



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Dovydas Ščiukas

Fikocianino C gamyba iš melsvabakterių
Aphanizomenon flos – aquae

Baigiamasis magistro projektas

Vadovas

Doc. dr. Kostas Radzevičius

KAUNAS, 2018

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
CHEMINĖS TECHNOLOGIJOS FAKULTETAS

Fikocianino C gamyba iš melsvabakterių
Aphanizomenon flos – aquae

Baigiamasis magistro projektas
Pramoninė biotechnologija (kodas 621J70004)

Vadovas

(parašas) Doc. dr. Kostas Radzevičius
(data)

Recenzentas

(parašas) Doc. dr. Ilona Jonuškienė
(data)

Projektą atliko

(parašas) Dovydas Ščiukas
(data)

KAUNAS, 2018



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

Cheminės Technologijos

(Fakultetas)

Dovydas Ščiukas

(Studento vardas, pavardė)

621J70004

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

„Fikocianino C gamyba iš melsvabakterių *Aphanizomenon flos-aquae*“

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 18 m. Birželio 12 d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano, **Dovydo Ščiuko**, baigiamasis projektas tema „**Fikocianino C gamyba iš melsvabakterių *Aphanizomenon flos-aquae***“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

TURINYS

| | |
|--|----|
| IŽANGA..... | 8 |
| 1. LITERATŪROS APŽVALGA..... | 10 |
| 1. 1. Fikocianino C savybės..... | 10 |
| 1. 2. Gryninimas | 12 |
| 1. 2. 1. Fikocianino C sorbcija ant hidroksiapatito kolonos..... | 12 |
| 1. 2. 2. Fikocianino C anijonų mainų chromatografija..... | 12 |
| 1. 2. 3. Chromatografija išsiplėtusiame sluoksnyje..... | 14 |
| 1. 2. 4. Tangentinis filtravimas..... | 15 |
| 1. 2. 5. Pasiskirstymas dvifazėje sistemoje | 17 |
| 1. 2. 6. Molekulinių sietų chromatografija | 19 |
| 1. 2. 7. Apjungti gryninimo procesai..... | 19 |
| 2. MEDŽIAGOS IR METODAI..... | 21 |
| 2. 1. Medžiagos..... | 21 |
| 2. 2. Aparatūra | 22 |
| 2. 3. Metodai..... | 22 |
| 2. 3. 1. Dažymas baziniu fuksinu | 22 |
| 2. 3. 2. Biomasės ardymas ir ląstelių suardymo įvertinimas | 23 |
| 2. 3. 3. Normalusis filtravimas | 23 |
| 2. 3. 4. Dializė | 24 |
| 2. 3. 5. Diafiltravimas..... | 25 |
| 2. 3. 6. Fikocianino C stabilumo priklausomybė nuo pH..... | 25 |
| 2. 3. 7. Fikocianino C imlumo priklausomybė nuo pH statinėmis sąlygomis..... | 26 |
| 2. 3. 8. Jonų mainų chromtaografija..... | 27 |
| 2. 3. 9. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford'o metodu | 28 |
| 2. 3. 10. Liofilizavimas..... | 29 |
| 2. 3. 11. Kapiliarinė elektroforezė..... | 29 |
| 2. 3. 12. Molekulinių sietų chromatografija | 31 |
| 3. PROJEKTAVIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS | 33 |
| 3. 1. Biomasės ardymas | 33 |
| 3. 2. Normalusis filtravimas | 35 |
| 3. 3. Dializė..... | 36 |
| 3. 4. Diafiltravimas | 36 |
| 3. 5. Fikocianino C stabilumo priklausomybė nuo pH..... | 37 |
| 3. 6. Jonito fikocianino C imlumo priklausomybė nuo pH statinėmis sąlygomis..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 3. 7. Jonų mainų chromatografija | 40 |
| 3. 7. 1. Anijonų mainų chromatografija | 40 |
| 3. 7. 2. Katijonų mainų chromatografija | 42 |
| 3. 7. 3. Sorbcijos sąlygų pasirinkimas | 44 |
| 3. 8. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford'o metodu | 46 |
| 3. 9. Liofilizavimas | 46 |
| 3. 10. Kapiliarinė elektroforezė | 47 |
| 3. 11. Molekulinių sietų chromatografija | 47 |
| 3. 12. Proceso projektavimas | 48 |
| 4. GRAFINĖ DALIS | 55 |
| 4. 1. Technologinė schema su materialiniu balansu | 55 |
| 4. 2. Aparatūrinė schema | 56 |
| 5. DARBUOTOJŲ SAUGA IR SVEIKATA | 59 |
| IŠVADOS..... | 61 |
| LITERATŪROS SĄRAŠAS..... | 63 |
| PRIEDAI..... | 66 |
| Nr. 1 | 66 |
| Nr. 2..... | 67 |
| Nr. 3..... | 68 |
| Nr. 4..... | 69 |
| Nr. 5..... | 70 |
| Nr. 6..... | 71 |
| Nr. 7..... | 72 |
| Nr. 8..... | 73 |
| Nr. 9..... | 74 |
| Nr. 10..... | 75 |

Ščiukas, Dovydas. Fikocianino C gamyba iš melsvabakterių *Aphanizomenon flos-aquae*. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas doc. dr. Kostas Radzevičius; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Mokslo kryptis ir sritis: biotechnologija, technologijos mokslai

Reikšminiai žodžiai: *fikocianinas C, Aphanizomenon flos - aquae, melsvabakterijos*.

Kaunas, 2018. 75 p.

SANTRAUKA

Projekte buvo nustatyta, kad *Aphanizomenon flos – aquae* biomasė gali būti naudojama ardymui su statoriumi – rotoriumi. Atlikus tirpalo, gauto ištirpinus nuosėdas po išsodinimo amonio sulfatu, filtravimą, buvo nustatytas filtravimo greitis – 999,1 l/ m²*val. Dializės metu buvo sunaudojama 10 l buferinio tirpalo – paruošti 100 ml baltyminio tirpalo, sumažinant savitąjį elektrinį laidį nuo 134 iki 1 mS/cm. Dializė yra pakeičiama diafiltravimu ir išmatuojami parametrai: vidutinis filtravimo greitis – 11,82 l/m²*val ir DV – 2,75. Buvo nustatyta, kad fikocianinas C yra stabilus pH intervale nuo 3,5 iki 7,5. Fikocianinas C statinėm sąlygom ant anijonito sorbuojasi pH vertėse aukštesnėse nei 5,2, ant katijonito sorbuojasi pH vertėse žemesnėse už 5. Buvo nustatyta – dinaminėmis sąlygomis optimaliausias sorbcijos pH yra 7, gaunamas grynumas (A_{620nm}/A_{280nm}) 2,58. Atlikus didesnio mastelio chromatografiją buvo gauta 43 ml produkto, kurio baltymų koncentracija 37,6 mg/ml ir grynumas (A_{620nm}/A_{280nm}) – 2,63. Atlikus kapiliarinę elektroforezę buvo nustatyta, kad fikocianino C subvienetų molekulinės masės – 16,6 ir 21 kDa. Atlikus molekulinį sietų chromatografiją buvo nustatyta, kad fikocianino C subvienetų molekulinės masės – 14 ir 21,4 kDa.

Ščiukas, Dovydas. Manufacturing of Phycocyanin C for Cyanobacteria *Aphanizomenon flos – aquae*: *Master 's* thesis in Industrial Biotechnology / supervisor assoc. prof. dr. Kostas Radzevičius. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Research area and field: biotechnology, technological studies

Key words: *C – phycocyanin, Aphanizomenon flos – aquae, Cyanobacteria*.

Kaunas, 2018. 75 p.

SUMMARY

In this project it was determined that stator – rotor homogenizer may be used to disrupt *Aphanizomenon flos – aquae* biomass. Dissolved ammonium sulphate precipitate was filtered, at filtrate flux rate 999,1 l/ m²*h. 100ml protein solution was dialyzed with 10 l dialysis buffer to reduce solutions relative electrical conductivity from 134 to 1 mS/cm. diafiltration is used as a substitute to dialysis, it was measured that during the process average filtrate flux rate is 11,82 l/m²*h, diafiltration volume – 2,75. C – phycocyanin is stable in pH values from 3,5 to 7,5. It was determined that at static conditions C – phycocyanin binds to anion exchange resin at pH values that are higher than 5,2, for cation exchange resin objective protein binds at pH values that are lower than 5. At dynamic condition it was determined that optimal binding pH is 7, eluted C - phycocyanin purity (A_{620nm}/A_{280nm}) – 2,58. 43 ml 37,6 mg/ml protein concentration C – phycocyanin solution with (A_{620nm}/A_{280nm}) purity of 2,63 was produced from a larger scale anion exchange chromatography. Using capillary electrophoresis, it was determined that C – phycocyanin submit molecular weights are 16,6 and 21 kDa. Using size exclusion chromatographs, it was determined that C – phycocyanin submit molecular weights are 14 and 21 kDa.

SANTRUMPOS

BSA – Galvijų serumo albuminas

DN – Denatūruojantis tirpalas

DS – Valymo tirpalas

DTT – Ditioeritritolis

DV – Diafiltravimo tūris

GDM – Gelio – dažo mišinys

kDa – Kilodaltonas

NMWL – Nominali molekulinės masės riba (angl. *Nominal Molecular Weight Limit*)

OV – Optiniai vienetai

PEG – Polietileno glikolis

TFA – Trifluoracto rūgštis

TLL – Angl. *tie length line*

TOD – Bendras optinis tankis

TRIS – Tris (hidroksimetil) aminometanas

Vk – Kolonos tūris

VS – Vonios skaičius

IŽANGA

Melsvabakterės, tai yra prokarijotiniai mikroorganizmai, kurie dažnai yra klasifikuojami kartu su mikroskopiniais dumbliais. Šie mikroorganizmai yra randami ne tik vandens telkiniuose, vandenynuose, ir ežeruose, bet ir dirvoje. Didelė dalis melsvabakterės pasisavina atmosferinį anglies dvideginį ir azotą, o energiją gauna sugeriant Saulės šviesą – [1]. Šviesos energija yra sugerama chlorofilais ir pigmentiniais baltymais – fikobiliniais.

Dalis melsvabakterių žydėjimo metu sunaudoja vandenyje ištirpusį deguonį ir proceso metu išskiria nemalonus kvapo aromatinės medžiagas – [1]. Atsiradus deguonies trūkumui nukenčia kiti telkinio organizmai. Atsiranda poreikis panaudoti užaugusią biomasę. Pramonėje iš melsvabakterių biomasės yra gaminami: maisto papildai, biotrašos ir gyvuliniai pašarai – [1, 2]. Bet šių produktų pridėtinė vertė yra nedidelė, todėl atsiranda tikslas išgauti iš mikroorganizmų didesnės pridėtinės vertės produktus: lipidus, karotinoidus, fikobilinus ir kt. Atliekos, gautos po šių produktų išgavimo, gali būti toliau naudojamos pašarams ar trašoms gaminti.

Vienas iš aukštos pridėtinės vertės fikobilinų yra fikocianinas C. Tai yra pigmentinis baltymas pasižymintis stipriai mėlyna spalva, todėl yra naudojamas maisto pramonėje ir kosmetikoje, kaip dažiklis. Be stiprios spalvos fikocianinas C pasižymi antioksidacinėmis, uždegimus slopinančiomis savybėmis – [3]. Fikocianinas C taip pat pasižymi fluorescencija, todėl gali būti naudojamas, kaip biomolekulių fluorescencinis žymeklis.

Europa šiuo metu užima tik 5 % pasaulinės mikroskopinių dumblių apdorojimo rinkos, lyderiai yra Australija ir Azija. Ekspertų teigimu Europa gali tapti mikroskopinių dumblių apdorojimo lydere kitame dešimtmetyje – [2]. Apskaičiuota, kad per metus Lietuvos Kuršių mariose, optimaliomis sąlygomis, priauga 7632 m³ melsvabakterių biomasės, todėl Lietuva turi potencialą kurti šios srities pramonę – [4].

