

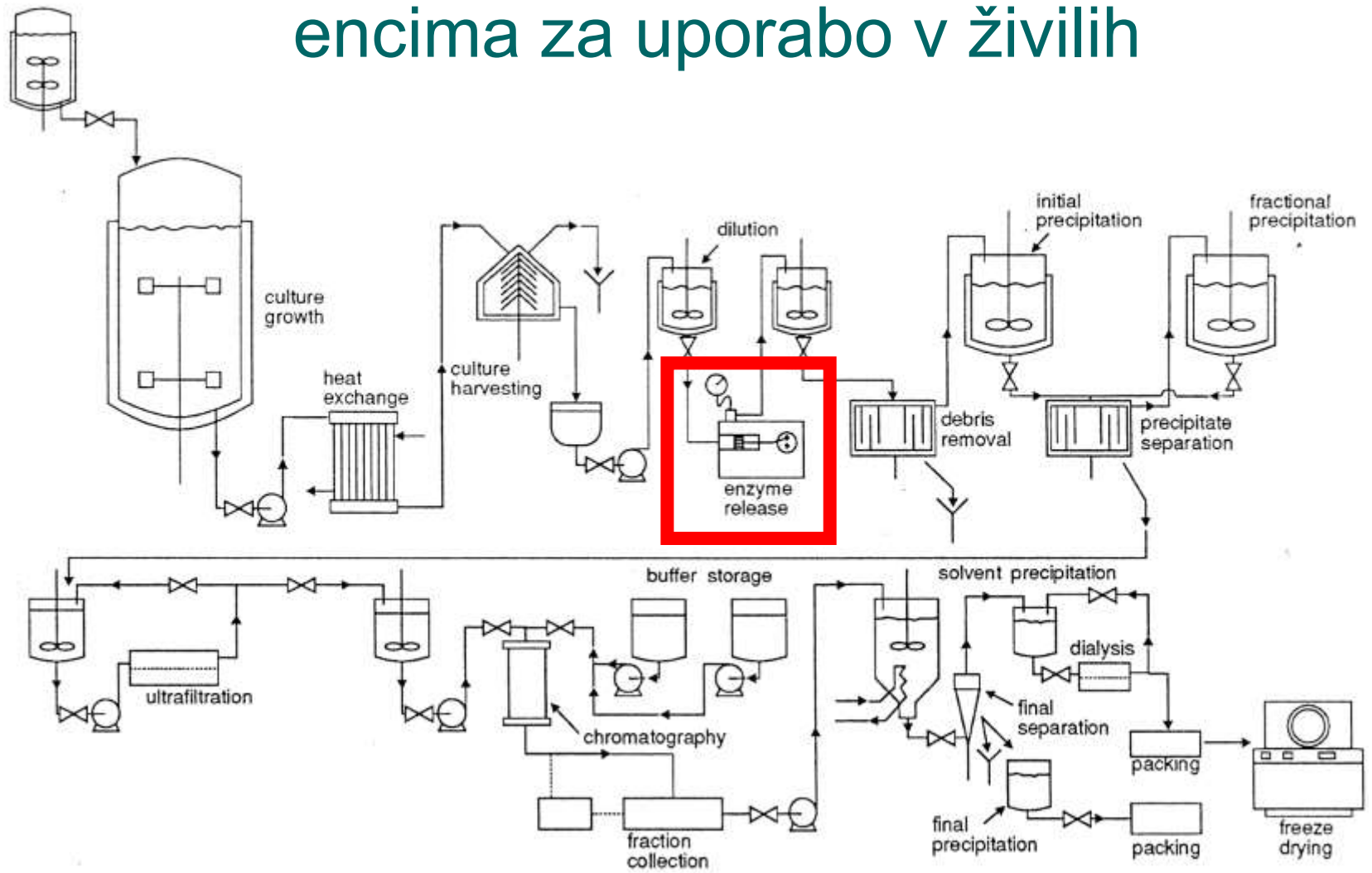


# ZAKLJUČNI PROCESI V BIOTEHNOLOGIJI

---

Razbitje celic za izolacijo  
intracelularnih produktov

# Izolacija in čiščenje intracelularnega encima za uporabo v živilih



# Intracelularni produkti

---

- proteini (inkluzijska telesa)
- lipidi
- antibiotiki

---

<b>tradicionalni intracelularni produkti</b>	<b>rDNA intracelularni produkti</b>
glukoza-izomeraza	inzulin ( <i>E. coli</i> /živalske celice)
$\beta$ -galaktozidaza	imunoglobulin
fosfataza	interferoni (živalske celice)
etanol-dehidrogenaza (ADH)	hormon rasti ( <i>E. coli</i> )
NADH/NAD <sup>+</sup>	humani serum albumin
alkaloidi	faktor VIII (živalske celice)
	streptokinaza (živalske celice)

---

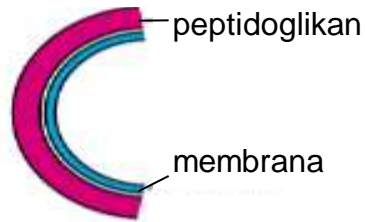
Industrijsko uporabni intracelularni encimi

encim	EC število	Vir	Intra/ekstra-celularni	Velikost proizvodnje	Industrijska uporaba
<b>encimi živalskega izvora</b>					
katalaza	1.11.1.6	jetra	I	< 1 tona/leto	živila
<b>encimi rastlinskega izvora</b>					
lipoksigenaza	1.13.11.12	soja	I	< 1 tona/leto	živila
<b>encimi bakterij</b>					
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.
<b>encimi nitastih gliv</b>					
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
$\alpha$ -galaktozidaza (rafinaza)	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	I	< 1 tona/leto	živila
<b>encimi kvasovk</b>					
$\beta$ -fruktofuranozidaza (invertaza)	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	I/E	< 1 tona/leto	slaščičarne
$\beta$ -galaktozidaza (laktaza)	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	I/E	< 1 tona/leto	mlekarne
$\alpha$ -galaktozidaza (rafinaza)	3.2.1.22	<i>Saccharomyces</i>	I	< 1 tona/leto	živila

