi \cdot T \cdot L}{\frac{\pi}{4} \cdot T^2 \cdot L} = \frac{4}{T}$$

L – dolžina mlina (m)
 T – premer valja (m)

- osnovni povečevalni kriterij: vnos moči

$$P = c \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5$$

P – vnos moči (W)

c – brezdimenzijska konstanta

N – hitrost vrtenja rotorja (s^{-1})

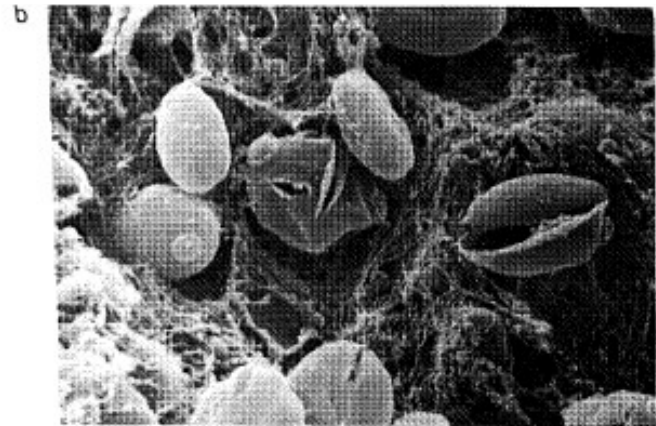
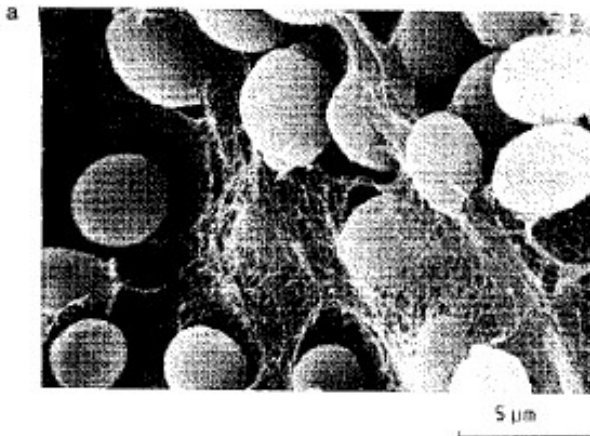
D – premer rotorja z lopaticami (m)

ρ – gostota suspenzije (kg/m^3)

Mehansko razbijanje celic – mlin s polnilom (kroglice)

Na učinkovitost procesa razbijanja celic vpliva:

- vrsta mikroorganizma (sestava in debelina celične stene, velikost celic): v splošnem lažje razbijemo večje celice
- položaj željenega produkta (citoplazma, organele, periplazma)
- tip mlina (premer polnil – bolje manjša, vrsta rotorja in lopatic, napolnjenost s polnilom, hitrost vrtenja rotorja)
- zadrževalni čas
- temperatura



(REM pictures of *Saccharomyces cerevisiae* : a: before, b: after treatment in a bead mill)

Kinetika sprostitve produkta iz celic

kinetika prvega reda:

$$\frac{dP}{dt} = K_b \cdot (P_{max} - P)$$

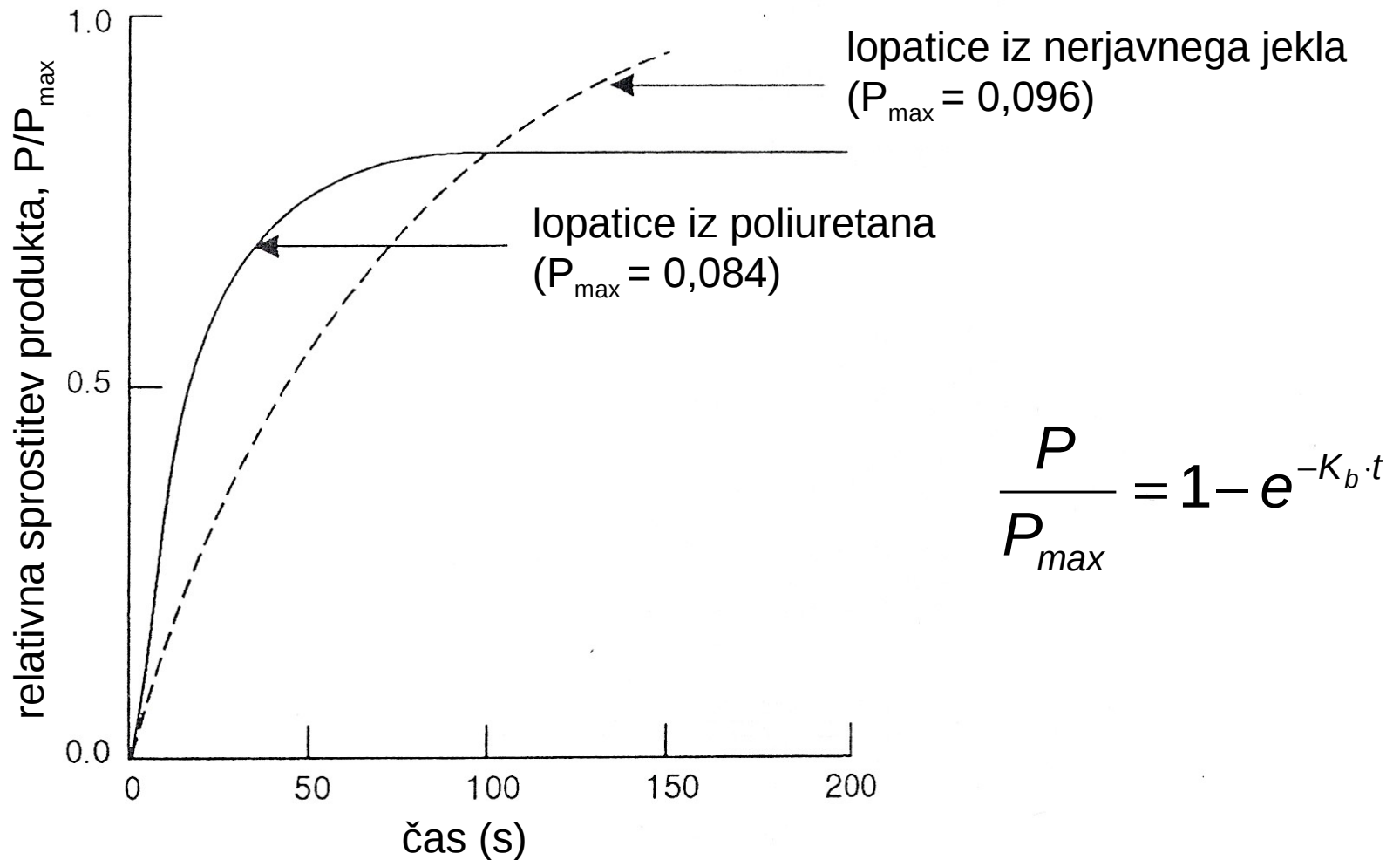
- P : koncentracija sproščenega produkta v času t
- P_{max} : maksimalna koncentracija produkta, ki se lahko sprosti iz celice – določena eksperimentalno
- K_b : konstanta, odvisna od tipa rotorja in lopatic, hitrosti vrtenja rotorja, velikosti polnil, napolnjenosti mlina, temperature