Darbo tikslas – nustatyti fikocianino C iš melsvabakterių *Aphanizomenon flos – aquae* gamybos sąlygas

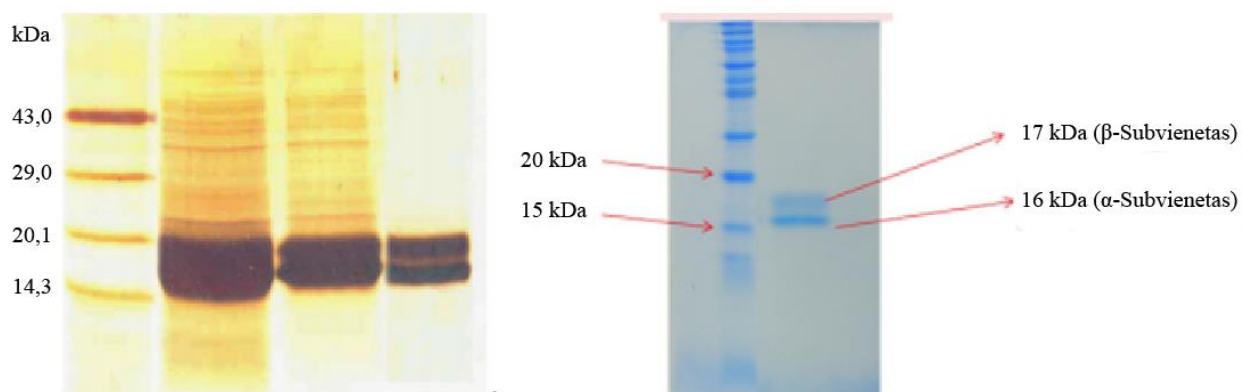
Darbo uždaviniai:

- Ištirti statoriaus – rotorius tinkamumą kultūros ardymui
- Nustatyti normalaus filtravimo greitį, filtruojant ištirpintas nuosėdas gautas po išsodinimo amonio sulfatu
- Nustatyti diafiltravimo, filtravimo greitį ir DV, naudojant prafiltruotą mėginį
- Ištirti fikocianino C stabilumo priklausomybę nuo pH
- Nustatyti chromatografinio gryninimo parametrus:
 - Su anijonitu Q – Sepharose XL
 - Su katijonitu SP – Sepharose XL
- Atlikti gauto produkto analizę: įvertinti grynumą ir molekulinę masę kapiliarine elektroforeze, ir molekulinį sietų chromatografija
- Atliekamas gamybos proceso projektavimas surenkant maksimalų žaliavos kiekį

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Fikocianino C savybės

Fikocianinas C, tai pigmentinis baltymas, sudarytas iš dviejų α ir β subvienetų. Subvienetas α turi trumpesnę polipeptidinę grandį nei β , pasižymi vienu fikobilinu (fikobilinas – chromoforinė grupė randama baltymuose, kurie pasižymi šviesos absorbcija) prijungtu prie 84 cisteino liekanos, molekulinė masė svyruoja nuo 12 iki 19 kDa. Subvienetas β pasižymi dviem fikobiliniais prijungtais prie 84 ir 155 cisteino liekanų, molekulinė masė svyruoja tarp 14 – 21 kDa. Tokios struktūros fikocianinas C randamas visuose organizmuose, jis gali skirtis aminorūgščių liekanų seka ir sekos ilgiu. Palyginus 2 mikroorganizmų (*Phormidium ceylanicum* ir *Spirulina platensis*) fikocianino C elektroforezės rezultatus – matyti, kad tikslinio baltymo molekulinės masės yra beveik identiškos (žr. 1.1. pav.) – [5].

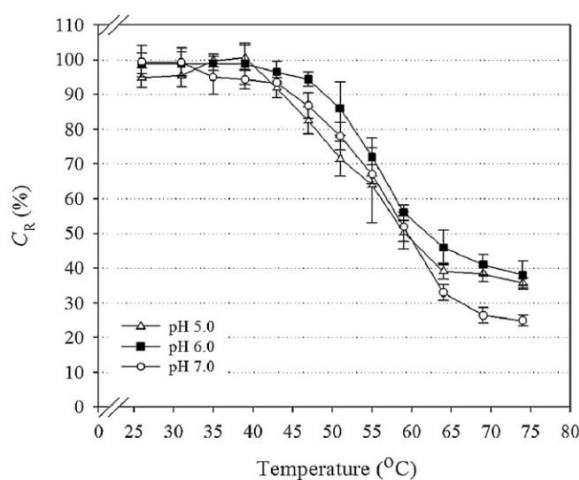


1.1. pav. Fikocianino C gauto iš dviejų skirtingų mikroorganizmų elektroforezės rezultatai. Fikocianinas C dešinėje iš *Phormidium ceylanicum*, kairėje iš *Spirulina platensis* – [5, 6].

Mikroorganizmuose pigmentinės medžiagos (chlorofilai, karotinoidai, fikobiliproteinai) skirtos absorbuoti šviesą ir konvertuoti ją į cheminę energiją. Šviesa yra būtinas komponentas, kad fikocianinas C būtų sintetinas. Buvo nustatyta, kad mikroorganizmas *Arthronema africanum* susintetina didžiausią fikocianino C koncentraciją auginant 36°C temperatūroje. Esant mažam šviesos intensyvumui (50 $\mu\text{mol}(\text{fotonų})/\text{m}^2\text{s}$) tikslinis baltymas sudarė tik 12,5 % sausos biomasės. Pakėlus šviesos intensyvumą iki 150, tikslinio baltymo koncentracija sudarė apie 24 % sausos biomasės. Keliant šviesos intensyvumą per 150, fikocianino C koncentracija pradeda mažėti – [7].

Fikocianinas C, kaip ir dauguma baltymų, yra jautrus temperatūros pokyčiams. Tai buvo ištirta, matuojant fikocianino C fluorescenciją. Keliant temperatūrą, fluorescencijos intensyvumas mažėja tiesiškai, pasiekus 60 °C fluorescencija išnyksta – [8]. Tikslinis baltymas yra stabilus iki 60 °C. Terminis denatūravimas taip pat yra stebimas matuojant šviesos sugertį bangos ilgyje kuriame, fikocianinas C pasižymi aukščiausiu sugertimi – 620nm. Sugerties pokytis (žr. 1.2. pav.), panašiai kaip ir matuojant fluorescenciją, 60 °C temperatūroje pasiekia minimalią vertę, kuri toliau

nežymiai krinta didinant temperatūrą – [9]. Terminė denatūracija kinta priklausomai nuo terpės pH, kurioje yra ištirpintas tikslinis baltymas. Iš paveikslo – matyti, kad stabiliausias baltymas yra, kai pH vertė yra apie 6 – [9].



1.2. pav. C_R – fikocianino C santykinės koncentracijos (koncentracijos santykis prieš kaitinimą ir po) priklausomybė nuo temperatūros ir pH (Buvo išlaikoma 30 min atitinkamoje temperatūroje) – [9].

Siekiant padidinti tikslinio baltymo stabilumą, naudojamos apsauginės priemonės (angl. *preservatives*). Dažnai baltymams saugoti naudojamas natrio azidas arba DTT, bet šie reagentai pasižymi toksiškomis savybėmis. Fikocianinas C naudojamas maisto pramonėje, kosmetikoje, farmacijoje, todėl stengiamasi naudoti apsaugines priemones netoksiškas žmogui. Buvo patikrintos trys skirtingos priemonės (4 mg/ml koncentracijos CaCl₂, sacharozė ir citrinos r.), ir jų kombinacijos (4 ir 2 mg/ml CaCl₂ ir Sacharozė). Bandymas buvo atliekamas 15 dienų esant 0±5 °C ir 35±5°C temperatūroms. Esant 0±5 °C temperatūrai po 15 d. bendras tarp visų mėginių denatūravimo pokytis buvo menkas (nuo 12 iki 7 %), bet mažiausiai suiro mėginys į kurį nebuvo dėta papildomų apsauginių priemonių (po 15 d. liko apie 94 % fikocianino C), didžiausias suirimo laipsnis buvo aptiktas mėginyje su 2 mg/ml CaCl₂ ir sacharozė (po 15 d. liko apie 89 % fikocianino C). Esant 35±5°C temperatūrai po 15 d. buvo matomas aiškus baltymo suirimas beveik visuose mėginiuose, mėginyje su citrinos rūgštimi randamas mažiausias tikslinio baltymo praradimas (po 15 d. liko apie 91 % fikocianino C), likusiuose mėginiuose fikocianino C liko nuo 5,09 % iki 22,9 %. Nustatyta, kad kambario temperatūroje geriausiai apsaugo fikocianiną C nuo suirimo citrinų rūgštis, net po 45 d. 35±5 °C temperatūroje lieka 68 % fikocianino C – [10].

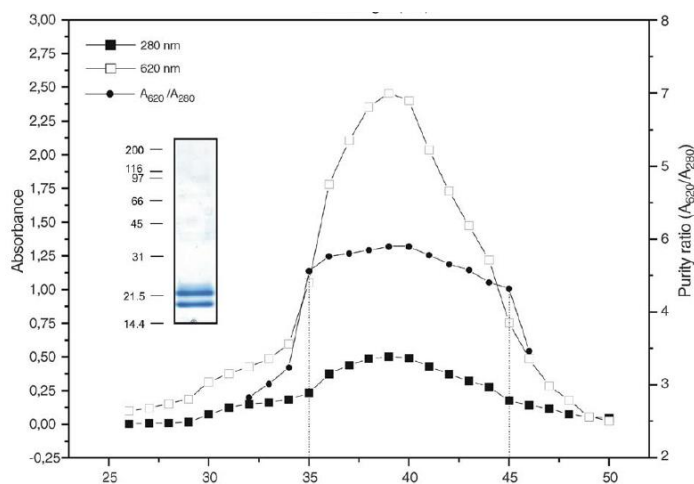
Baltymų gryninimui yra svarbus baltymo izoelektrinis taškas (pI). Fikocianino C izoelektrinis taškas yra nuo 4,7 iki 5,3, priklausomai nuo organizmo, iš kurio išgautas baltymas. Pavyzdžiui, fikocianinas C iš *Calothrix sp* pI – 5,2, o *Cyanidium caldarium* – 5,11 – [11, 12].

1. 2. Gryninimas

1. 2. 1. Fikocianino C sorbcija ant hidroksiapatito kolonos

Ekstraktas išgautas iš sauso *Aphanizomenon flos-aquae*. Sausi ekstrakto milteliai ištirpinami 0,1 M 7,0 pH natrio fosfato buferiniame tirpale. Tirpalas įsotinamas iki 50 % amonio sulfato. Po valandos (4 °C temperatūroje) suspensija centrifuguojama 10000g 30 min (4 °C temperatūroje). Gautas supernatantas nupilamas, nuosėdos ištirpinamos 5mM natrio fosfato buferiniame tirpale pH 7,0 ir dializuojamas per naktį tokia pačia buferiniame tirpale. Po dializės fikocianino C mėginys sorbuojamas ant 2,5x25 cm hidroksiapatito kolonos. Mėginio desorbcija atliekama gradientu, keičiant fosfato jonų koncentraciją nuo 5 iki 150 mM – [13]

Gaunama 50 frakcijų (žr. 1.3. pav.), desorbcija pradeda nuo 25 frakcijos (pirmos 25 frakcijos – mėginio sorbcija ant kolonos). Frakcijos nuo 35 iki 45 grynumas (sugerties santykis A_{620nm}/A_{280nm}) gaunamas aukštesnis už 4, jos apjungiamos į vieną. Bendras frakcijų grynumas gaunamas 4,78. Frakcijos, pasižyminčios aukščiausiu grynumu desorbuojamos 57,2 – 111,4 mM fosfato jonų koncentracijoje – [13].



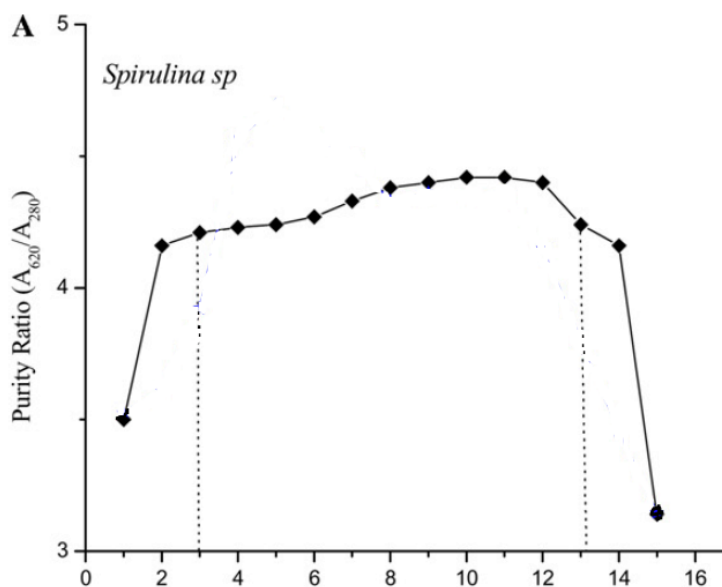
1.3. pav. Hidroksiapatito chromatografijos chromatograma, desorbuojant gradientu keliant druskos koncentraciją – [13].

1. 2. 2. Fikocianino C anijonų mainų chromatografija

1. 2. 2. 1. Sorbcija ant DEAE – Sepharose CL – 6B

Prieš įleidžiant mėginį (išgautą iš mikroorganizmo *Spirulina sp.*) į koloną, pakrautą DEAE Sepharose CL – 6B, atliekamas išsodinimas amonio sulfatu: I) įsotinama iki 25 %, pašalinami išsėdę baltymai, II) įsotinama iki 50 %, išsėdę baltymai suspenduojami 0,1 M acetatiniame buferiniame tirpale pH 4,5, susidariusios nuosėdos centrifuguojamos ir pašalinamos, III) įsotinama iki 50%, išsėdę baltymai suspenduojami 5 mM fosfatiniame buferiniame tirpale pH 7,0. Gautas tarpinis produktas dializuojamas per naktį prie 4 °C. Po dializės mėginys buvo

įleidžiamas į 1,5x15 cm dydžio koloną. Desorbcija buvo atliekama 0,5 ml/min greičiu, formuojant NaCl gradientą, didinant koncentraciją nuo 0,1 iki 0,25 M. Užleidus mėginį į koloną, tikslinis baltymas desorbuoja, kai NaCl koncentracija yra nuo 0,1 iki 0,2 M, o surenkamos frakcijos yra nuo 3 iki 13, kurių grynumas didesnis nei 4 (1.4. Pav.). Gryninimo rezultatai pateikti 1.1. lentelėje – [14].