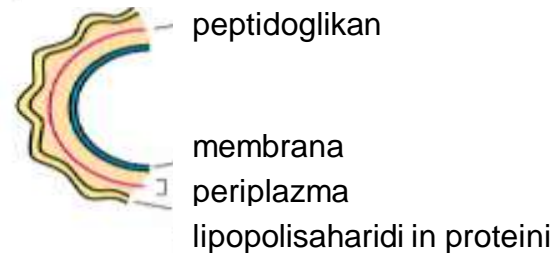
# Zgradba celične stene - bakterije

težje  
mehansko  
razgradljiva

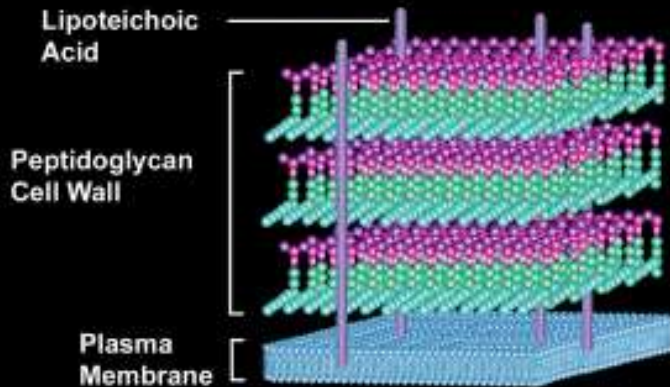
Gram pozitivne



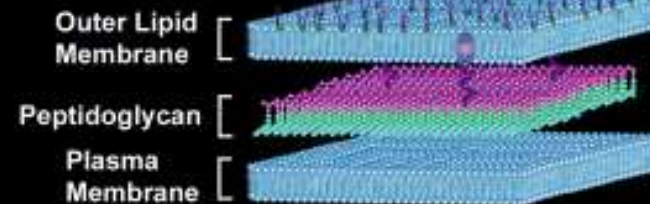
Gram negativne



Gram Positive Bacterial Cell Wall

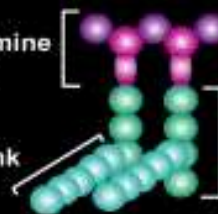


Gram Negative Bacterial Cell Wall



Alternating copolymer of  
 $\beta$ -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine  
and N-acetylmuramic acid

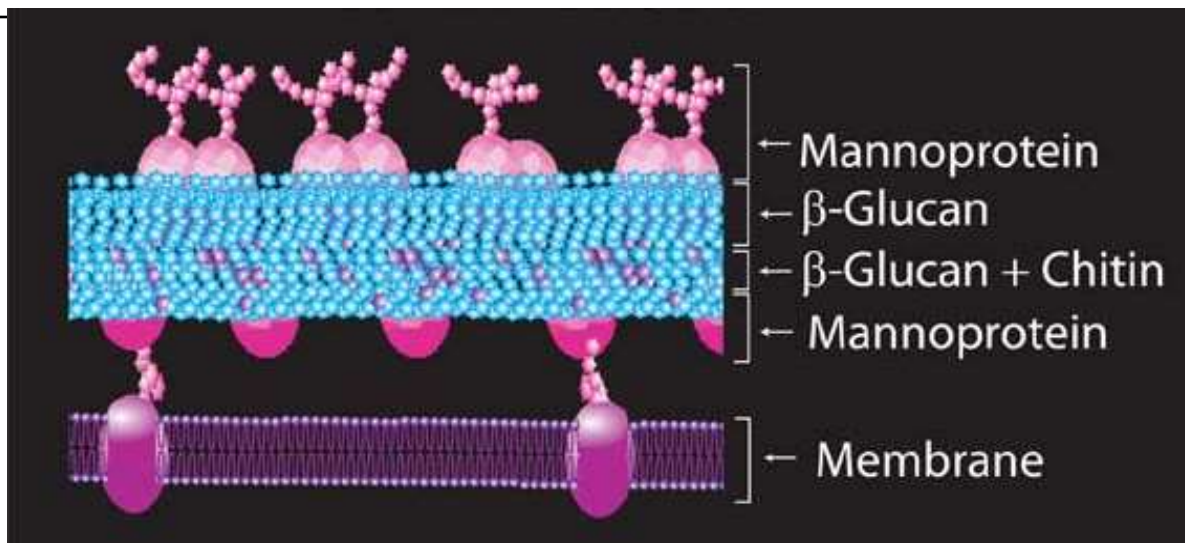
Penta-glycine cross-link



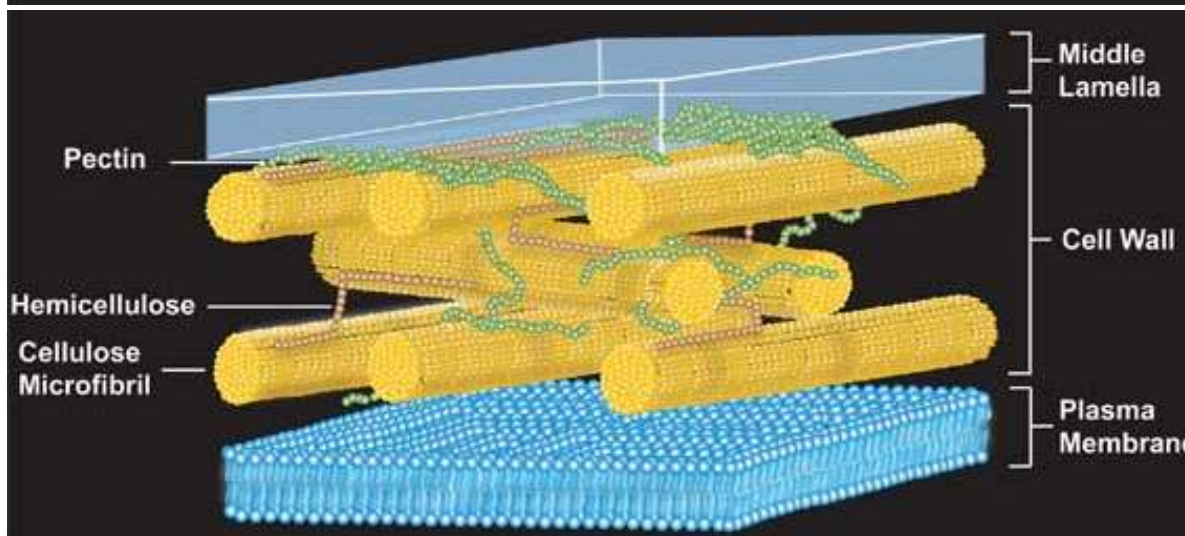
L-Ala-D-Glu-  
L-Lys-D-Ala  
tetrapeptide

# Zgradba celične stene eukariontov – kvasovke, rastline

velike  
razlike  
med  
različnimi  
vrstami!