$$\int_0^P \frac{dP}{(P_{max} - P)} = K_b \cdot \int_0^t dt$$

$$-\ln \frac{P_{max}}{(P_{max} - P)} = K_b \cdot t$$

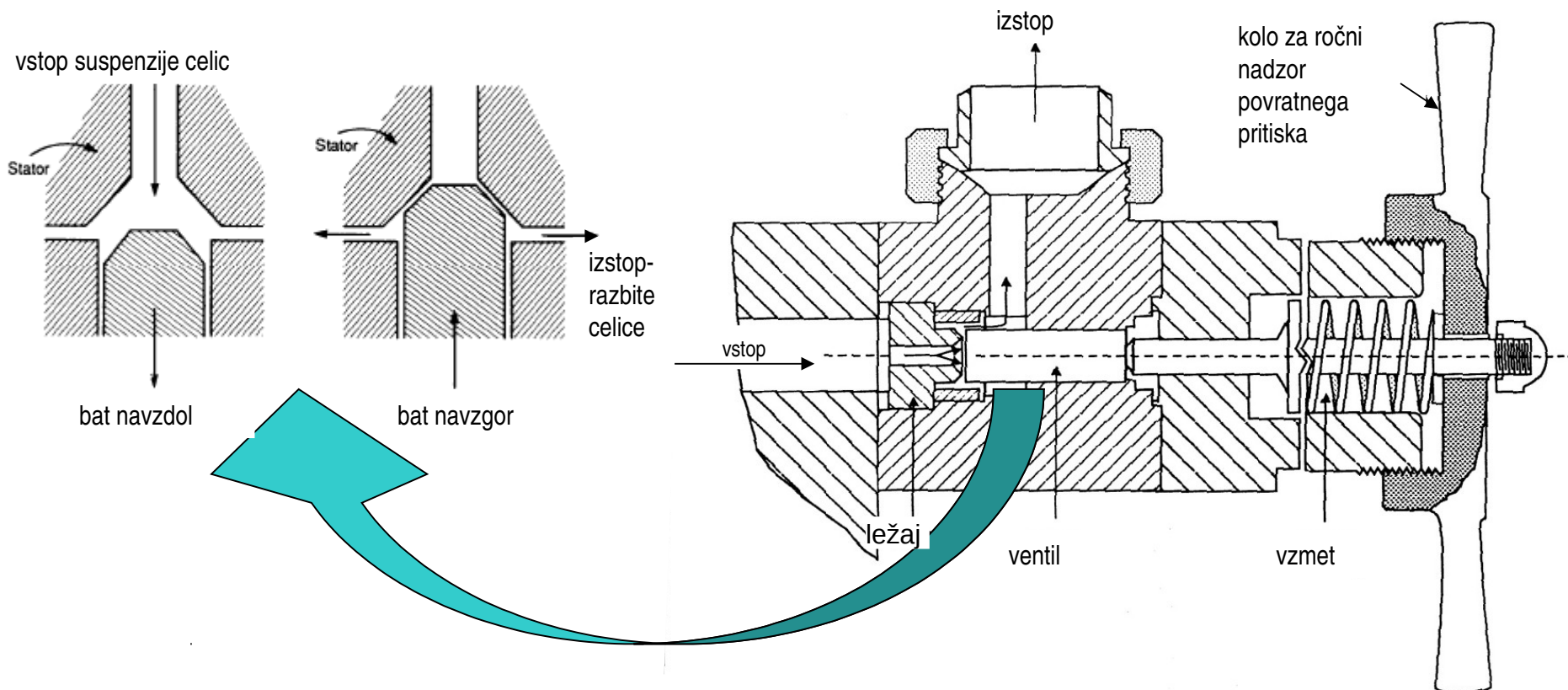
$$\frac{P}{P_{max}} = 1 - e^{-K_b \cdot t}$$