1.4. Pav. Grynumo laipsnis kiekvienoje desorbcijos frakcijoje – [14].

Lentelė. 1.1. Stadijos išgryninimo laipsnis ir bendra gryninimo išeiga (DEAE – Sepharose CL – 6B) – [14].

| Stadija | Grynumo laipsnis A_{620nm}/A_{280nm} | Bendra gryninimo išeiga, % |
|--|---|-------------------------------|
| Pradinis ekstraktas | 0,8 | 100 |
| Išsodinimas amonio sulfatu, įsotinant iki 25 % | 0,82 | 95 |
| Išsodinimas amonio sulfatu, įsotinant iki 50 % | 2,66 | 81,5 |
| Sorbcija ant DEAE – Sepharose CL – 6B | 4,42 | 45,6 |

1. 2. 2. 2. Sorbcija ant DEAE – Cellulose

Ekstraktas išgautas iš mikroorganizmo *Spirulina platensis* (CCC540). Biomasė buvo ardoma periodiškai užšaldant (–20) °C ir atšildant. Ląstelių nuolaužos buvo pašalinamos centrifuguojant 10 min 5000 aps/min greičiu, 4°C temperatūroje. Gautas supernatantas buvo įsotintas iki 65 % amonio sulfatu, suspensija palikta nusistovėti per naktį, 4 °C temperatūroje. Gautos nuosėdos, kuriose yra išsėdęs fikocianinas C, yra ištirpinamos 5,1 pH 20 mM acetatiniame buferiniame tirpale pH 5,1 su 50 mM NaCl ir 2 mM NaN₃. Gautas tirpalas dializuojamas per 12 – 14 kDa dydžio membraną, dializės buferinio tirpalo (toks pat kaip ir mėginio) naudojama 100 kartų

didesnis tūris nei mėginio. Dializė atliekama per naktį, pakartojant 2 kartus: I) dializuojama kambario temperatūroje, II) 4 °C temperatūroje. Po dializės, atliekama anijonų mainų chromatografija. Kolona buvo atplaunama 3 V_k acetatiniu buferiniu tirpalu pH 5,1. Atlikus mėginio įleidimą į koloną, pradeda gradientinė desorbcija, 20 ml/val greičiu, mažinant desorbcijos fazės pH nuo 5,1 iki 3,76. Aukščiausias grynumas gaunamas ties pH 3,76. Gryninimo rezultatai pateikti 1.2. lentelėje – [5],

Lentelė. 1.2. Stadijos išgryninimo laipsnis ir bendra gryninimo išeiga „DEAE – Cellulose – [5].

| Stadija | Grynumo laipsnis A_{620nm}/A_{280nm} | Bendra gryninimo išeiga, % |
|--|---|-------------------------------|
| Pradinis ekstraktas | 0,75 | 100 |
| Išsodinimas amonio sulfatu, įsotinant iki 65 % | 1,5 | 80 |
| Dializė | 2,93 | 39 |
| Sorbcija ant DEAE – Cellulose | 4,58 | 14 |

1. 2. 3. Chromatografija išsiplėtusiame sluoksnyje

1. 2. 3. 1. Anijonų mainų chromatografija išsiplėtusiame sluoksnyje

Gryninimui naudojama mikroorganizmo *S. aquatilis* biomasė, užauginta fotoreaktoriuje. Po auginimo biomasė atskiriama nuo terpės centrifuguojant ir liofilizuojant. Po džiovavimo, atliekama fikocianino C ekstrakcija iš sausos biomasės: I) ištirpinant miltelius 50 mM natrio fosfato buferiniame tirpale pH 7, II) tirpalas maišomas 30 min, III) suardytų ląstelių suspensija centrifuguojama 12000 aps/min greičiu 15 min, tikslinis baltymas lieka supernatante. Po ekstrakcijos ekstraktas įleidžiamas į koloną pakrautą Streamline-DEAE jonų mainų sorbentu. Sorbento dinaminis imlumas (esant optimaliomis sorbcijos sąlygomis) – 4,9 mg(fikociano C)/ml(sorbento). Atliekant baltymo sorbciją, reguliuojamas tėkmės greitis į koloną. Parenkamas toks tėkmės greitis, kad sorbento išsiplėtimo koeficientas H/H_0 (santykis tarp išsiplėtusio sorbento aukščio pakėlus tėkmės greitį ir sorbento aukščio ramybės stadijoje) būtų apie 2 (šis dydis taip pat optimalus naudojant sorbentą – Q – Streamline XL) Mobilios fazės greitis 9,6 ml/min. Esant mažesniai arba didesniai išsiplėtimo koeficientui, mažėja gryninimo išeiga. Palaikant tokias pačias sorbcijos sąlygas, bet sumažinus klampą, praskiedžiant mėginį iš 1,157mP (miliPuazas) į 1,020, mėginio tūris padidėja 4 kartus, sorbcijos trukmė pailgėja 4 kartus, o gryninimo išeiga padidėjo tik 7 %. Fikocianinas C buvo desorbuojamas įleidus į koloną 0,5 M natrio fosfato buferinį tirpalą (iš viršaus į apačią). Chromatografijos rezultatai pateikiami 1.3. lentelėje – [15, 16].

Lentelė. 1.3. Stadijos išgryninimo laipsnis ir bendra gryninimo išeiga (Streamline – DEAE) – [15].

| Stadija | Grynumo laipsnis A_{620nm}/A_{280nm} | Bendra gryninimo išeiga, % |
|---|---|-------------------------------|
| Pradinis ekstraktas | 0,7 | 100 |
| Išsiplečiančio sluoksnio chromatografija, be klampos mažinimo | 2,61 | 84 |
| Išsiplečiančio sluoksnio chromatografija, sumažinus klampą | 2,61 | 91 |

1. 2. 3. 2. Hidrofobinės sąveikos chromatografija išsiplėtusiame sluoksnyje

Naudojamas hidrofobinės sąveikos sorbentas – STREAMLINE™ Phenyl. Paruošiamas mėginys: sausi *S. platensis* milteliai ištirpinami 0,5 M amonio sulfato tirpale. Suspensija paliekama 12 h 4 °C temperatūroje, kad ląstelių sienelės suirtų dėl osmosinio šoko. Lizuotų ląstelių suspensija centrifuguojama 10000 g 10 min 4 °C temperatūroje. Supernatantas surenkamas, o su gautomis nuosėdomis kartojama ekstrakcija su tuo pačiu tirpalu. Gauti supernatantai apjungiami į vieną. Prieš užleidžiant gautą ekstraktą į koloną, kolona yra nulygsvarinama su 0,5 M amonio sulfato tirpalu ir parenkamas tėkmės greitis, kad išsiplėtimo koeficientas, kaip ir anksčiau minėta, būtų apie 2. Baigus lygsvarinti, užleidžiama baltymo suspensija. Tikslinis baltymas, hidrofobinia sąveika, prisijungia prie sorbento, o likusios nuosėdos ir neprisijungę baltymai, pašalinami iš kolonos. Po sorbcijos, atliekamas kolonos atplovimas su 0,5 M amonio sulfato tirpalu, kad iš kolonos būtų pašalintos neprisijungusios dalelės. Tikslinis baltymas yra eliuuojamas iš viršaus į apačią, mažinant mobilioje fazėje amonio sulfato druskos koncentraciją. Aukščiausias grynumo laipsnis A_{620nm}/A_{280nm} – 3,6 gaunamas desorbuojant su 0,05 M amonio sulfato tirpalu, bet desorbuojama mažiau tikslinio baltymo, daugiausia baltymo desorbuojama eliuojant su distiliuotu vandeniu, bet gaunamas grynumo laipsnis tik – 2,61 – [17].

1. 2. 4. Tangentinis filtravimas

Filtravimo procesas naudojamas atskirti ląstelių nuolaužų daleles (mikrofiltravimas) arba pašalinti nereikalingą vandens kiekį iš fikocianino C suspensijos (diafiltravimas). Bandyje buvo naudojama fotoreaktoriuje užauginta *Spirulina sp* kultūra. Užaugintos biomasės milteliai, gauti liofilizuojant, buvo suspenduojami 0,1 M 7 pH natrio fosfato buferiniame tirpale pH 7 ir ekstrahuojama 4 h. Po ekstrakcijos gauta suspensija centrifuguojama 4800 g 15 min. Tikslinis baltymas lieka supernatante, nuosėdos pašalinamos. Atskirtas supernatantas I) filtruojamas per 1 ir 5 μm porų dydžio membranas (membranų plotas – 0,15 m²), II) gautas permeatas filtruojamas per 0,2/0,8 ir 0,2 μm (membranų plotas – 0,02 m²) porų dydžio membranas, III) permeatas koncentruojamas per 50, 70, 100 kDa (membranų plotas – 0,005 m²) dydžio membranas – [18].

Lyginant pirmame filtravimo etape naudojamas membranas, pagal rezultatus – matyti, kad abejose membranose pratekėjimo srautas išsilaiko daugiau mažiau nepakitęs. Skirtumas tarp membranų randamas pratekėjimo sraute ir fikocianino C išeigoje. 5 µm membrana pasižymėjo didesniu pratekėjimo srautu ir aukštesne tikslinio baltymo išeiga negu 1 µm (žr. lentelė. 1.4). Pagal lentelėje pateiktus rezultatus optimaliausias tėkmės greitis 5 µm membranai – 100 ml/min – [18].

Antrame filtravimo etape, pratekėjimo greitis išsilaiko pastovus tik per 0,2/0,8 µm membraną, naudojant 0,2 µm membraną, po 2 min nuo proceso pradžios, pratekėjimo greitis sumažėjo nuo 217 iki 55 (l/m²*val). Proceso pratekėjimo greitis stabilizuojasi tik po 5 min (žr. lentelė. 1.4). Lyginant abiejų membranų efektyvumą – matyti, kad ląstelių nuolaužų pašalinimas ir gaunama fikocianino C išeiga yra aukštesnė naudojant 0,8/0,2 µm membranas. Pagal lentelėje 1.4. pateiktus rezultatus, optimaliausias tėkmės greitis 0,8/0,2 µm membranai – 100 ml/min – [18].

Lentelė. 1.4. Fikocianino C ekstrakto mikrofiltravimo rezultatai – [18].

| Membranos porų dydis, µm | Tėkmės greitis, ml/min | Filtravimo greitis, l/m ² *val | Ląstelių nuolaužų dalis ekstrakto, % | Fikocianino C išeiga, % |
|--------------------------|------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------|
| 5 | 50 | 21,1±0,1 | 84,5±0,8 | 89,2±1,5 |
| | 100 | 39,2±0,4 | 85,5±3,1 | 88,3±2,3 |
| | 150 | 58,5±0,5 | 88,7±1,3 | 88,6±0,9 |
| | 200 | 77,1±0,1 | 94,1±2,0 | 92,3±0,9 |
| 1 | 100 | 37,8±0,4 | 85,1±12,1 | 86,4±12,3 |
| 0,8/0,2 | 50 | 169±1,0 | 76,9±1,4 | 82,0±6,7 |
| | 80 | 251±2,0 | 78,9±1,0 | 79,6±8,6 |
| | 100 | 336±2,0 | 80,3±2,2 | 82,9±8,2 |
| 0,2 | 80 | 20±5,0 | 76,5±8,5 | 75,2±7,1 |

Trečias etapas buvo naudojamas koncentravimui ir mažesnės molekulinės masės dalelių pašalinimui iš ankščiau prafiltruoto mėginio, kurio grynumas (sugerties santykis A620nm/A280nm) – 0,54, koncentracija – 0,59 mg/ml. Lyginant ankščiau minėtas trijų skirtingų dydžių membranų ultrafiltracijos proceso rezultatus – matyti, kad 50 ir 70 kDa membranos pasižymi truputį mažesniu pratekėjimo srautu, negu 100 kDa, bet fikocianino C sulaikymo koeficientas (angl. *retention rate*) ir tikslinio baltymo koncentracija yra aukštesnė. Tiriant tikslinio baltymo grynumą – matyti, kad aukščiausias grynumas gaunamas filtruojant per 50 kDa membraną (žr. lentelė. 1.5.). Vandens kiekis buvo sumažintas kiekviena membrana 90 % – [18].