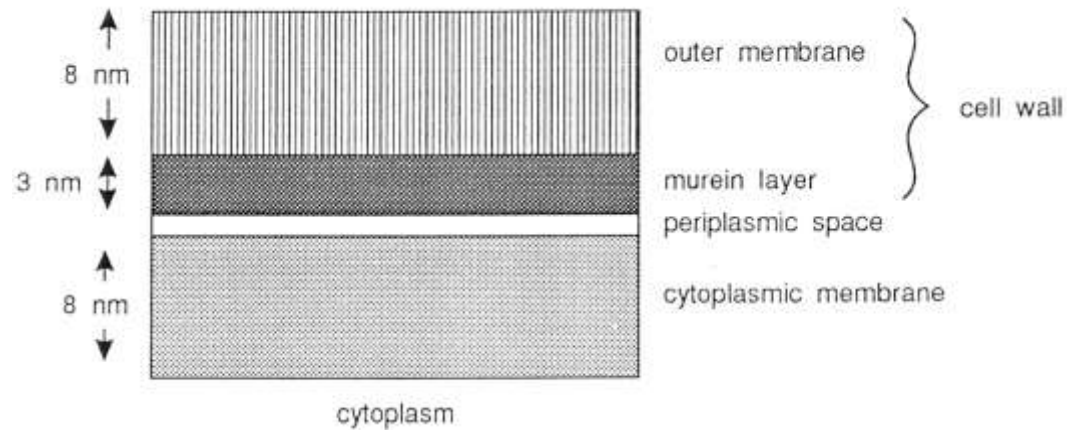


kvasovke



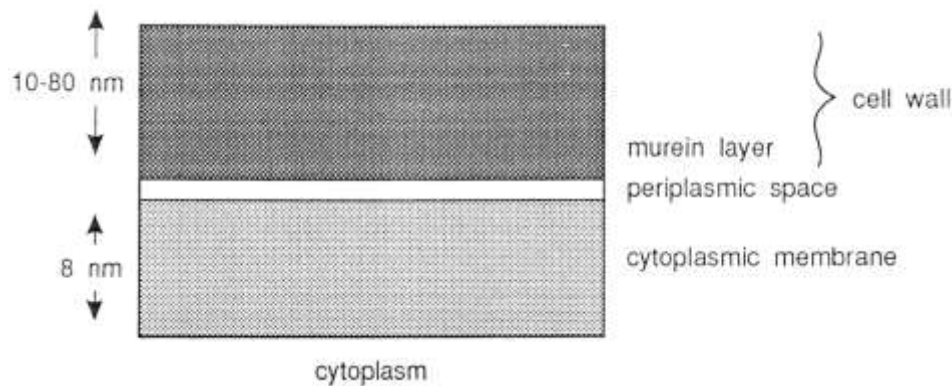
rastline

# Zgradba celične stene - primerjava

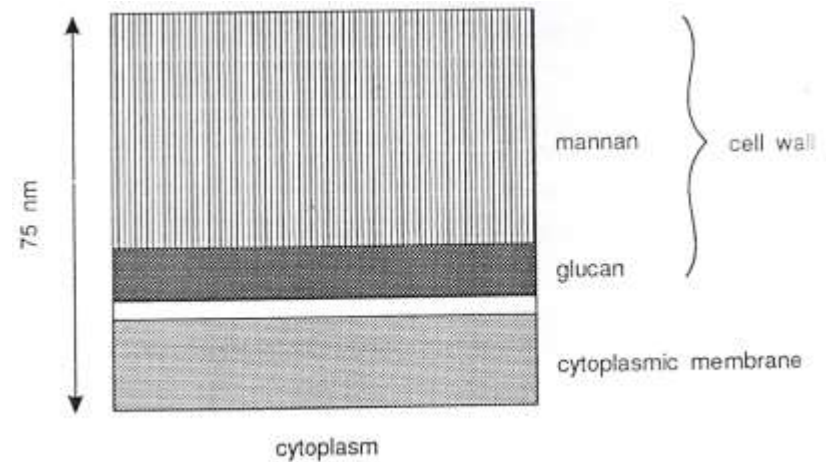


velike  
razlike  
med  
različnimi  
vrstami!