Šaržno razbijanje kvasovk z mlinom – dva različna tipa lopatic



Mehansko razbijanje celic – homogenizator

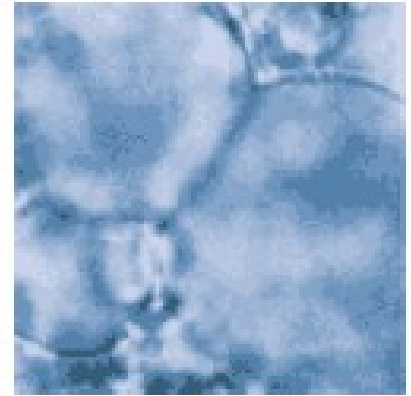
- visokotlačna iztisna črpalka, ki črpa suspenzijo celic skozi nastavljivo odprtino izpušnega ventila
- tlak od 200 do 1000 bar, odvisno od vrste in koncentracije suspenzije celic



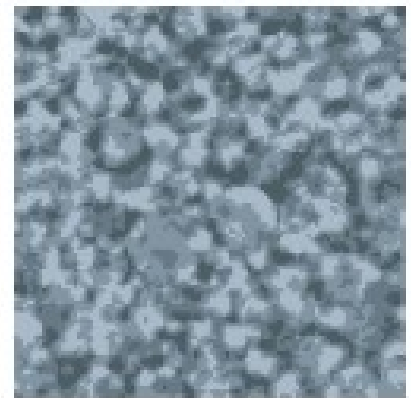
Mehansko razbijanje celic – homogenizator

Na učinkovitost procesa vpliva:

- vrsta mikroorganizma (sestava in debelina celične stene, velikost celic)
- položaj željenega produkta (citoplazma, organele, periplazma)
- tip homogenizatorja (pritisk, tip ventilov in ležajev, temperatura, število prehodov skozi homogenizator)



Pred homogeniziranjem – 5080 μm



Po homogeniziranju – 13 μm

Povečanje (*scale-up*) - homogenizator

- problem: toplota, ki se prenaša iz ventilov in ležajev - ni funkcija geometrije homogenizatorja

$$\Delta T = \frac{\Delta p}{\rho \cdot c_p}$$

ΔT – razlika temperatur (K)

Δp – razlika pritiskov (Pa)

ρ - gostota suspenzije celic (kg/m³)

c_p – specifična toplotna kapaciteta (J/kg K)

- edini povečevalni kriterij je geometrijska podobnost (povečanje ventilov in ležajev) ob zadrževanju enakega pritiska, pretoka in specifičnega vnosa moči

$$P' = \frac{q_v \cdot \Delta p}{m} = \frac{q_v \cdot \rho \cdot c_p \cdot \Delta T}{m}$$

P' – specifični vnos moči (W/kg)

q_v – volumenski pretok (m³/s)

m - masa suspenzije celic (kg)