Lentelė. 1.5. Fikocianino C, skaidrinto mikrofiltravimu, ultrafiltracijos rezultatai – [18].

| Nominali molekulinės masės riba, kDa | Tėkmės greitis, ml/min | Trans-membraninis slėgis, Pa | Filtravimo greitis, l/m ² *val | Grynumas | Tikslinio baltymo koncentracija, mg/ml | Užlaikymo faktorius, % |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------------|---|-----------|--|------------------------|
| 50 | 130 | 138 | 75 – 50 | 1,11±0,32 | 5,81±2,71 | 99 |
| 75 | 130 | 138 | 75 – 50 | 1,03±0,36 | 4,40±1,21 | 97,5 |
| 100 | 130 | 138 | 110 – 75 | 1,08±0,30 | 3,67±0,78 | 94,2 |

1. 2. 5. Pasiskirstymas dvifazėje sistemoje

Tyrime buvo tikrinama įvairių faktorių įtaka ekstrakcijai dvifazėje sistemoje. Tiriama faktoriai: sistemos tipas (sistemos sudėtis – polimeras su polimeru ar polimeras su druska), fazę formuojančios druskos pasirinkimas, polimerinės medžiagos molekulinė masė, sistemos pH, TLL (angl. *Tie line length*), fazių tūrio santykis, pakartotinė ekstrakcija. Tyrime buvo naudojama *Spirulina sp.* kultūra suardyta didelio slėgio homogenizatoriumi 200 – 400 kg/cm² 5 min. Ląstelių nuolaužos buvo pašalintos centrifuguojant 10000 aps/min 10 min. Fikocianinas C pagal tyrimus, turi giminingumą polimerinei fazei, todėl tikslinis baltymas po ekstrakcijos yra randamas viršutinėje fazėje – [19, 20].

Lyginant sistemos tipus: polimeras – polimeras (PEG su maltodekstrinu) ir polimeras – druska (PEG su kalio fosfatu) nustatyta, kad įmaišius fikocianino C ekstraktą į abi sistemas, sistema sudaryta iš polimero – druskos, pasižymėjo aukštesniu išgryninimo laipsniu (1,5 k.). Sistema, sudaryta iš polimero – druskos, yra ekonomiškesnė (kalio fosfato druska yra pigesnė už maltodekstriną) ir pasižymi mažesne klampa, kas pagreitina fazių formavimą – [19].

Pasirenkant fazę formuojančią druską, buvo tikrinama: natrio fosfatas, kalio fosfatas, magnio sulfatas, natrio sulfatas, amonio sulfatas ir natrio citratas. Lyginant tikrinamų druskų ekstrakcijos rezultatus buvo nustatyta, kad aukščiausias grynumas gaunamas ekstrahuojant fosfato druskomis, tiksliau – kalio fosfatu ($A_{620nm}/A_{280nm} - 2,75$). Rezultatai parodė, kad vykdant procesą su sulfato druskomis gaunamas grynumo laipsnis (aukščiausias – 2,45) yra mažesnis ir tikslinis baltymas proceso metu iškrenta į nuosėdas. Ekstrahuojant natrio citratu, gaunamas grynumas prilygsta sulfato druskoms, bet pranyksta fikocianinui C būdinga mėlyna spalva, tai parodo baltymo suirimą – [19, 20].

Nustačius optimaliausią fazę formuojančią druską, tolimesnis darbas – patikrinti PEG skirtingas molekulinės masės (1,5 kDa, 4 kDa, 6 kDa, 20 kDa). Atlikus ekstrakcijas su visais molekulinės masės variantais, nustatyta, kad aukščiausias grynumo laipsnis ($2,75 \pm 0,04$) gaunamas naudojant 4 kDa PEG, bet fikocianino C išeiga yra didesnė naudojant 1,5 kDa (1,5 kDa – 96,59 %, 4 kDa – 90,58 %). Mažesnis grynumas su aukštesnės molekulinės masės PEG paaiškinamas

padidėjusių polimero hidrofobiškumu (ilgesnės grandinės pasižymi mažesniu hidroksilo grupių kiekiu, kas lemia didesnę hidrofobiškumą) – [19, 20, 21].

Kitas svarbus faktorius dvifazėje sistemoje yra sistemos pH vertė. Tyrimas buvo atliekamas naudojant 4 kDa PEG su kalio fosfatu, fazę formuojančia druska, keičiant sistemos pH vertę nuo 5 iki 8. Pagal rezultatus – matyti, kad aukščiausias grynumo laipsnis gaunamas esant pH vertei – 6 – [19].

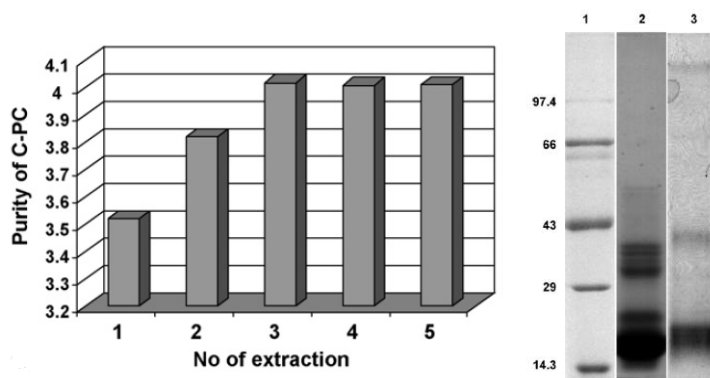
Atlikus su 5 skirtingais TLL (žr. formulę 1.1) (13,33%, 21,42%, 28,20%, 33,53%, 39,70%) dydžiais dvifazę ekstrahciją, buvo nustatyta, kad esant TLL vertei 33,53 buvo gaunamas aukščiausias grynumo laipsnis ir fikocianino C koncentracija – [19].

$$TLL = \sqrt{(C_{PTP} - C_{PBP})^2 - (C_{SBP} - C_{STP})^2} \quad (1.1)$$

Čia: C_{PTP} – polimero viršutinės fazės koncentracija, C_{PBP} – polimero viršutinės fazės koncentracija, C_{SBP} – druskos apatinės fazės koncentracija, C_{STP} – druskos viršutinės fazės koncentracija.

Atliekant ekstrahcijas, keičiant tik fazių tūrio santykius (V_T/V_B , kur V_T – viršutinės fazės tūris, V_B – apatinės fazės tūris), buvo nustatyta, kad nuo 0,3 iki 0,9 tūrio santykio, fikocianinas C gaunamas vis grynesnis, bet toliau didinant santykį, į viršutinę fazę pradeda ekstrahuotis pašaliniai baltymai, kurie sumažina grynumo laipsnį. Aukščiausias grynumo laipsnis (3,52) ir išeiga (85,68 %) gaunami pakėlus fazių tūrinį santykį iki 0,9 – [19, 21]

Naudojant visus ankščiau ištirtus kriterijus, fikocianino C grynumą galima padidinti – atliekant pakartotinę ekstrahciją. Pakeitus tik apatinę fazę, pašaliniai baltymai migruoja į atnaujintą fazę, todėl matomas aiškus tikslinio baltymo grynumo padidėjimas. Procesą galima pakartoti tik 2 kartus (žr. 1.5. pav.). Galutinio produkto grynumas gaunamas – 4,05 su 85 % išeiga – [19]



1.5. Pav. Kairėje paveikslo pusėje matoma grynumo priklausomybė nuo pakartotinių ekstrahcijų grafiką. Dešinėje matoma fikocianino C elektroforezės atvaizdą po 2 pakartotinių ekstrahcijų (1) molekulinės masės standartas, 2) pradinis ekstraktas, 3) galutinis produktas) – [19].

1. 2. 6. Molekulinių sietų chromatografija

Molekulinių sietų chromatografija buvo atliekama ant Sephacryl S – 100HR nešiklio. Tyrime naudojama *S. Platensis* biomasė buvo užauginta fotoreaktoriuje ir išdžiovinta. Biomasė buvo ardama rutuliniu malimu. Fikocianino C ekstrakcija buvo atliekama suspenduojant suardytą biomasę vandenyje. Po tikslinio baltymo ekstrakcijos, buvo atliekamas išsodinimas amonio sulfatu. Ekstraktas įsotinamas nuo 0 iki 20 % amonio sulfatu, supernatantas surenkamas, nuosėdos išmetamos. Gautas supernatantas įsotinamas nuo 20 iki 50 % amonio sulfatu, supernatantas išmetamas, nuosėdos ištirpinamos 50, mM natrio fosfato buferiniame tirpale pH 7 – [22].

Kolona buvo pakrauta 12 ml nešiklio (diametras – 1 cm, nešiklio aukštis – 15 cm). Kolona buvo lygsvarinama 50 mM natrio fosfato buferiniu tirpalu pH 7. Į koloną buvo įleidžiama nuo 1 iki 4 % mėginio nuo kolonos tūrio. Tiriama du mėginiai (vienas dializuotas, kitas nedializuotas po išsodinimo amonio sulfatu), buvo įvertinamas jų grynumas (A_{620nm}/A_{280nm}). Nustatyta, kad iš nedializuoto mėginio buvo pašalinami amonio sulfato jonai ir gaunamas grynumas – aukštesnis nei mėginio, kuris buvo dializuotas. Rezultatai pateikiami lentelėje (žr. lentelė. 1.6.) – [22].

Lentelė. 1.6. Stadijos išgryninimo laipsnis ir bendra gryninimo išeiga – [22].

| Stadija | Grynumo laipsnis A_{620nm}/A_{280nm} | | Bendra gryninimo išeiga, % | |
|----------------------------|---|------------|----------------------------|------------|
| | Nedializuota | Dializuota | Nedializuota | Dializuota |
| Pradinis ekstraktas | 0,63 | 0,63 | 100 | 100 |
| Išsodinimas amonio sulfatu | 1,32 | 1,32 | 88,6 | 88,6 |
| Dializė | - | 0,99 | - | 88,6 |
| Gelfiltracija | 1,37 | 1,73 | 65,3 | 60,4 |

1. 2. 7. Apjungti gryninimo procesai

Apjungiant ankstesniuose skyriuose paminėtus gryninimo procesus: sorbcija ant hidroksiapatito, anijonų mainų chromatografija, išsiplečiančio sluoksnio chromatografija, tangentinis filtravimas, pasiskirstymas dvifazėje sistemoje ir molekulinių sietų chromatografija. Rezultatai pateikiami lentelėje (žr. lentelė. 1.7.).

Lentelė. 1.7. Naudojami fikocianino C gryninimo metodai.

| Gryninimo procesas | Galutinis grynumas A_{620nm}/A_{280nm} | Bendra gryninimo išeiga, % | Šaltinis |
|--|---|-------------------------------|----------|
| 1. Išsodinimas amonio sulfatu 2. Molekulinių sietų chromatografija 3. Anijonų mainų chromatografija | 3,16 | 41,7 | [22, 23] |
| 1. Išsodinimas amonio sulfatu 2. Anijonų mainų chromatografija 3. Molekulinių sietų chromatografija | 3,3 | 31,9 | [22] |
| 1. Hidrofobinės sąveikos chromatografija išsiplėtusiame sluoksnyje 2. Anijonų mainų chromatografija | 3.64 | 8.7 | [17] |
| 1. I dviejų fazių ekstrakcija 2. II dviejų fazių ekstrakcija 3. Ultrafiltracija 4. Išsodinimas amonio sulfatu | 3,8 | 29,5 | [24] |
| 1. Anijonų mainų išsiplėtusiame sluoksnyje 2. Anijonų mainų chromatografija | >4 | 69 | [15] |
| 1. Išsodinimas amonio sulfatu 2. Sorbcija ant hidroksiapatito 3. Anijonų mainų chromatografija | 4,15 | - | [25] |
| 1. Anijonų mainų chromatografija 2. Hidrofobinės sąveikos chromatografija | 3,5 | 80% | [12] |

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2. 1. Medžiagos

Darbe naudojamos medžiagos:

- 10 % bazinis fuksinas (Sigma-Aldrich, kat Nr. 857343)
- Sausas amonio sulfatas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EMD Millipore, Kat Nr. 1012090500)
- Sotus amonio sulfato tirpalas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EMD Millipore, kat Nr. 1012090500)
- Anijonitas Q – Sepharose XL (GE, kat 17-5072-01)
- Katijonitas SP – Sepharose XL (GE, kat Nr. 17-5073-01)
- Užšaldyta *Aphenizomenon flos – aquae* kultūros suspensija. Surinkta Kuršių mariose 2016 metų rudenį.
- Fosforo rūgštis (Sigma-Aldrich, kat Nr. W290017)
- Natrio hidroksidas (EMD Millipore, kat Nr. 1064621000)
- Acto rūgštis (EMD Millipore, kat Nr. 1000630510)
- TRIS (Sigma-Aldrich, kat Nr. 93286)
- Druskos rūgštis (EMD Millipore, kat Nr. 1003191000)
- Ceolitas 545 dalelių dydis nuo 20 iki 100 μm (EMD Millipore, kat Nr. 89501-604)
- DTT (Biovectra kat Nr. 1365MBG)
- 95 % etanolis
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, kat Nr. B0770)
- BSA (Sigma–Aldrich, kat Nr. A2153)
- Sausas ledas
- TFA (Sigma–Aldrich, kat Nr. 74564)
- Acetonitrilas (Sigma–Aldrich, kat Nr. 271004)
- Karbamidas (Sigma–Aldrich, kat Nr. U5378)
- Glicerolis (Sigma–Aldrich, kat Nr. G5516)
- 8 – 15 kDa dydžio dializės žarna „SERVA Visking dialysis tubing type 20/32“ (Serva kat Nr. 44110)
- Chromatografinė kolonėlė „Waters Protein BEH SEC 125A 4,6 x 150 mm“ užpildo dalelės 1,7 μm dydžio
- Chromatografinė kolonėlė „Waters Protein BEH SEC 125A 4,6 x 300 mm“ užpildo dalelės 1,7 μm