## Gram negativne bakterije



## Gram pozitivne bakterije



## kvasovke

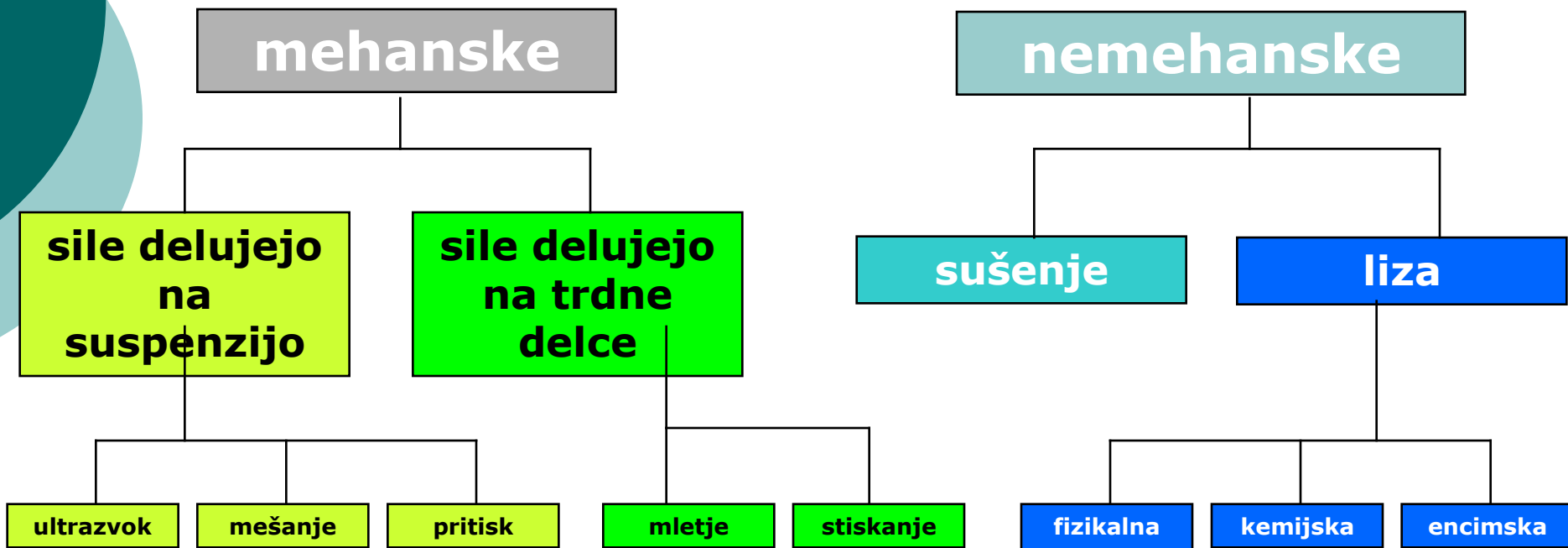
# Razbitje celične stene

---

- 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

---

## **mehanske**

— **homogenizator**

— **kroglični mlin**

## **nemehanske**

### **fizikalne**

- temperaturni šok

### **kemijske**

- detergenti

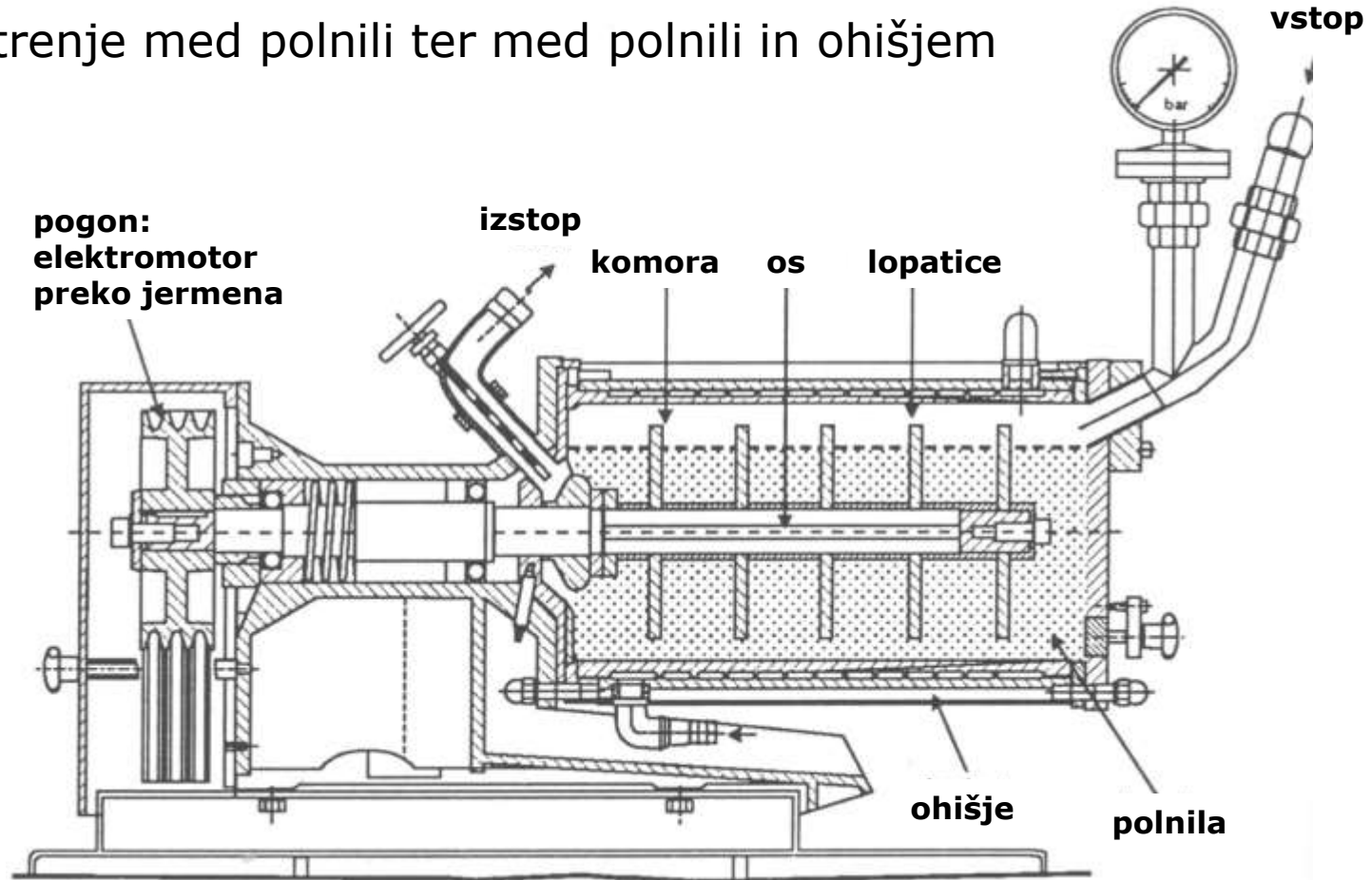
- topila

- tvorba kompleksov

### **encimske**

# Mehansko razbijanje celic – mlin s polnilom (kroglice)

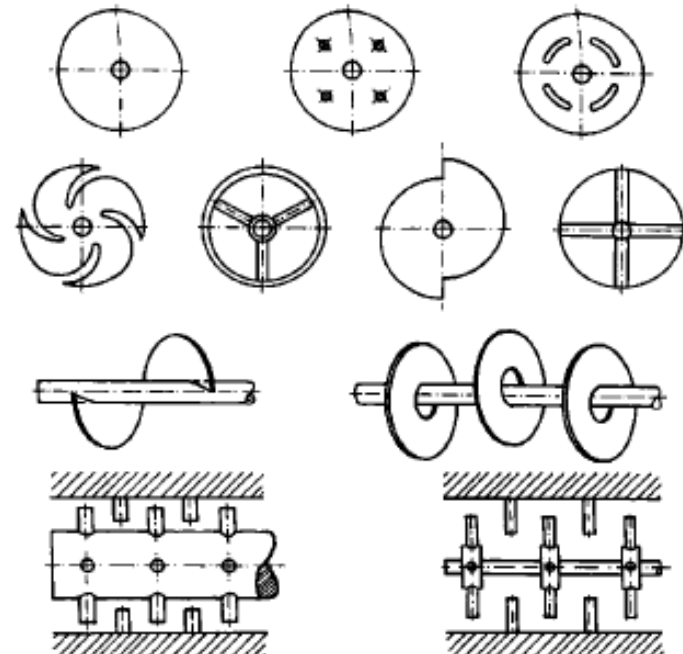
trenje med polnili ter med polnili in ohišjem



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

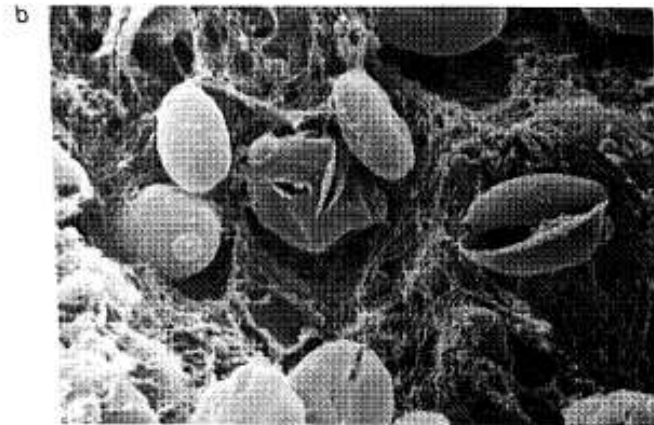
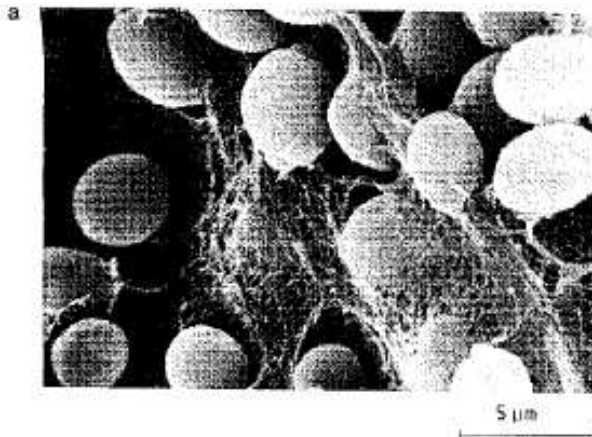
$$P = c \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5$$

$P$  – vnos moči (W)  
 $c$  – brezdimenzijska konstanta  
 $N$  – hitrost vrtenja rotorja ( $s^{-1}$ )  
 $D$  – premer rotorja z lopaticami (m)  
 $\rho$  – 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:

- $P$ : 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

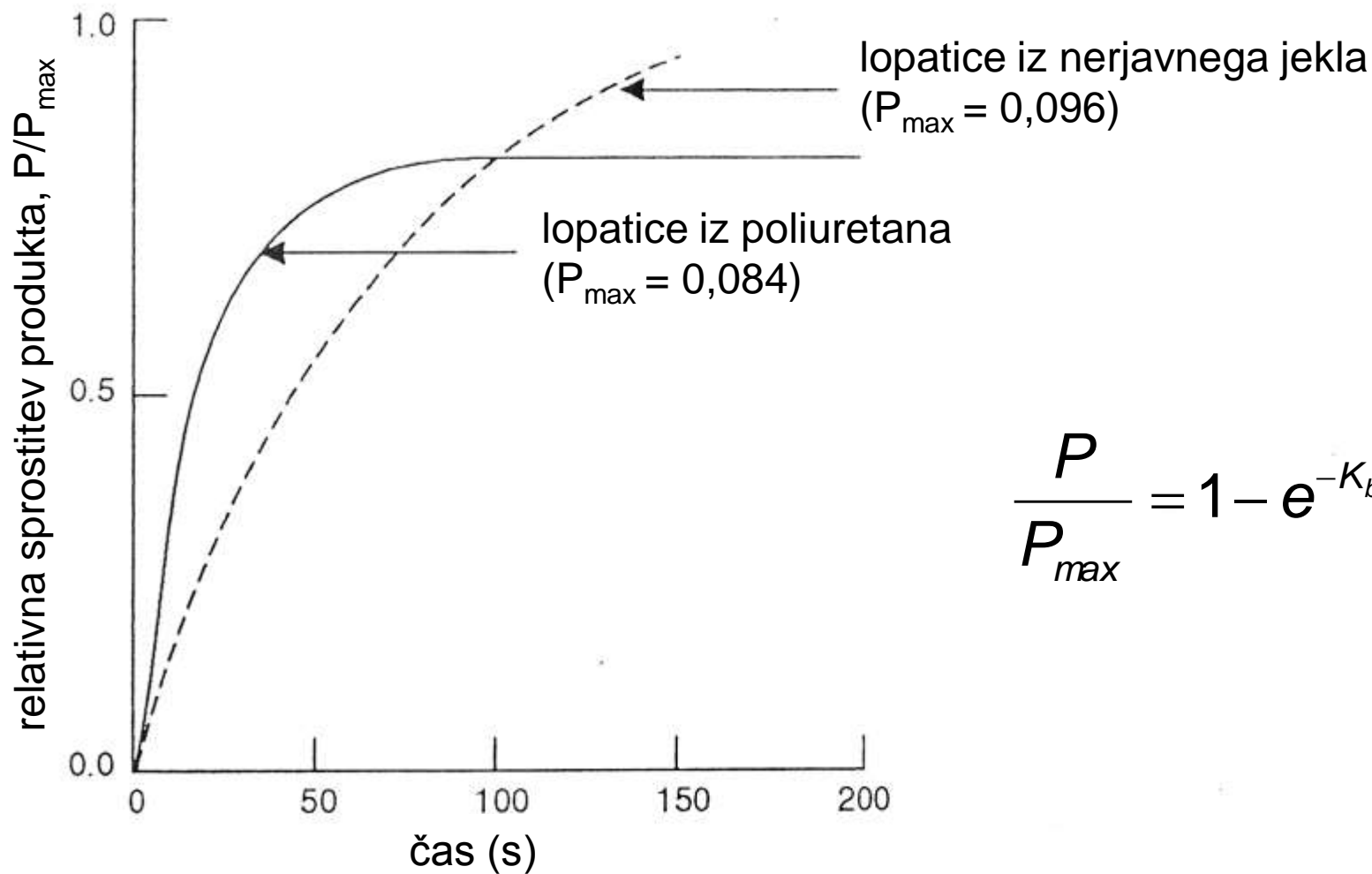
$$\frac{dP}{dt} = K_b \cdot (P_{max} - P)$$

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

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

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

# Šaržno razbijanje kvasovk z mlinom – dva različna tipa lopatic

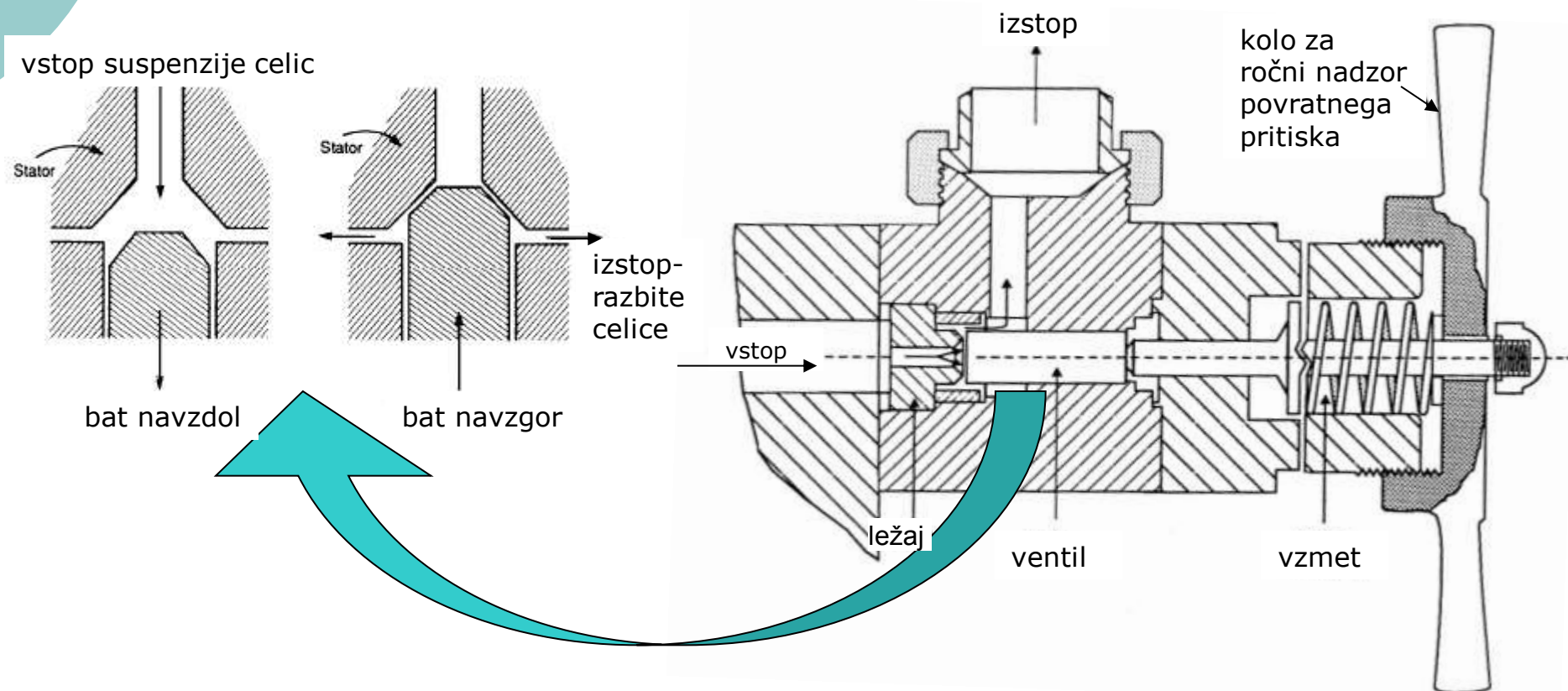


$$\frac{P}{P_{\max}} = 1 - e^{-K_b \cdot t}$$



# 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

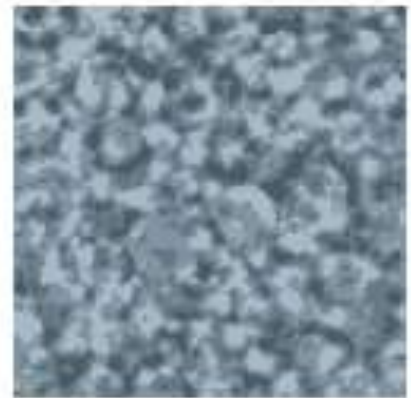
---

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  $\mu\text{m}$



Po homogeniziranju – 13  $\mu\text{m}$

# Povečanje (*scale-up*) - homogenizator

---

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

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

$\Delta T$  – razlika temperatur (K)