Kinetika sprostitve produkta iz celic

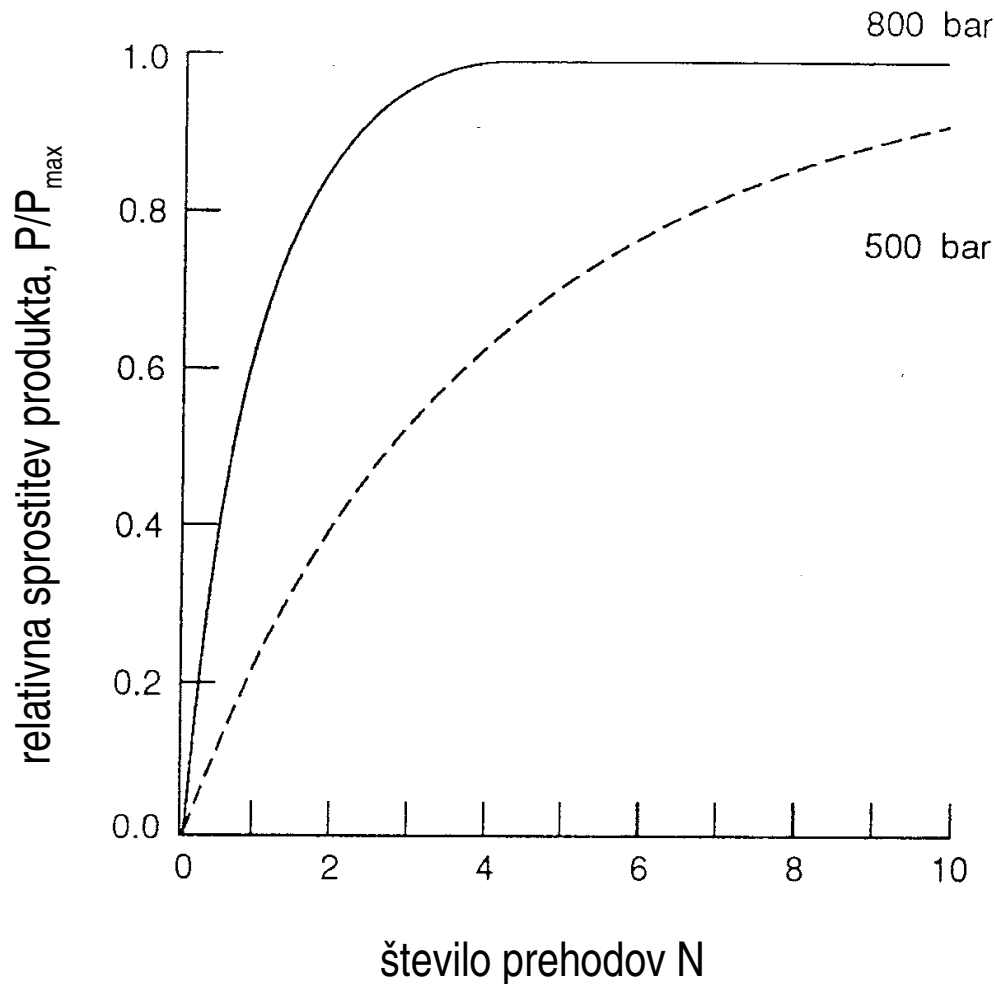
$$\frac{P}{P_{max}} = 1 - e^{-K_h \cdot f(\Delta p) \cdot N}$$

- N – število prehodov skozi homogenizator
- K_h – konstanta, odvisna od jakosti in strukture celic
- $f(\Delta p)$: določa se eksperimentalno, lahko se napove z:

$$f(\Delta p) = \Delta p^\beta \quad \begin{array}{l} \Delta p \text{ (bar)} \\ \beta = 2,9 \text{ za pekovski kvas} \end{array}$$

- višja temperatura – nižja viskoznost – učinkovitejša homogenizacija
– a hitrejša denaturacija proteina!

Vpliv Δp na učinkovitost sproščanja produkta



kvasovke, $T = 5 \text{ }^\circ\text{C}$

$$\frac{P}{P_{\max}} = 1 - e^{-K_h \cdot f(\Delta p) \cdot N}$$

Mehanske metode razbijanja celic

- primerjava

tehnika	princip	vpliv na produkt	cena	primeri
homogenizacija (rezilo)	celice sesekljane v mešalcu	zmeren	zmerna	živalska tkiva in celice
mletje	celice razbite z mletjem z abrazivi	zmeren	poceni	celice nitastih gliv (npr. s kvarčnim peskom)
ultrasonikacija	celice razbite s kavitacijo - ultrazvok	močan	draga	suspenzije celic v majhnem merilu
homogenizacija (homogenizator)	celice, potisnjene skozi majhno odprtino, se razbijejo na osnovi striga	močan	zmerna	industrijsko merilo – suspenzije celic, razen bakterij
drobljenje v krogličnem mlinu	celice zdrobljene med steklenimi ali jeklenimi kroglicami	močan	poceni	industrijsko merilo – suspenzije celic in rastlin

Nemehanske metode razbijanja celic

- temperaturni šok

- temperaturni šok – termoliza
- enostavna in cenena metoda
- uporabna samo za termostabilne produkte
- dvig temperature deaktivira celico in razbije celično steno
- učinkovitost termolize odvisna od: pH, ionske moči, prisotnosti različnih kemijskih komponent (Mg^{2+} stabilizira celično steno)
- skupna učinkovitost termolize od 60-80 %