2. 2. Aparatūra

Darbe naudojama aparatūra:

- pH – metras „Consort P903“
- Rotacinė maišyklė „Bio RS – 24, Mini – rotator“
- Konduktometras „HI-8733 Portable Multi-range Conductivity Meter“
- Centrifuga „Hettich ROTOFIX 32A“
- Spektrofotometras „CR Scientific UV 200 RS“
- Mikroskopas „Leica DM1000“
- Centrifuga „Hettich Universal 320 R“
- Centrifuga „SORVALL Evolution™ RC Superspeed Centrifuge“
- Homogenizatorius „T 25 digital ULTRA-TURRAX“
- Tangentinio filtravimo sistema:
 - Peristaltinis siurblys „Masterflex L/S“
 - Siurblio galva „Masterflex Easy-Load III“
 - Žarna „Masterflex platinum-cured silicone tubing, L/S 15“
 - 10 kDa NMWL membrana 0,14 m² ploto „Amersham Biosciences UFP – 10 – C – 4X2MA“
- Chromatografinė sistema:
 - Gradientorius „Pharmacia Biotech Programmer GP-250 plus“
 - Peristaltinis siurblys „Amersham Bioscience pump P-1“
 - Detektorius „LKB Bromma 2238 UVICORD SII“
 - Saviraštis „Amersham Biosciences Rec112“
 - Kolektorius „Pharmacia Biotech LKB SuperFrac“
- Liofilizatorius SP Scientific VirTis BenchTop 2K
- Bioanalizatorius „CE: Agilent 2100 Bioanalyzer“
- Chromatografas „THERMO Ultimate 3000“, kompiuterinė programa „Chromeleon 6.80“

2. 3. Metodai

2. 3. 1. Dažymas baziniu fuksinu

Tyrime naudojamos medžiagos: 10 % bazinis fuksinas.

Tyrime buvo naudojama įranga: mikroskopas „Leica DM1000“.

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Ant objektinio stiklelio užlašinamas tiriamoji suspensija.

2. Tiriamoji suspensija fiksuojama karščiu ant stiklelio švelniai pašildant kol išgaruos suspensijoje esantis vanduo.
3. Po fiksacijos atliekamas dažymas fuksino dažu.
4. Stiklelis su dažu nuplaunamas su distiliuotu vandeniu. Drėgnas stiklelis išdžiovinamas.
5. Ant stiklelio užlašinama imersinio aliejaus.
6. Fotografuojamas mikroskopu gaunamas vaizdas.

2.3.2. Biomasės ardymas ir ląstelių suardymo įvertinimas

Metodo tikslas nustatyti Kuršių mariose surinktos biomasės suardymo efektyvumą, stebint ląstelių suirimo laipsnį mikroskopu.

Tyrime naudojamos medžiagos: amonio sulfatas (sausas ir sotus tirpalas).

Tyrime buvo naudojama įranga: centrifuga „SORVALL Evolution™ RC Superspeed Centrifuge“, homogenizatorius „T 25 digital ULTRA-TURRAX“.

Tyrimas buvo atliekamas:

2. Iš atšildytos biomasės, dar nepradėjus ardymo proceso, paimamas tepinys dažymui fuksinu.
3. Nustatomas homogenizatoriaus greitis į 12000 aps/min.
4. Pradedamas pirmosios biomasės homogenizavimas, periodiškai didinama bendra ardymo trukmė: I) ardoma 15 s, II) 1 min, III) 2 min 30 s, IV) 4 min. V) 6 min, VI) 9 min. Po kiekvieno pasąžo buvo imamas tepinėlis dažymui fuksinu.
5. Nustatomas homogenizatoriaus greitis į 24000 aps/min.
6. Pradedamas antrosios biomasės ardymas, periodiškai didinama bendra ardymo trukmė: I) ardoma 30 s, II) 1 min 30 s, III) 3 min, IV) 5 min. Po kiekvieno pasąžo buvo imamas tepinėlis dažymui fuksinu.
7. Abi biomasės po ardymo centrifuguojamos 30000 g 5 min. Su supernatantu dirbama toliau.
8. Į atskirtą supernatantą įberiama amonio sulfato, kad tirpalo įsotinimo laipsnis pasiektų 50 %.
9. Įsotintas tirpalas centrifuguojamas 30000 g 5 min. Gautas supernatantas pašalinamas.
10. Gautos nuosėdos su tiksliniu baltymu suspenduojamos sočiame amonio sulfato tirpale.

2.3.3. Normalusis filtravimas

Metodas buvo naudojamas, atskirti suspenduotas daleles (likusias ląstelių nuolaužas, lipidus ir kt) iš tirpalo su tiksliniu baltymu.

Tyrime naudojamos medžiagos: ceolitas, fosforo rūgšties tirpalas, natrio hidroksido tirpalas, DTT tirpalas

Tyrime buvo naudojama įranga: pH – metras „Consort P903“, centrifuga „Hettich Universal 320R“, chromatografinė sistema

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiama 10 mM natrio fosfato buferinis tirpalas pH 7 su 1 mM DTT.
2. Paruošiamas mėginys filtravimui. Centrifuguojama 500 ml išsodinto amonio sulfatu tikslinio baltymo suspensija. (Centrifuguoja 9000 g 10 min). Gautos nuosėdos suspenduojamos iki 1000 ml su buferiniu tirpalu.
3. Ceolitas suspenduojamas buferiniame tirpale. Ceolito suspensija pakraunama į 2,6 cm diametro chromatografinę koloną (ceolito aukštis kolonoje apie 1 cm). Gauname 5.3 ml ceolito vienam filtravimui.
4. Sukalibruojamas siurblys. Siurblio greitis nustatomas 10 ml/min.
5. Pradedamas filtravimo procesas. Tikslinio baltymo tirpalas leidžiamas į koloną.
6. Matuojamas filtravimo greitis (matuojama per kiek laiko yra surenkama 25 ml filtrato).
7. Kai filtravimo greitis beveik sustoja, kolona yra praplaunama su buferiniu tirpalu.
8. Pakeičiamas kolonoje esantis ceolitas nauju (aukštis toks pat).
9. Procesas kartojamas, kol bus prafiltruotas visas mėginio tūris.

2.3.4. Dializė

Metodas buvo naudojamas pašalinti mažo molekulinio dydžio daleles iš baltyminio tirpalo po išsodinimo su amonio sulfatu.

Tyrime naudojamos medžiagos: fosforo rūgšties tirpalas, natrio hidroksido tirpalas, DTT tirpalas, 8 – 15 kDa dydžio dializės žarna „SERVA Visking dialysis tubing type 20/32“

Tyrime buvo naudojama įranga: centrifuga „Hettich Universal 320 R“, pH – metras „Consort P903“, konduktometras „HI-8733 Portable Multi-range Conductivity Meter“

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiami 5 l 10 mM dializės buferinio tirpalo su 1 mM DTT.
2. Išmatuojamas savitasis elektrinis laidis paruošto tirpalo.
3. Dializės žarna išbrinkinama paruoštame buferiniame tirpale.
4. 100 ml baltyminės, išsodintos amonio sulfatu, suspensijos centrifuguojama 9000 g greičiu 10 min.
5. Gautas supernatantas pašalinamas, nuosėdos ištirpinamos dializės buferiniame tirpale.
6. Išmatuojamas baltyminio tirpalo savitasis elektrinis laidis.
7. Paruoštas baltyminis tirpalas supilamas į išbrinktą dializės žarną.
8. Užpildyta žarna užrišama ir patalpinama į rezervuarą su 5 l buferinio tirpalo. VS – 50.

9. Po paros išmatuojamas tirpalo esančio rezervuare savitasis elektrinis laidis. Tikrinamas savitasis elektrinis laidis, kad būtų artimas pradiniam.
10. Rezervuare esantis tirpalas pašalinamas, užpildomas 5 l nauju buferiniu tirpalu identišku pradiniam. VS - 50.
11. Po paros išmatuojamas rezervuaro turinio savitasis elektrinis laidis. Tikrinamas savitasis elektrinis laidis, kad būtų artimas pradiniam.
12. Išmatuojamas baltyminio tirpalo savitasis elektrinis laidis, jei rezervuaro savitasis elektrinis laidis panašus pradiniam.

2.3.5. Diafiltravimas

Tyrime naudojamos medžiagos: fosforo rūgšties tirpalas, natrio hidroksido tirpalas, DTT tirpalas

Tyrime buvo naudojama įranga: pH – metras „Consort P903“, konduktometras „HI-8733 Portable Multi-range Conductivity Meter“, tangentinio filtravimo sistema

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiamas diafiltravimo 10 mM natrio fosfato buferinis tirpalas pH 7. Išmatuojamas tirpalo savitasis elektrinis laidis.
2. Išmatuojamas mėginio savitasis elektrinis laidis.
3. Apskaičiuojamas tėkmės greitis, naudojant vandenį.
4. Maksimaliu siurblio greičiu nustatomas transmembraninis slėgis – 1,4 bar.
5. Pradedamas mėginio padavimas. Matuojamas filtravimo greitis, trukmė, per kurią surenkama 25 ml filtrato.
6. Sukoncentravus, mėginio rezervuaras praskiedžiamas buferiniu tirpalu.
7. Praskiedus, po 1 minutės, išmatuojamas mėginio savitasis elektrinis laidis.
8. Mėginio praskiedimas kartojamas kelis kartus, kol savitasis elektrinis laidis daugiau mažiau sutampa su buferinio tirpalo.
9. Filtravimo įrangos sanitizavimas:
 3. 1. Po diafiltravimo, membrana ir vamzdynas praplaunami su buferiniu tirpalu.
 3. 2. Praplaunami su distiliuotu vandeniu.
 3. 3. Sanitizuojami su 0,1 M natrio šarmu.
 3. 4. Natrio šarmas išplaunamas su distiliuotu vandeniu.

2.3.6. Fikocianino C stabilumo priklausomybė nuo pH

Tyrime buvo naudojamos medžiagos: fosforo rūgštis, natrio hidroksidas, acto rūgštis, TRIS, druskos rūgštis.

Tyrime buvo naudojama įranga: pH – metras „Consort P903“, spektrofotometras „CR Scientific UV 200 RS“

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiami skirtingų pH 10 mM buferiniai tirpalai:

| Bufėrinis agentas | Fosforo r. | | | Acto r. | | | | | Fosforo r. | | | | | TRIS | | | | | |
|-------------------|------------|-----|---|---------|---|-----|---|-----|------------|-----|---|-----|---|------|---|-----|----|------|----|
| pH | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 | 5,5 | 6 | 6,5 | 7 | 7,5 | 8 | 8,5 | 9 | 9,5 | 10 | 10,5 | 11 |

2. Praskiedžiamas dializuotas baltyminis tirpalas, kad fikocianino C sugertis 620 nm ilgio bangoje būtų apie 10 OV.
3. Buferiniai tirpalai išpilstomi po 9 ml į atskirus mėgintuvėlius.
4. Į kiekvieną mėgintuvėlį, su skirtingu pH, įlašinamas 1 ml paruošto baltyminio tirpalo.
5. Po paros stebima sugertis 620 nm ilgio bangoje.

2.3.7. Fikocianino C imlumo priklausomybė nuo pH statinėmis sąlygomis

Metodo tikslas rasti pH, kuriose sorbuojasi ir nesisorbuoja tikslinis baltymas. Sorbentai – Q – Sepharose XL (katijonų mainų) ir SP – Sepharose XL (anijonų mainų)

Tyrime naudojamos medžiagos: fosforo rūgštis, natrio hidroksidas, acto rūgštis, Q – Sepharose XL, SP – Sepharose XL

Tyrime buvo naudojama įranga: pH – metras „Consort P903“, rotacinė maišyklė „Bio RS – 24, Mini – rotator“, spektrofotometras „CR Scientific UV 200 RS“

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiami skirtingų pH 10 mM buferiniai tirpalai:

| Bufėrinis agentas | Acto r. | | | | | | | | | |
|-------------------|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| pH | 3,6 | 4 | 4,4 | 4,8 | 5 | 5,1 | 5,2 | 5,3 | 5,4 | 5,6 |
| Bufėrinis agentas | Fosforo r. | | | | | | | | | |
| pH | 5,8 | 6 | 6,2 | 6,4 | 6,8 | 7 | 7,2 | 7,4 | 7,6 | |

2. Paruošiama 10 % sorbento suspensija:
 - 2.1. Gerai išmaišoma koncentruota sorbento suspensija.
 - 2.2. Įpilama po 5 ml suspenduoto sorbento į 2 mėgintuvėlius.
 - 2.3. Mėgintuvėlis su sorbentu centrifuguojamas 5000 aps/min 2 min.
 - 2.4. Išmatuojama pradinės suspensijos koncentracija.
 - 2.5. Pašalinamas supernatantas.
 - 2.6. Sorbentas suspenduojamas 7 pH buferiniame tirpale, kad suspensijos koncentracija būtų 10 %.
3. Praskiedžiamas dializuotas baltyminis tirpalas, kad fikocianino C sugertis 620 nm ilgio bangoje būtų apie 10 OV.