$\Delta p$  – razlika pritiskov (Pa)

$\rho$  - gostota suspenzije celic (kg/m<sup>3</sup>)

$c_p$  – 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 (m<sup>3</sup>/s)

$m$  - masa suspenzije celic (kg)

# Kinetika sprostitve produkta iz celic

---

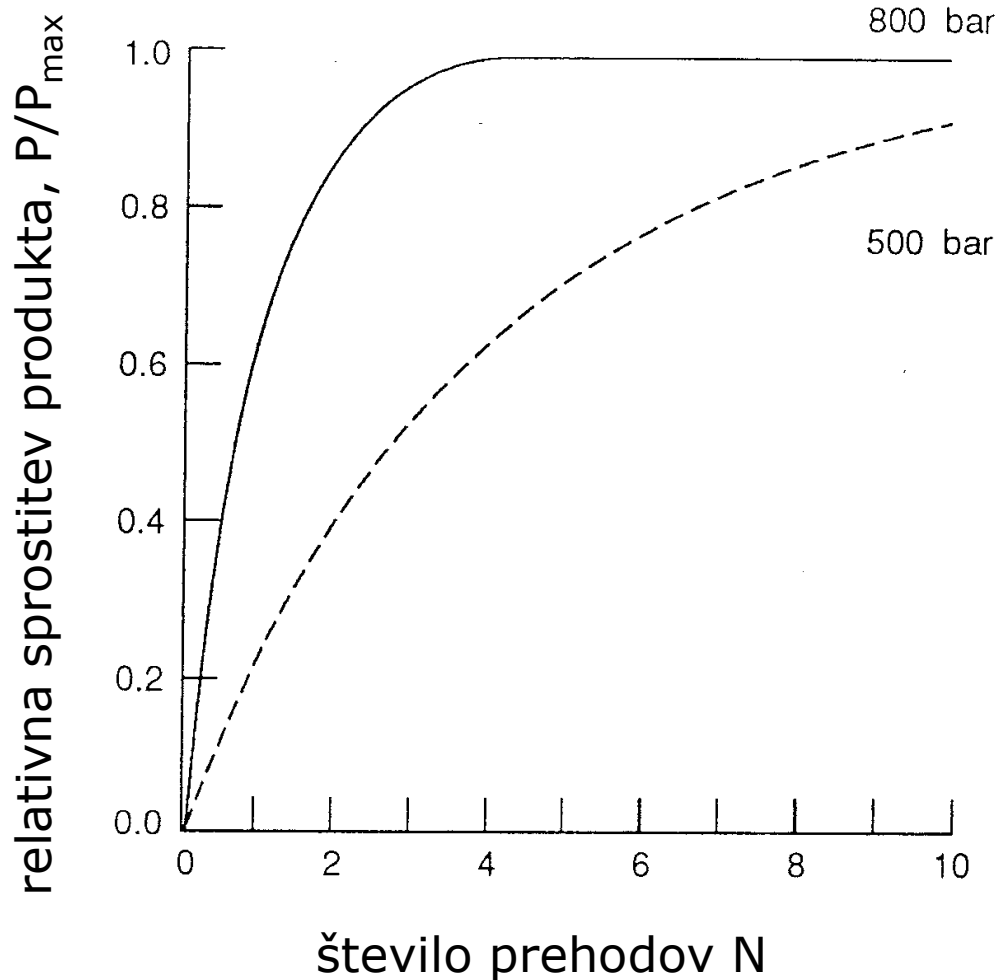
$$\frac{P}{P_{max}} = 1 - e^{-K_h \cdot f(\Delta p) \cdot N}$$

- $N$  – 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 $\Delta p$ 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

<b>tehnika</b>	<b>princip</b>	<b>vpliv na produkt</b>	<b>cena</b>	<b>primeri</b>
homogenizacija (rezilo)	celice sesekljanе 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 kroglіčnem 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