Kemijske tehnike razbijanja celic

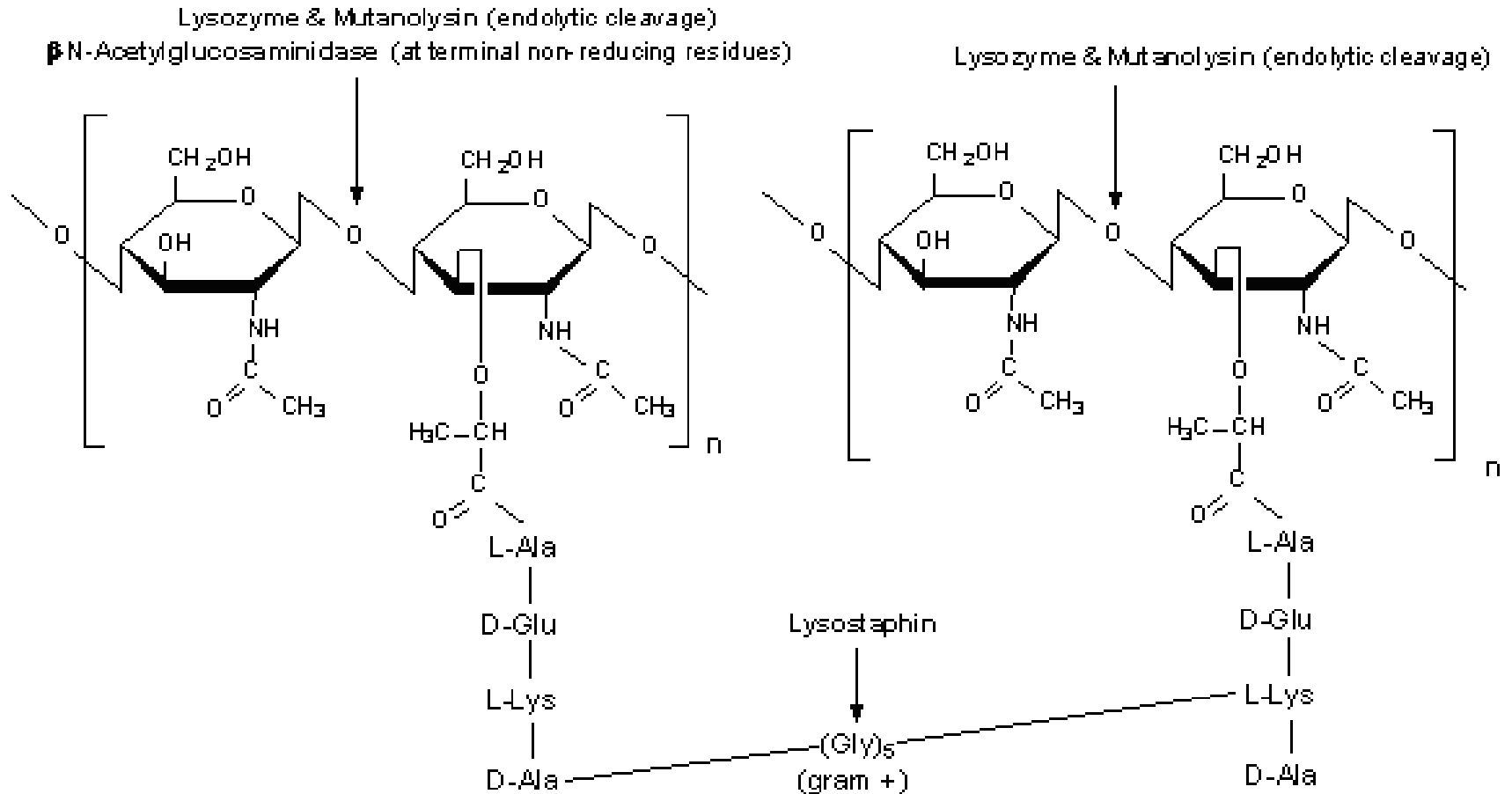
tehnika	princip	vpliv na produkt	cena	primeri
osmotski šok	osmotsko preluknjanje membran	majhen	poceni	rdeče krvne celice
encimska razgradnja	celična stena razgrajena	majhen	draga	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> obdelan z jajčnim lizocimom
solubilizacija	detergenti raztopijo celične membrane	majhen	zmerna -draga	suspenzije celic v majhnem merilu
raztapljanje maščob	organska topila se razopijo v celično steno in jo destabilizirajo	zmeren	poceni	toluen - kvasovke
obdelava z bazami	saponifikacija maščob raztaplja membrane	močan	poceni	proizvodnja L-asparaginaze

Nemehanske metode razbijanja celic

– uporaba encimov

- reakcija suspenzije encimov s celično steno
raztapljanje, razgradnja
- mala poraba energije
- selektivna metoda
- minimalen vpliv na intracelularne produkte
- metoda sprejemljiva za okolje
- pomanjkljivosti:
 - visoka cena encimov
 - nezmožnost izvedbe procesa v večjem merilu (laboratorijska metoda)
 - inhibicija encimov s komponentami reakcijskega medija
 - optimalni pogoji (pH, temperatura, koncentracija kovinskih ionov)
povsem drugačni od optimalnih pogojev procesa biotransformacije

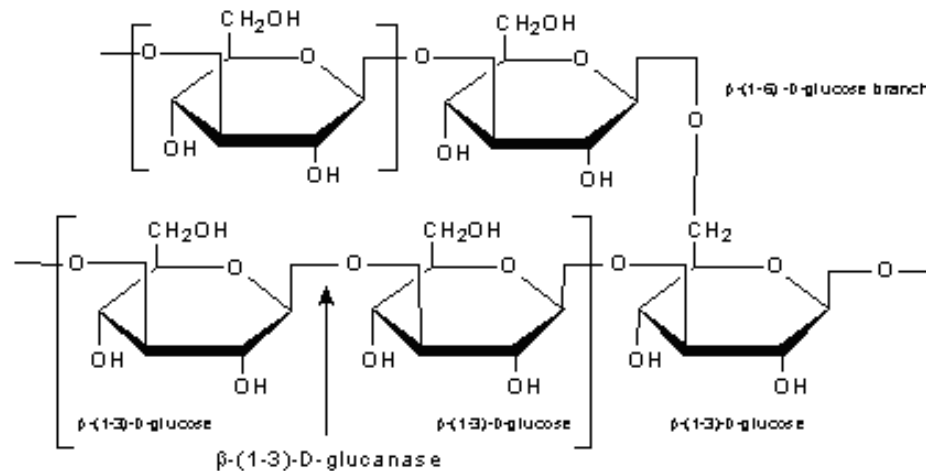
Uporaba encimov za razgradnjo celične stene - bakterije