4. Išpilstoma 10 % sorbento suspensija po 1 ml suspensijos į kiekvieną mėgintuvėlį. Pilstant suspensiją, suspensija yra tolygiai sumaišoma prieš kiekvieną įpylimą į mėgintuvėlį. Į kontrolinį mėgintuvėlį nepilamas sorbentas.
5. Į mėgintuvėlius su sorbentu įpilama 8 ml buferinio tirpalo. Kiekvienam mėgintuvėliui pilami skirtingų pH tirpalai. Į kontrolinį mėgintuvėlį įpilama 9 ml buferinis tirpalas pH 7.
6. Į visus mėgintuvėlius, įskaitant kontrolę, su skirtingu pH, įpilamas 1 ml paruošto baltyminio tirpalo.
7. Paruošti mėgintuvėliai sutalpinami į rotacinę maišyklę. Mėgintuvėliai maišomi 1 val.
8. Po maišymo visi mėgintuvėliai centrifuguojami 5000 aps/min 2 min.
9. Po centrifugavimo pamatuojama visuose mėgintuvėliuose sugertis 620 ir 280 nm bangose.
10. Apskaičiuojamas mėginių imlumas. Gautos sugerčių vertės (mėginių su sorbentu) atimamos iš kontrolinės sugerties.
11. Pamatuojamas kiekvieno mėgintuvėlio pusiausvyrinis pH.

2.3.8. Jonų mainų chromtaografija

Metodas buvo naudojamas tikslinio fikocianino C grynimui. Tikrinami sorbentai: Q – Sepharose XL ir SP – Sepharose XL.

Tyrime naudojamos medžiagos: anijonitas Q – Sepharose XL, katijonitas SP – Sepharose XL, fosforo rūgštis, natrio hidroksidas, acto rūgštis, TRIS, druskos rūgštis, DTT

Tyrime buvo naudojama įranga: pH – metras „Consort P903“, konduktometras „HI-8733 Portable Multi-range Conductivity Meter“, spektrofotometras „CR Scientific UV 200 RS“, chromatografinė sistema

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiami procese naudojami buferiniai tirpalai su 1 mM DTT. Išmatuojami tirpalų savitieji elektriniai laidžiai.
2. Išmatuojamas mėginio savitasis elektrinis laidis.
3. Kalibruojamas chromatografinės sistemos siurblys.
4. Atliekamas sorbento pakrovimas. Sorbentas kraunamas tēkme.
5. Išmatuojamas sorbento aukštis.
6. Apskaičiuojamas sorbento tūris kolonoje pagal formulę (2.1).

$$V_k = H \cdot \pi \cdot \left(\frac{\varnothing}{2}\right)^2 \quad (2.1)$$

Čia: H – sorbento aukštis, cm, \varnothing - kolonos vidinis skersmuo

7. Sukalibruojamas detektorius.
8. Atliekamas kolonos lygsvarinimas 5 V_k .

9. Pamatuojama mėginio sugertis 620 ir 280 nm ilgio bangose.
10. Atliekama mėginio sorbcija ant pasirinkto sorbento. Matuojama nesisorbavusio eliuato sugertis 620 ir 280 nm ilgio bangose. Išmatuojamas surinktas tūris.
11. Po sorbcijos atliekamas kolonos atplovimas. Atplaunant yra pašalinami nesisorbavę baltymai iš kolonos. Atplovimas vykdomas, kol detektoriaus sugertis pasieks nulinę vertę. Matuojama nesisorbavusio eliuato sugertis 620 ir 280 nm ilgio bangose. Išmatuojamas surinktas tūris.
12. Po atplovimo vykdoma desorbcija. Desorbcija atliekama eliuuojant mažo molekulinio svorio priešjonių – NaCl arba keičiant mobilios fazės pH (Q – Sepharose XL pH mažinamas, SP – Sepharose XL pH didinamas). Matuojama surinktų frakcijų sugertis 620 ir 280 nm ilgio bangose. Išmatuojamas surinktas tūris.
13. Nedesorbuoti baltymai eliuojami NaOH tirpalu (0,1 – 0,5 M). Matuojama surinktų frakcijų sugertis 620 ir 280 nm ilgio bangose. Išmatuojamas surinktas tūris.

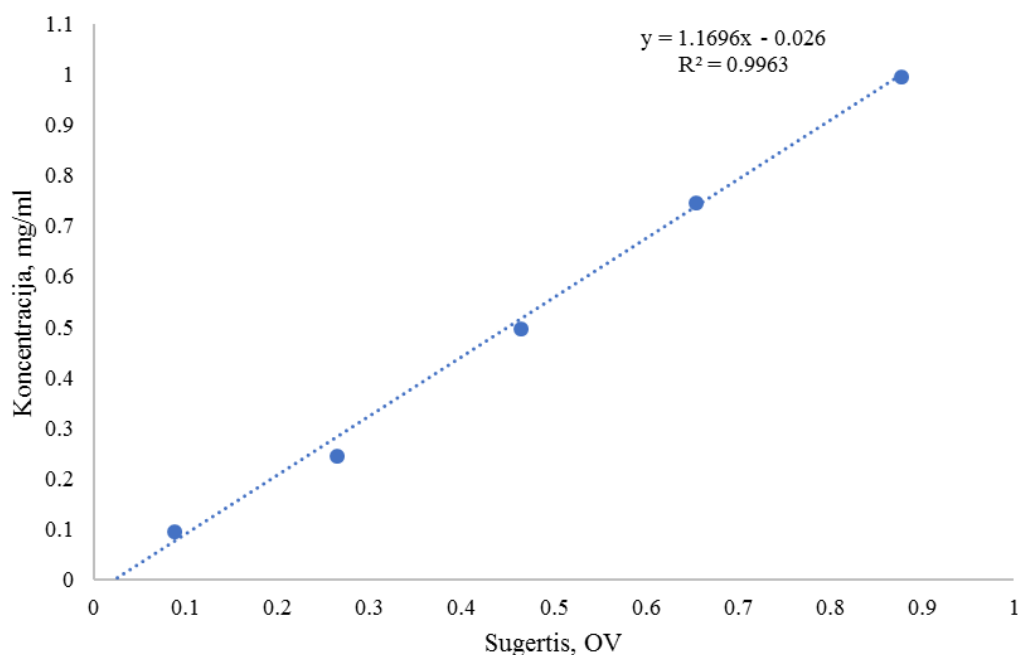
2.3.9. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford'o metodu

Tyrime naudojamos medžiagos: fosforo rūgštis, 95 % etanolis, Coomassie Brilliant Blue G-250, BSA

Tyrime buvo naudojama įranga: spektrofotometras „CR Scientific UV 200 RS“

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiamas Bradford'o reagentas:
 - 1.1. Atsveriamas 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 dažo.
 - 1.2. Dažas ištirpinamas su 25 ml 95 % etanolyje.
 - 1.3. Įpilama 50 ml 85 % fosforo rūgšties.
 - 1.4. Praskiedžiama iki 500 ml.
 - 1.5. Paruoštas tirpalas prafiltruojamas.
2. Paruošiamas 5 mg/ml koncentracijos BSA tirpalas.
3. Naudojant paruoštą 5 mg/ml tirpalą, paruošiami baltyminiai tirpalai kalibracinei kreivei: 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml ir 0,1 mg/ml.
4. Kiekvienos koncentracijos ir analizuojamo tirpalo įlašinama po 0,1 ml į mėgintuvėlį. Į kontrolę įlašinama 0,1 ml vandens.
5. Į visus mėgintuvėlius įpilama 5 ml Bradford'o reagento.
6. Išmatuojama visų mėgintuvėlių sugertis 595 nm ilgio bangoje.
7. Iš gautų verčių sudaroma kalibracinė kreivė (žr. 2.1. pav.). Pagal analizuojamo mėginio sugertį, randama tirpale ištirpusių baltymų koncentracija.



2.1. Pav. Bradford'o metodu gauta kalibracinė kreivė. Sugerties, 595 nm ilgio bangoje, priklausomybė nuo baltymų koncentracijos.

2. 3. 10. Liofilizavimas

Tyrime naudojamos medžiagos: sausas ledas

Tyrime buvo naudojama įranga: liofilizatorius SP Scientific VirTis BenchTop 2K

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Pasveriamas buteliuko svoris prieš įpilant baltyminį tirpalą.
2. Baltymo tirpalas gautas po chromatografijos, išpilstomas po 1 ml į 29 buteliukus.
3. Buteliukai patalpinami į temperatūrą izoliuojančią dėžę su sausu ledu. Buteliukai išlaikomi sausam lede 4 val.
4. Po šaldymo sausam lede buteliukai patalpinami į šaldiklį iki liofilizavimo.
5. Buteliukai yra sudedami ant liofilizatoriaus lentynų.
6. Nustatomi liofilizatoriaus parametrai – 4 Pa vakuumas, lentynų temperatūra – -80 °C. Buteliukai buvo liofilizuojami 24 val.
7. Pasveriamas buteliukas su preparatu po liofilizavimo.

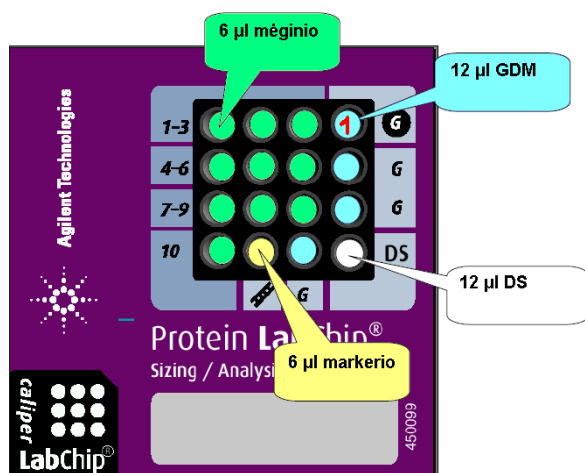
2. 3. 11. Kapiliarinė elektroforezė

Tyrime naudojamos medžiagos: karbamidai, glicerolis, DTT, TRIS

Tyrime buvo naudojama įranga: bioanalizatorius „CE: Agilent 2100 Bioanalyzer“

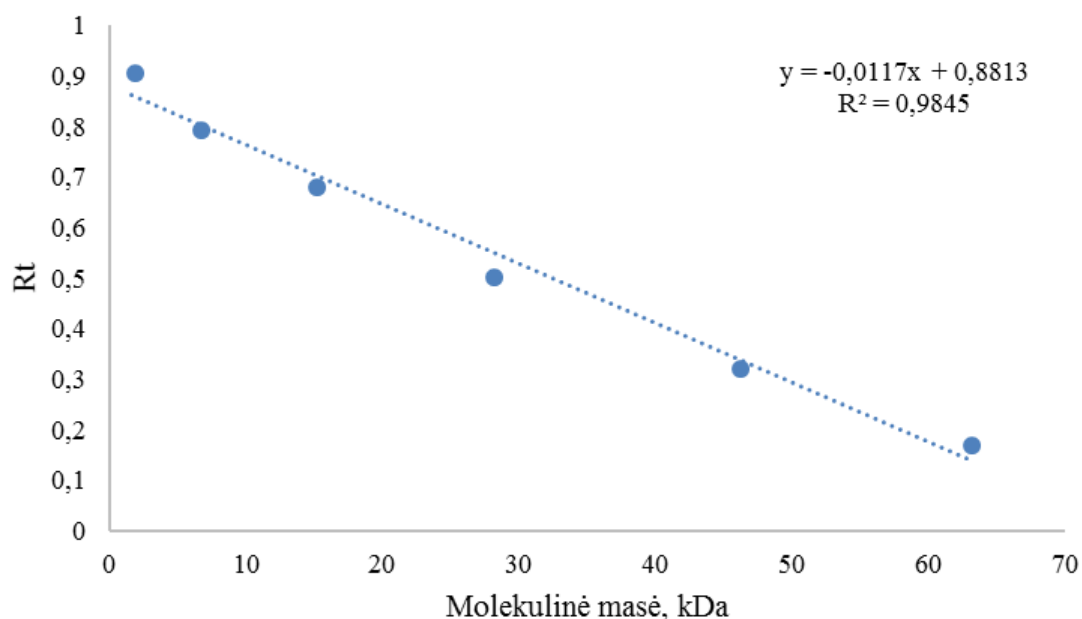
Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiamas 2 M karbamido, 15 % glicerino, 0,1 M DTT, 100 mM TRIS buferinis tirpalas 8,8 pH.
2. Paruošiamas GDM. 650 μ l „Agilent Protein 80 Gel matrix“ reagento įpilama į mėgintuvėlį su filtru. Mėgintuvėlis centrifuguojamas 2500 g 15 min. Į nufiltruotą gelį įlašinama 25 μ l dažo koncentrato. Turinys gerai išmaišomas.
3. Paruošiamas DS 650 μ l „Agilent Protein 80 Gel matrix“ reagento įpilama į mėgintuvėlį su filtru. Mėgintuvėlis centrifuguojamas 2500 g 15 min.
4. Su paruoštu TRIS tirpalu, mėginys po chromatografinio gryninimo praskiedžiamas 2 k. (mėginys prieš gryninimą neskiedžiamas).
5. Paruošiamas DN – 7 μ l 1 M DTT įpilama į 200 μ l TRIS buferinio tirpalo. Turinys išmaišomas.
6. Į abiejų mėginių (prieš ir po gryninimo) 4 μ l įpilama 2 μ l DN. 6 μ l mėginiai ir 6 μ l baltyminis standartas, patalpinami į vandens vonią. Standarto molekulinės masės: 63, 46, 28, 15, 6,5, 1,6 kDa.
7. Į atvėsintus mėgintuvėlius įpilama 84 μ l vandens. Turinys gerai išmaišomas.
8. Tirpalai išpilstomi į celes atvaizduotas paveiksle (žr. 2.1. pav.)