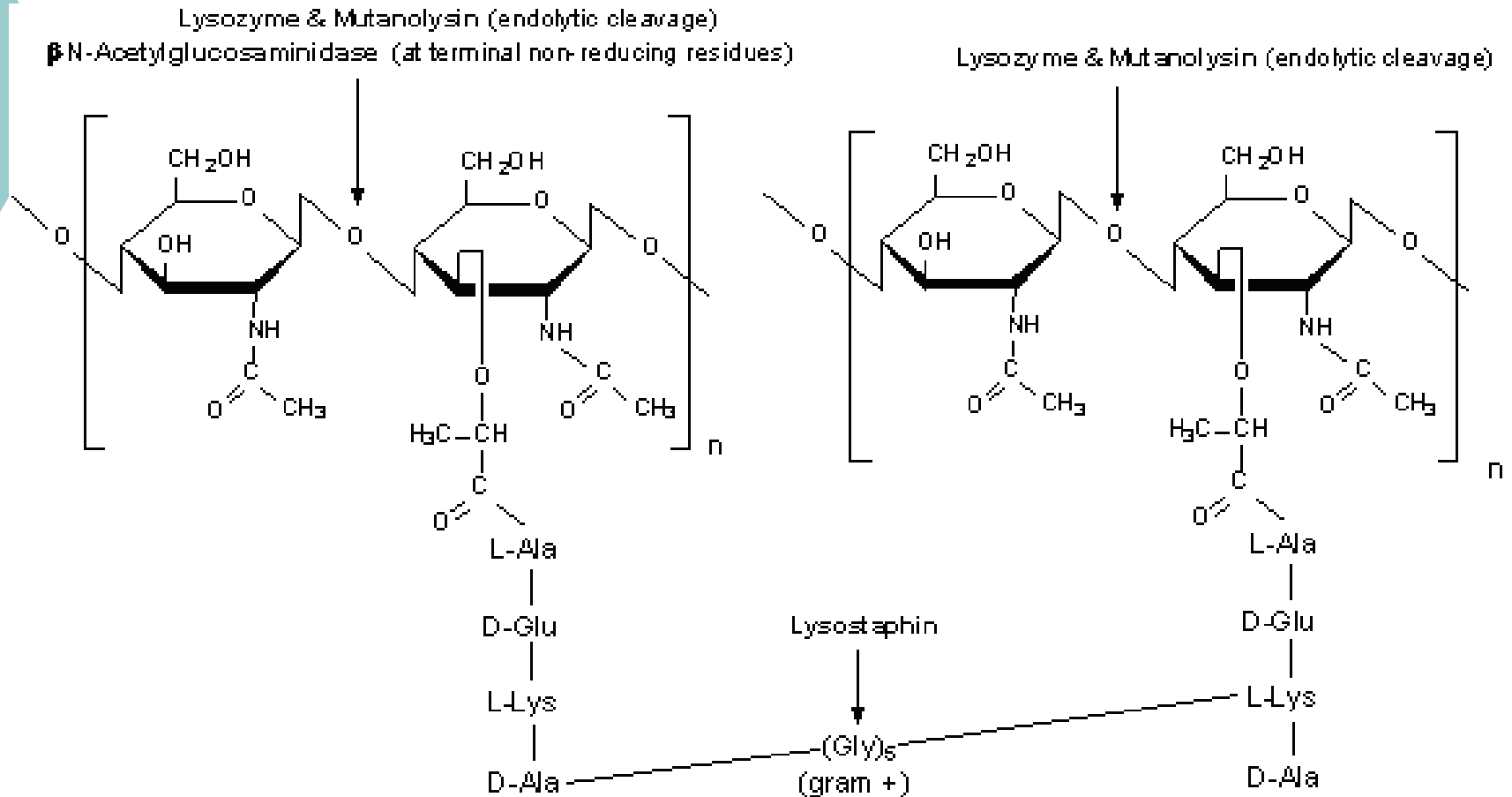
# Nemehanske metode razbijanja celic

## – uporaba encimov

---

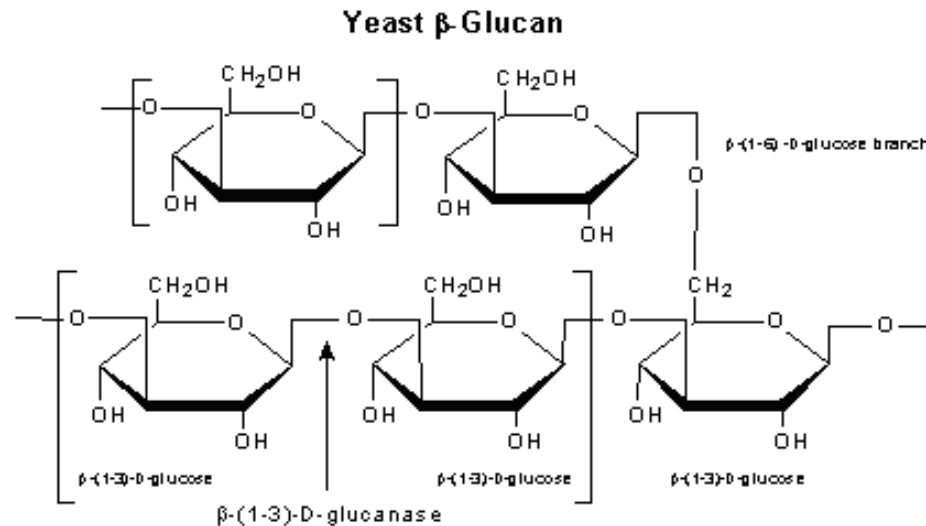
- reakcija suspenzije encimov s celično steno  
raztapljanje, razgradnja
- mala poraba energije
- selektivna metoda
- minimalen vpliv na intracelularne produkte
- metoda sprejemljiva za okolje
- pomanjkljivosti:
  - visoka cena encimov
  - nezmožnost izvedbe procesa v večjem merilu (laboratorijska metoda)
  - 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

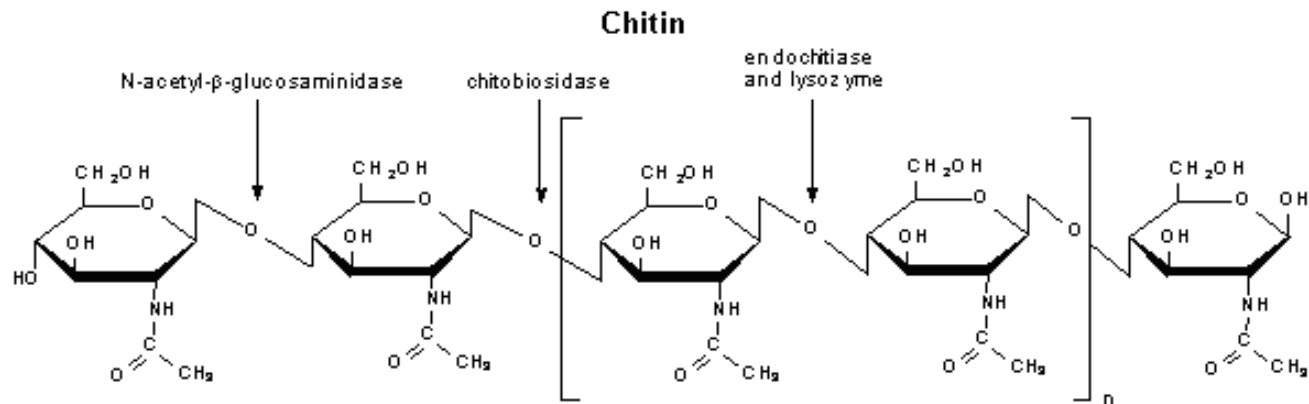


(direct cross link in gram negative)