(direct cross link in gram negative)

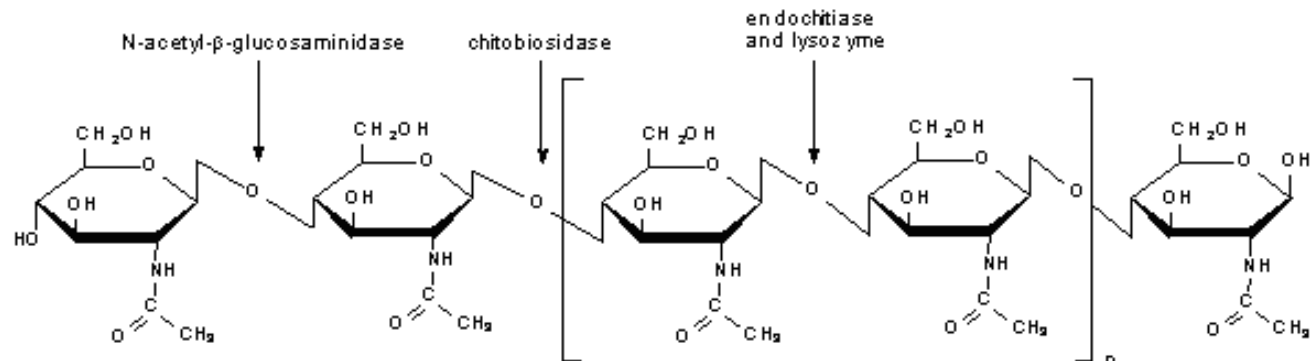
Uporaba encimov za razgradnjo celične stene - kvasovke

Yeast β -Glucan



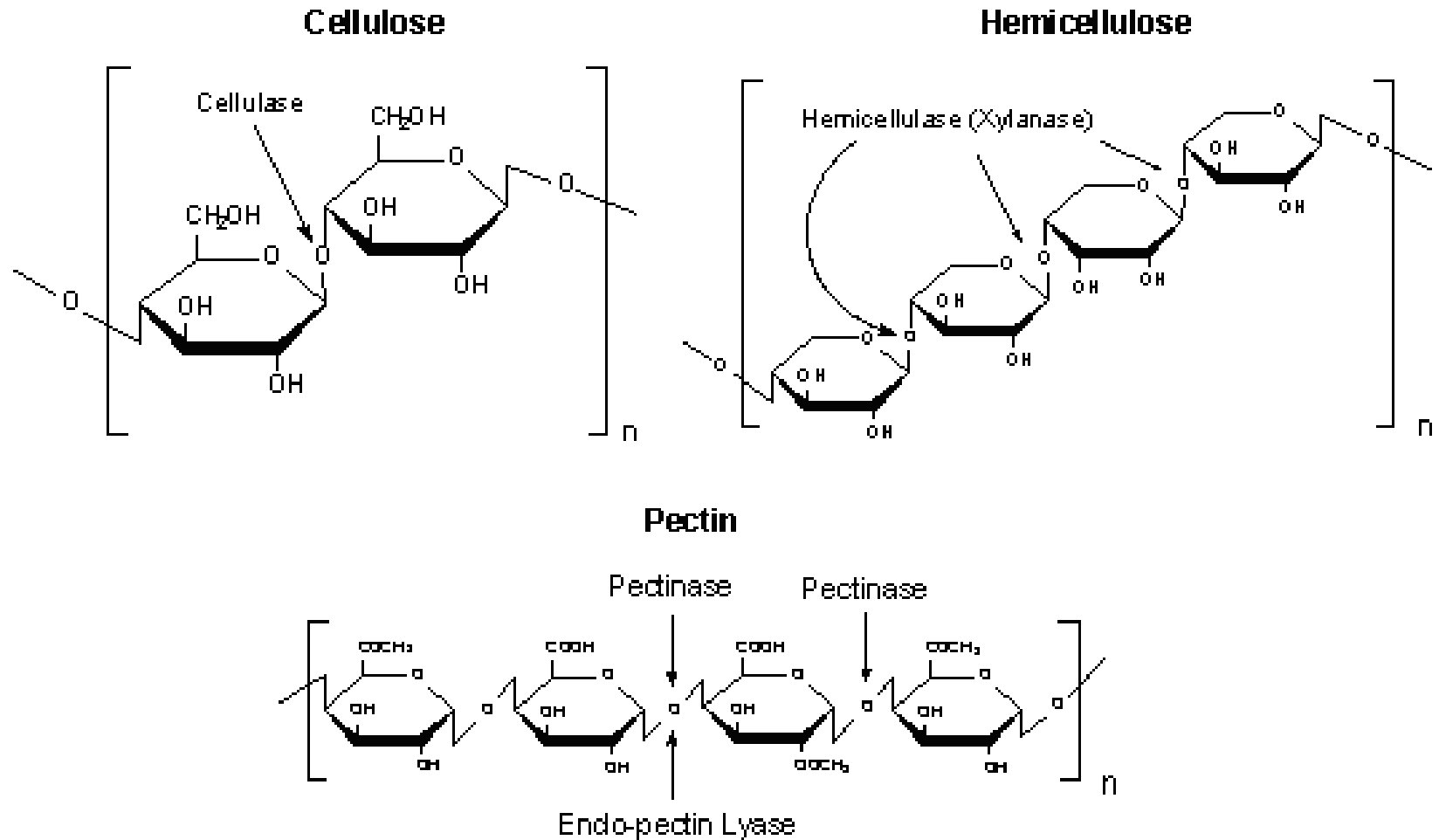
Polymer of β -(1-3)-D-glyco pyranosyl units with branching at β -(1-6)-D-glycopyranosyl units.