2.2. Pav. Bioanalizatoriaus tirpalų pilstymo nurodymai.

9. Pagal baltymų standartų elektroforezės rezultatus sudaroma kalibracinė kreivė (žr. 2.2. pav.).



2.3. Pav. Elektroforezės kalibracinė kreivė. Elektroforetinio judrumo priklausomybė nuo molekulės dydžio.

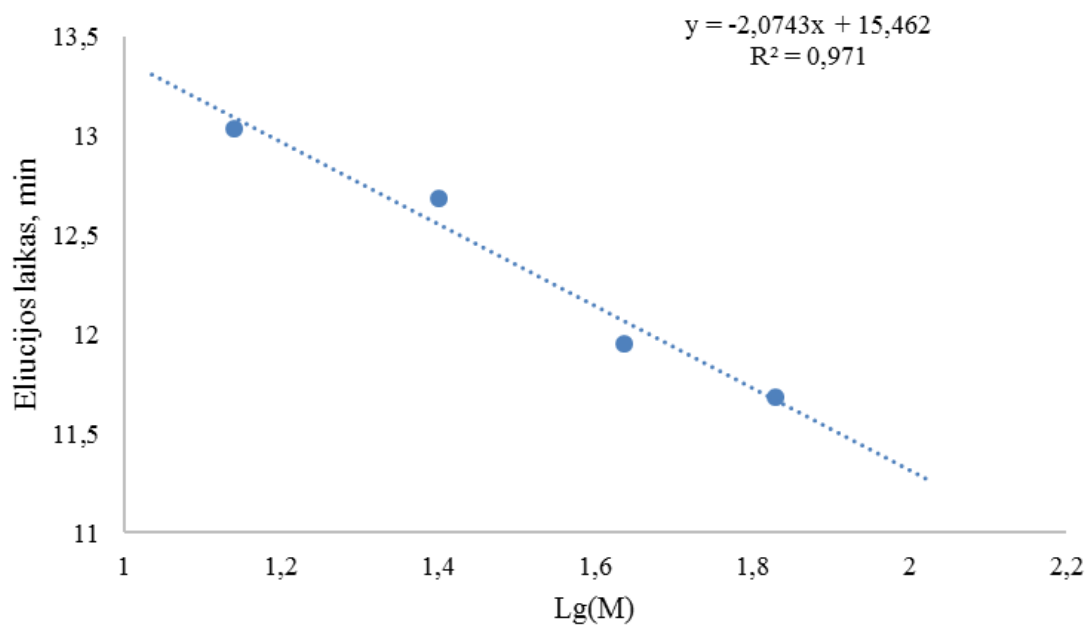
2. 3. 12. Molekulinių sietų chromatografija

Tyrime naudojamos medžiagos: acetonitrilas, chromatografinė kolonėlė „TFA, Waters Protein BEH SEC 125A 4,6 x 150 mm“ užpildo dalelės 1,7 μm dydžio, chromatografinė kolonėlė „Waters Protein BEH SEC 125A 4,6 x 300 mm“ užpildo dalelės 1,7 μm dydžio

Tyrime buvo naudojama įranga: Chromatografas „THERMO Ultimate 3000“, kompiuterinė programa „Chromeleon 6.80“

Tyrimas buvo atliekamas:

1. Paruošiamas 30 % acetonitrilo 0,1 % TFA vandeninis tirpalas, kuris bus naudojamas mobiliam fazei.
2. Mėginiai prafiltruojami švirkštiniu filtru (0,45 μm dydžio membrana).
3. Mėginys po gryninimo praskiedžiamas 3,3 k. su 25 % acetonitrilo tirpalu. Mėginys prieš gryninimą neskiedžiamas.
4. Nustatomas 108,36 cm/val linijinis greitis. Chromatografo detektorius matuoja sugertį 280 nm bangos ilgyje.
5. Atliekamos standartinių baltymų (BSA – 67 kDa, ovalbuminas – 43 kDa, chimotripsinogenas A – 25 kDa, ribonukleazė A – 13,7 kDa, koncentracija – 0,6 mg/ml) eliucijos chromatografijos (žr. priedą Nr. 8). Sudaroma eliucijos laiko ir molekulinės masės dešimtainio logaritmo kalibracinė kreivė (žr. 2.3. pav.).



2.4. Pav. Eliucijos laiko priklausomybė nuo molekulinės masės dešimtainio logaritmo.

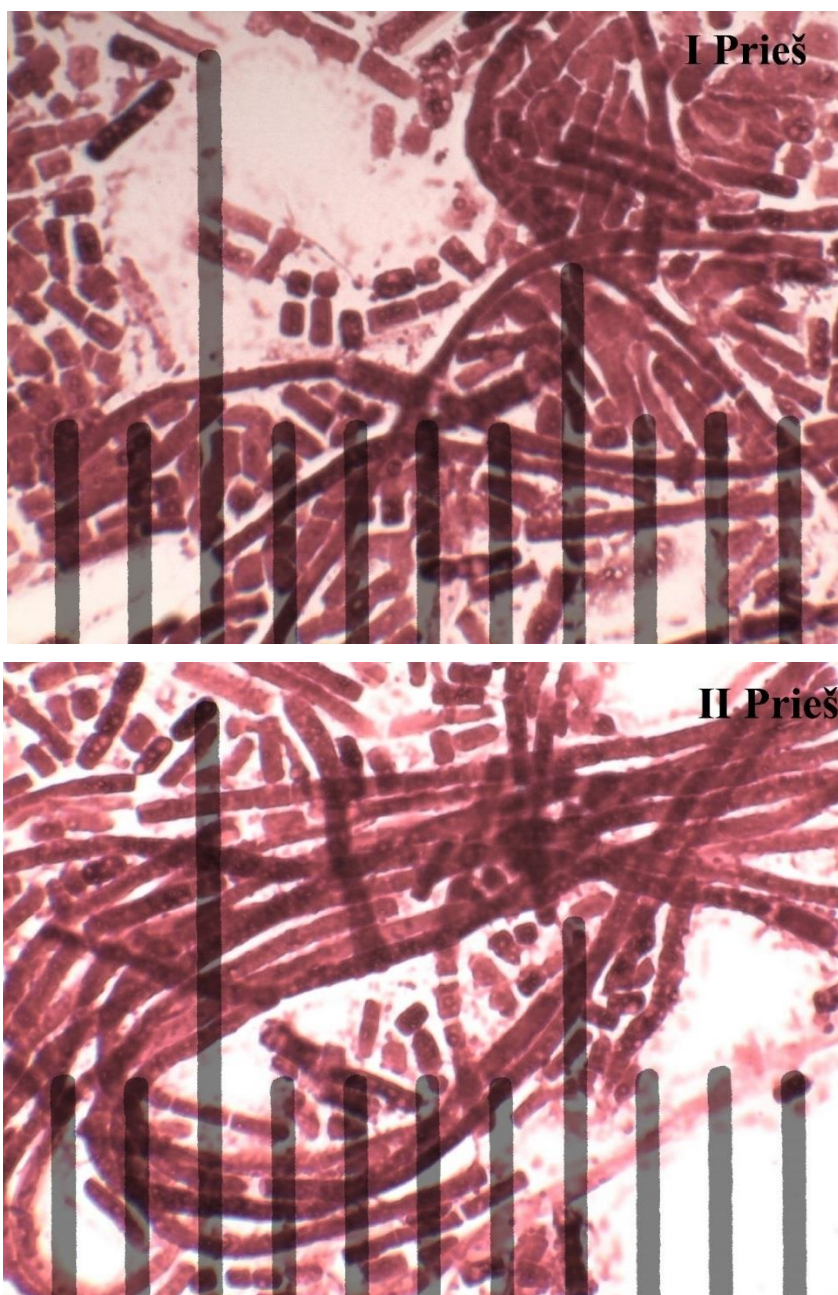
6. Įleidžiama 5 μ l mėginio į koloną.
7. Naudojant sudarytą kalibracinę kreivę, pagal eliucijos laiką apskaičiuojamas tikslinio baltymo molekulinis dydis.

3. PROJEKTAVIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Biomasės ardymas

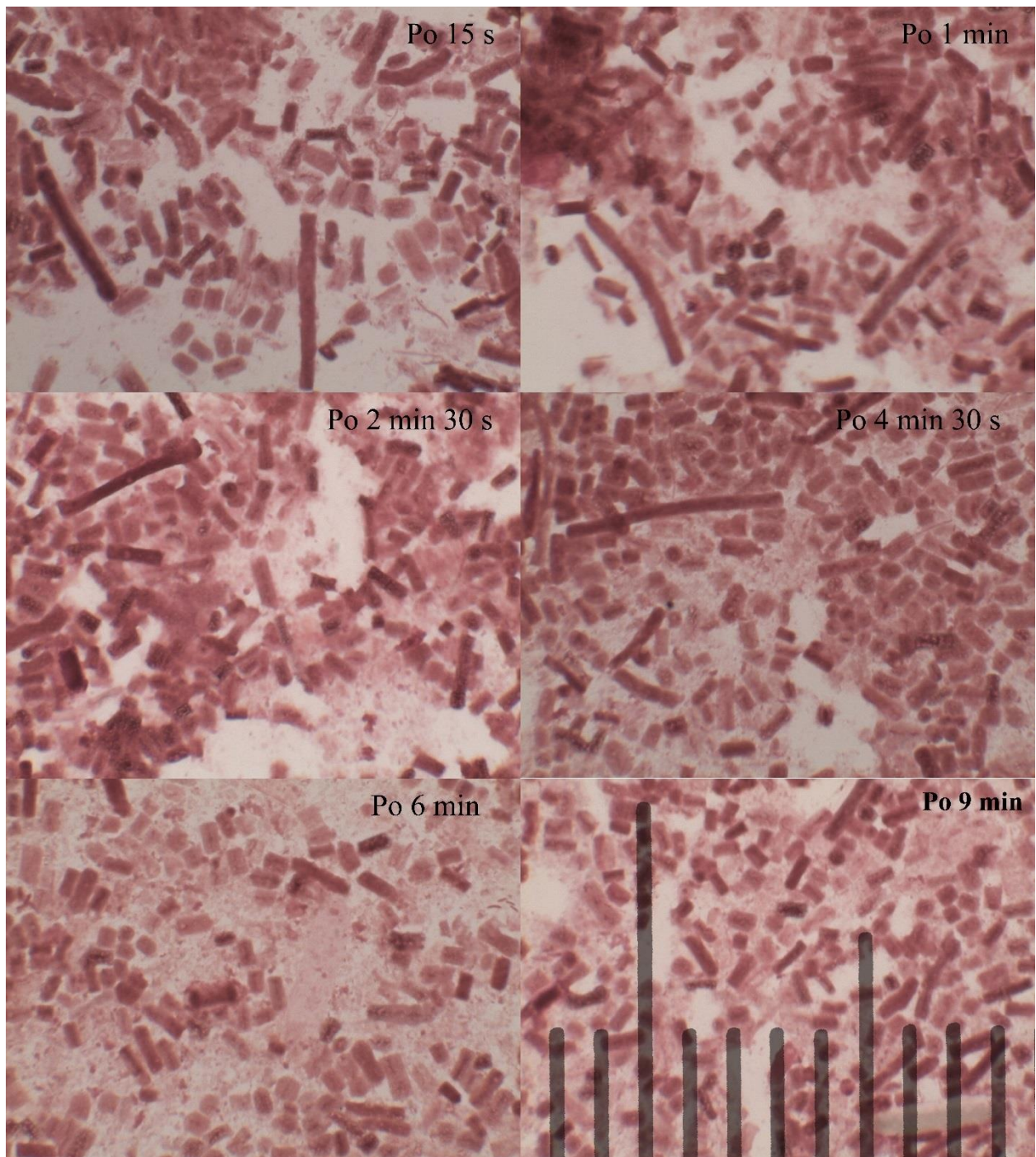
Eksperimento tikslas patikrinti homogenizatoriaus – „statoriaus – rotoriaus“ tinkamumą ardančiam melsvabakterijų kultūrai – *Aphanizomenon flos – aquae*. Biomasė buvo ardoma metodinėje dalyje aptartais greičiais (12000 ir 24000 aps/min) ir trukmėmis.