# Uporaba encimov za razgradnjo celične stene - kvasovke

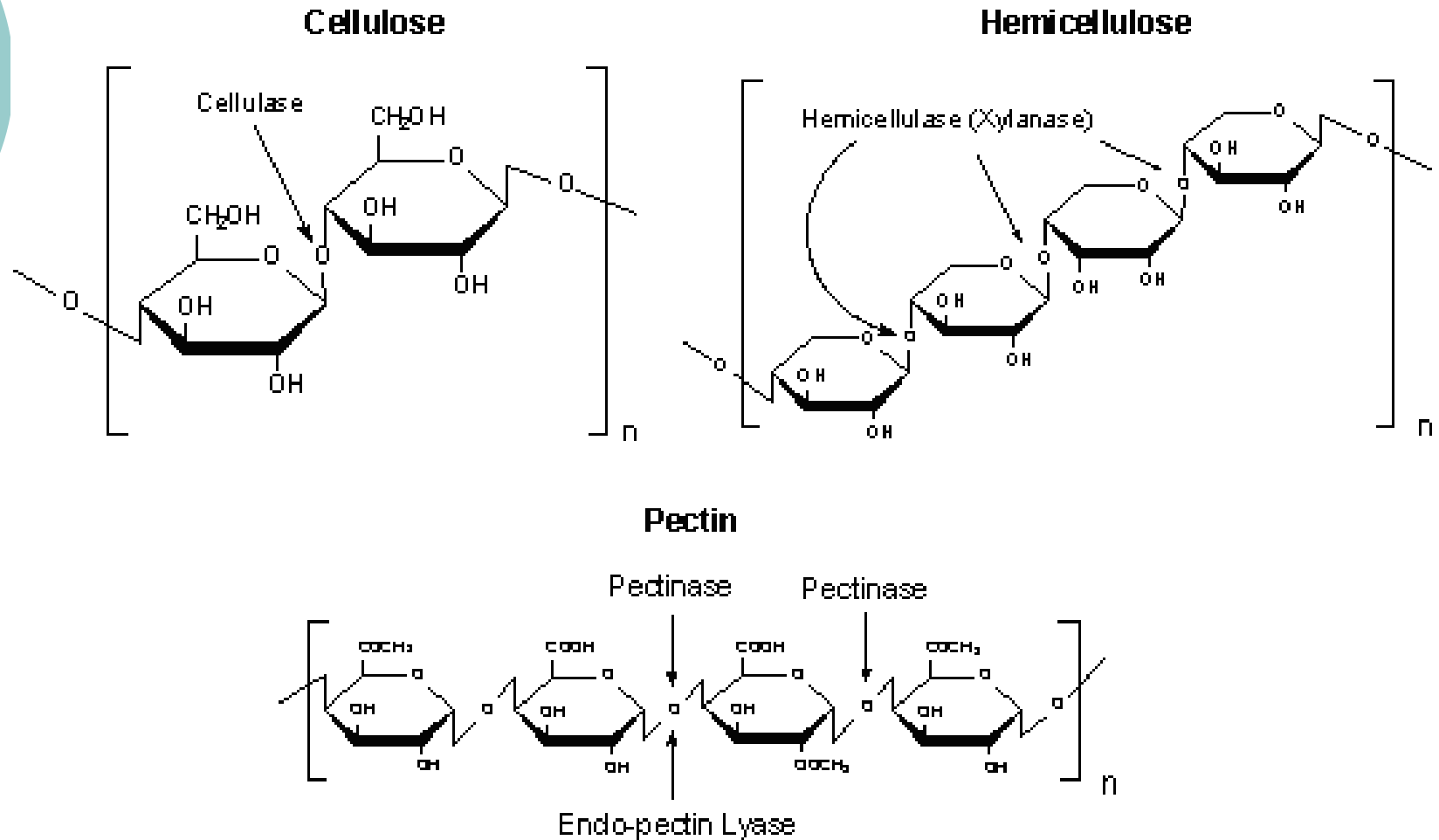


Polymer of  $\beta$ -(1-3)-D-glyco pyranosyl units with branching at  $\beta$ -(1-6)-D-glycopyranosyl units.



Polymer of  $\beta$ -(1-4)-N-Acetyl-D-glucosamine units

# Uporaba encimov za razgradnjo celične stene - rastline



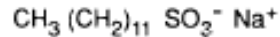
# Uporaba kemikalij za razbijanje celic

---

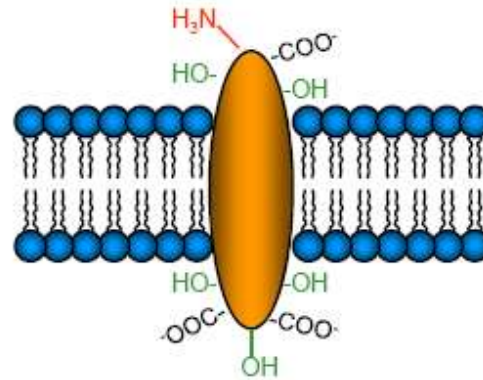
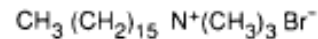
- reakcija alkalij s celično steno  
saponifikacija lipidov v membrani
  - poceni
  - pomanjkljivosti:
    - vpliv na intracelularne produkte
    - metoda nesprejemljiva za okolje
    - neselektivna in agresivna metoda – razgradnja intracelularnih komponent
    - možen negativen vpliv na nadaljnji separacijski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

# Vpliv vrste detergenta na protein v membrani

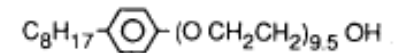
**Sodium Dodecylsulfate (SDS)**  
(anionic)



**Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB)**  
(cationic)

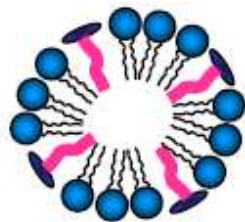


**Triton X-100**  
(nonionic, polydisperse)



denaturirajoči detergent  
(SDS)

nedenaturirajoči detergent  
(Triton, TDOC, CHAPS)

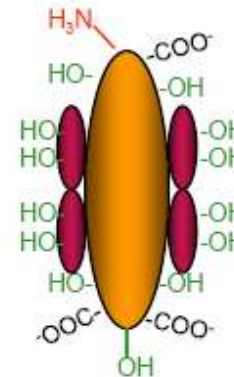


mešan micel  
lipid-detergent

+

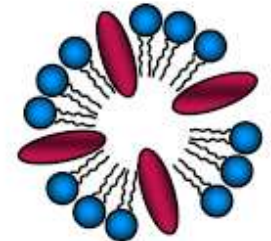


denaturiran protein



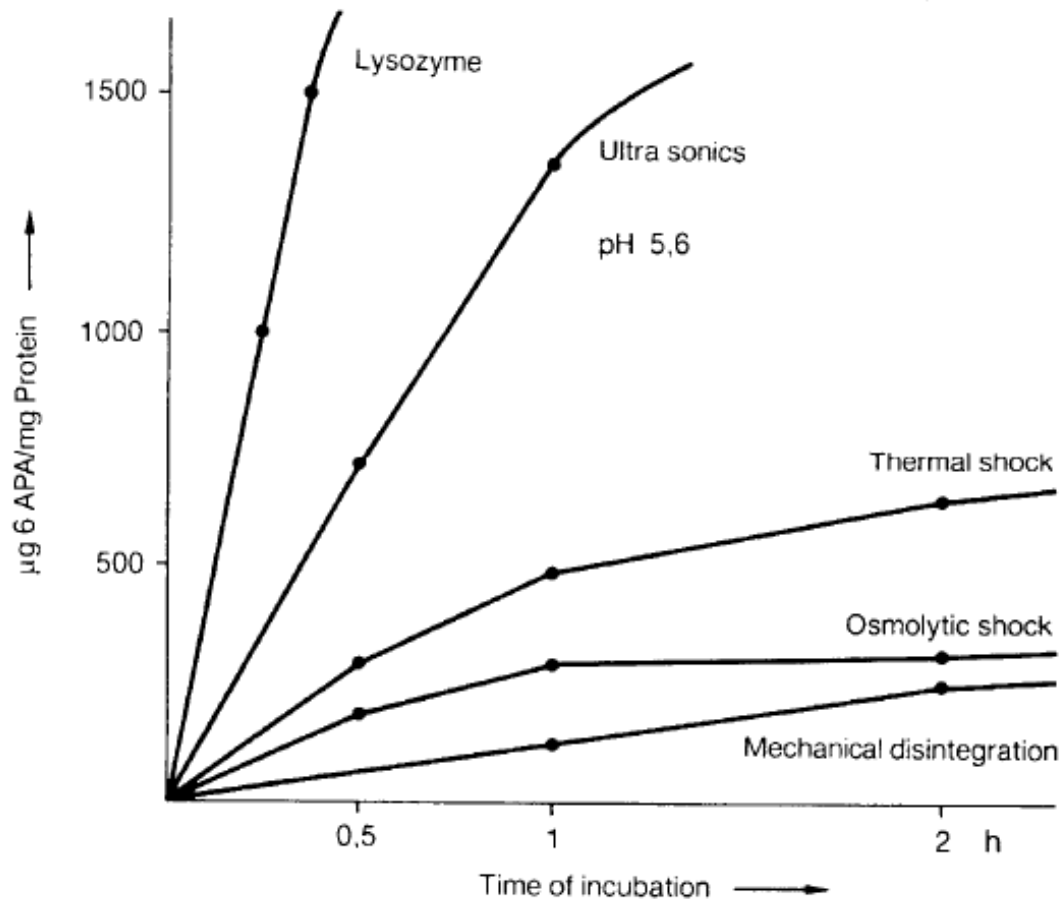
solubiliziran protein  
nativni

+



mešan micel  
lipid-detergent

# Primerjava različnih metod razbitja celic na dobiček 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 ditionitrol)
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)