Chitin



Polymer of β -(1-4)-N-Acetyl-D-glucosamine units

Uporaba encimov za razgradnjo celične stene - rastline



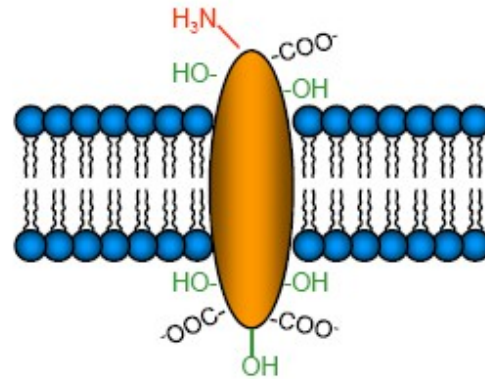
Uporaba kemikalij za razbijanje celic

- reakcija alkalij s celično steno
saponifikacija lipidov v membrani
 - poceni
 - pomanjkljivosti:
 - vpliv na intracelularne produkte
 - metoda nesprejemljiva za okolje
 - neselektivna in agresivna metoda – razgradnja intracelularnih komponent
 - možen negativen vpliv na nadaljnji separacijski proces
- alternativa: uporaba detergentov (Triton-X) ali organskih topil (aceton, oktanol)

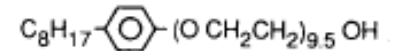
Vpliv vrste detergenta na protein v membrani

Sodium Dodecylsulfate (SDS)
(anionic)
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3^- \text{Na}^+$

Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB)
(cationic)
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$

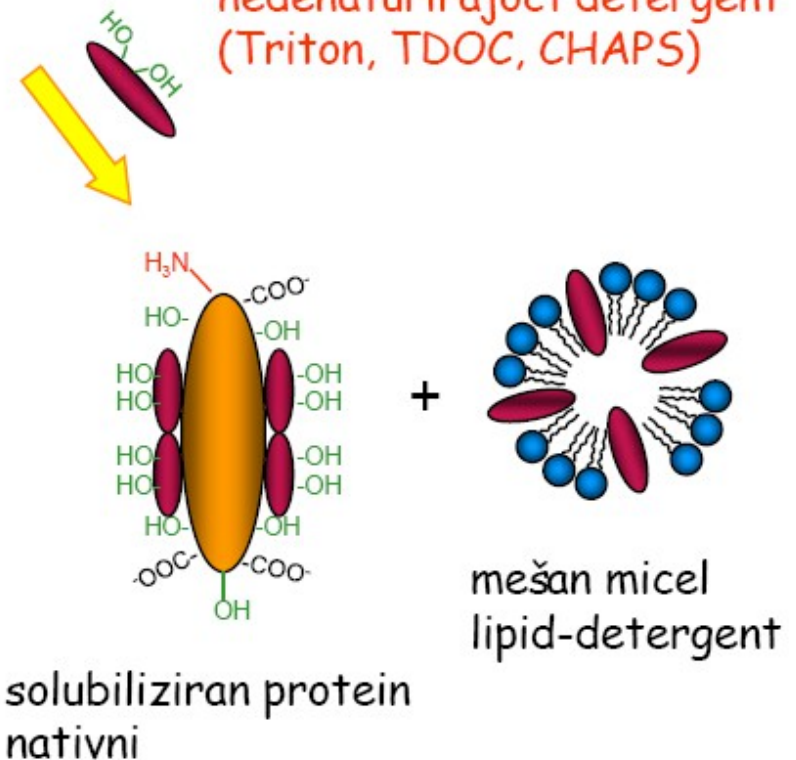
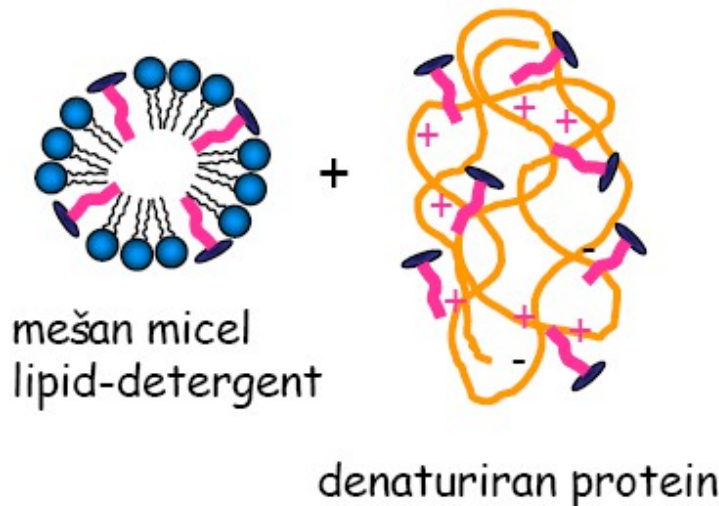


Triton X-100
(nonionic, polydisperse)

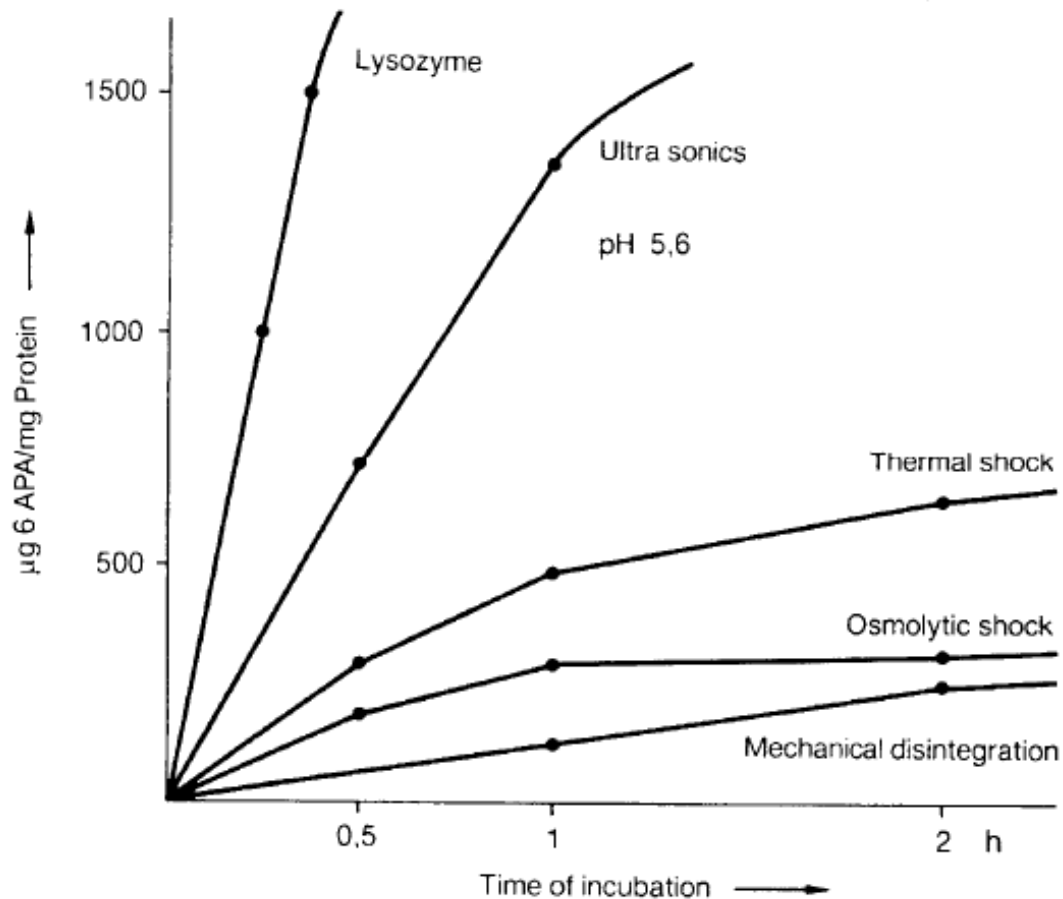


denaturirajoči detergent
(SDS)

nedenaturirajoči detergent
(Triton, TDOC, CHAPS)



Primerjava različnih metod razbitja celic na dobitek produkta



Disintegration of cells of *Erwinia aroidea* by various methods.

Nevarnosti pri razbijanju celic

- toplota** Mehanske metode: velik vnos energije → toplota.
Stabilizacija encimov: hlajenje, prisotnost substratov, njihovih analogov ali poliolov
- strig** strižne sile → poškodba encimov, še posebno v prisotnosti kovinskih ionov in/ali stika z zrakom
- proteaze** Razbitje celic → sprostitvev proteaz → možna velika izguba aktivnosti encimov.
Zmanjšanje delovanja proteaz: povečana hitrost procesa razbitja celic ob čim boljšem hlajenju, prisotnost prebitnega alternativnega substrata (poceni protein) ali inhibitorjev proteaz.
- pH** Stabilizacija encimov: uporaba pufrskih raztopin, prisotnost substratov, njihovih analogov ali poliolov
- kemijske spremembe** Možne konformacijske spremembe v prisotnosti detergentov in/ali topil. Rastlinski polifenoli so potencialni inhibitorji encimov.
Preprečitev: uporaba adsorbentov, kot npr. polivinilpirolidon, uporaba askorbinske kisline za zmanjšanje delovanja polifenol oksidaze.
- oksidacija** Preprečitev: uporaba redukcijskih sredstev (npr. askorbinska kislina, merkaptoetanol in ditiotreitol)
- penjenje** medfazna površina plin-kapljevina lahko poruši konformacijo encimov
- strupene težke kovine** Ioni težkih kovin (npr. železa, bakra in niklja) se lahko vnesejo v medij z izluženjem naprave za homogeniziranje.
Zaščita encimov pred ireverzibilno deaktivacijo: uporaba kelatnih sredstev (npr. EDTA)