Neardytos kultūros nuotraukos pateikiamos paveiksle (žr. 3.1. pav.). Iš paveikslo matomos aiškios kultūros trichomos (ląstelių susijungimas suformuojant plauko formos koloniją), iš kurių galima spręsti, kad biomasėje yra sveikų ląstelių. Biomasės buvo surinktos skirtingu laiku.



3.1. Pav. Pirmoji neardyta biomasė – viršuje, antroji – apačioje. Sugraduota po 1 μm .

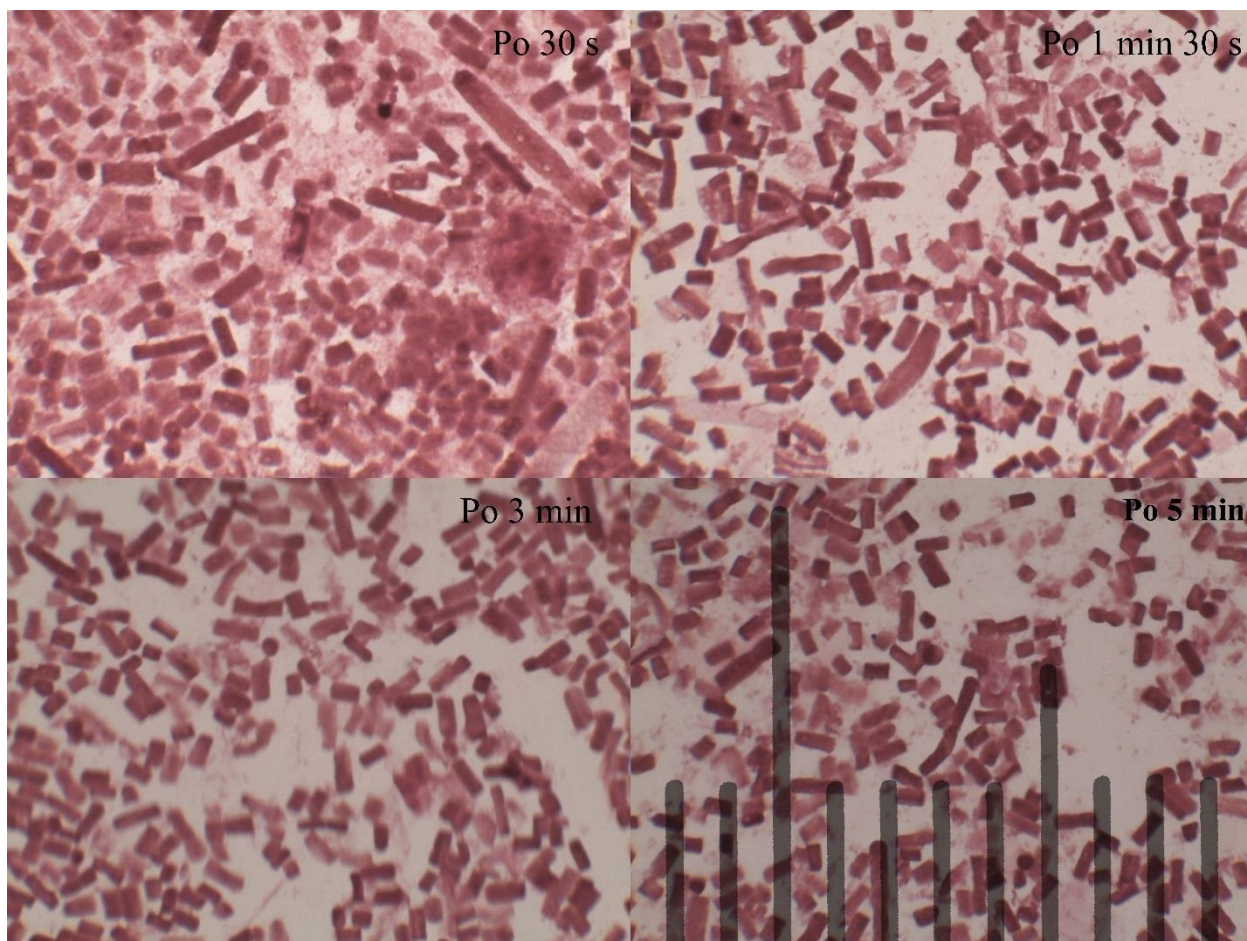
I – ji biomasė buvo ardyta 12000 aps/min greičiu. Ardymo rezultatai pateikiami paveiksle (žr. 3.2. pav.). Po pirmųjų 15 s matosi aiškus trichomų sumažėjimas, toliau didinant ardymo trukmę matomas tolimesnis struktūros irimas. Po 6 min ardymo įžiūrimas aiškus individualių ląstelių sumažėjimas. Pailginus ardymo trukmę iki 9 min., individualių ląstelių kiekis nebemažėja.



3.2. Pav. Pirmosios biomasės ardymo rezultatai. Sugraduota po 1 μm .

II – ji biomasė buvo ardyta 24000 aps/min greičiu. Ardymo rezultatai pateikiami paveiksle (žr. 3.3. pav.). Po 30 s. matomas trichomų suirimas, tačiau aiškiai matomi ir kolonijų likučiai.

Tęsimas ardymas, sveikų trichomų nebematoma, ląstelių skaičius nuotraukoje aiškiai sumažėjo. Toliau tęsiant ardymą, sveikų ląstelių kiekis laipsniškai mažėja.



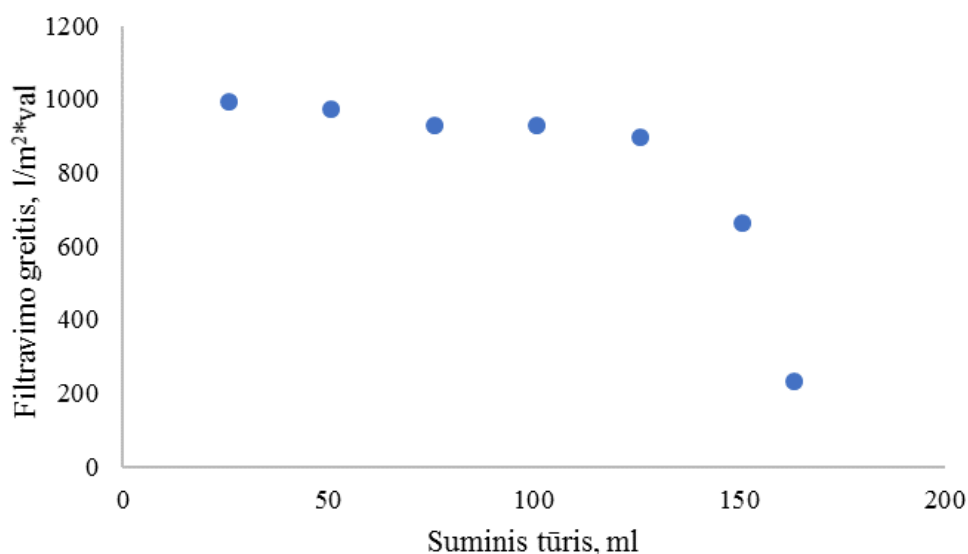
3.3. Pav. Antrosios biomasės ardymo rezultatai. Sugraduota po 1 μm .

Po ardymo, biomasės centrifuguojamos. Gautas supernatantas išsodinamas sausu amonio sulfatu. Į pirmosios biomasės supernatantą įberiama 450 g sauso amonio sulfato, į antrosios – 222,38 g. Išsėdę baltymai centrifuguojami, nuosėdos suspenduojamos sočiu amonio sulfatu. Iš pirmosios biomasės gaunama apie 1 l tikslinio baltymo suspensijos, iš antrosios – 0,5 l.

3. 2. Normalusis filtravimas

Procesas buvo naudojamas mėginio skaidrinimui (pašalinamos likusios ląstelių nuolaužos, lipidai likę po centrifugavimo). Filtravimas buvo atliekamas chromatografinėje kolonoje, kad būtų sumažintas mėginio putojimas. Filtravimo plotas yra 5,3 cm^2 ($5,3 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$). Filtravimas buvo atliekamas peristaltiniu siurbliu palaikant pastovų slėgį iki 2 atm. Proceso pradžioje filtravimo greitis yra 1000 $\text{l/m}^2 \cdot \text{val}$. Filtravimo greičio priklausomybė nuo filtrato suminio tūrio pateikta grafike (žr. 3.4. pav.). Iš grafiko – matyti, kad filtravimo greitis laipsniškai mažėja. Prafiltravus

150 ml mėginio filtravimo greitis pradeda smarkiai mažėti. Surinkus 162,5 ml, filtravimo greitis beveik sustoja ($241,9 \text{ l/m}^2 \cdot \text{val}$). Filtravimo pagalbinė medžiaga – ceolitas 545 yra pakeičiamas 5 kartus, kol bus prafiltruotas 1 l paruošto mėginio, kiekvieną kartą buvo prafiltruojama nuo 162,5 iki 220 ml mėginio. Vienam kartui buvo sunaudojama 5,3 ml ceolito.



3.4. Pav. Filtravimo greičio priklausomybė nuo filtrato suminio tūrio.

3.3. Dializė

Naudojama tikslinio baltymo suspensija gauta iš biomasės ardymo eksperimento. Iš 100 ml suspensijos atskiriami išsėdę baltymai ir ištirpinami 100 ml buferinio tirpalo, kurio savitasis elektrinis laidis $1,1 \text{ mS/cm}$. Pagamintas tikslinio baltymo tirpalas pasižymi $134,4 \text{ mS/cm}$ savituoju elektriniu laidžiu, tokiam tirpale yra daug mažamolekulinių jonų, kurie apsunkina tolimesnį chromatografinį gryninimą. Po pirmosios paros dializavimo, rezervuare esančio tirpalo savitasis elektrinis laidis $\approx 5,9 \text{ mS/cm}$ (šis dydis vis dar per aukštas tolimesniems darbams). Po antrosios paros, rezervuare esančio tirpalo savitasis elektrinis laidis $\approx 1,3 \text{ mS/cm}$, šio tirpalo laidis yra artimas buferinio tirpalo laidžiui prieš dializę. Dializės žarna prakerpama, pamatuojamas dializuoto baltyminio tirpalo savitasis elektrinis laidis $\approx 1 \text{ mS/cm}$.

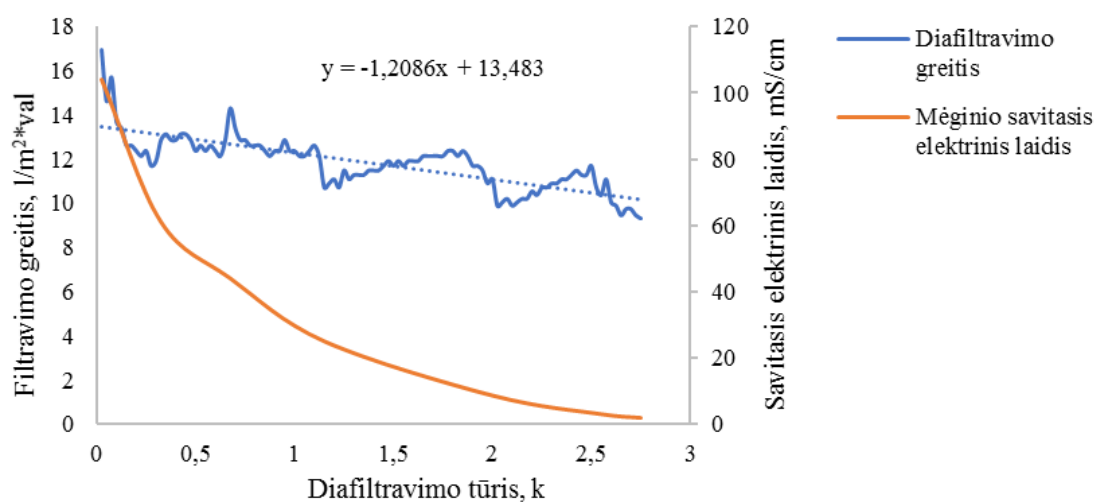
Paruošti 1 mS/cm savitojo elektrinio laidžio 100 ml baltyminio tirpalo, reikia atlikti dializę 2 kartus esant VS – 50.

3.4. Diafiltravimas

Diafiltravimas yra naudojamas, kaip alternatyva dializei. Proceso metu mėginys yra koncentruojamas pašalinant terpę, pasižyminčia aukšta mažamolekulinių jonų koncentracija, ir

praskiedžiamas tirpalu su mažesniu savituoju elektriniu laidžiu. Proceso pradžioje buvo išmatuojamas diafiltravimo buferinio tirpalo savitasis elektrinis laidis – 1,1 mS/cm, o mėginio – 104 mS/cm. Proceso pradžioje su vandeniu išmatavus recirkuliacijos greitį gaunama vertė yra 1 l/min. Sudarius 1,4 bar slėgį, pradedamas diafiltravimas. Proceso eiga atvaizduota grafiku (žr. 3.5. pav.). Proceso pradžioje filtravimo greitis yra 16,9 l/m²*val, po kelių minučių greitis sumažėja iki 11,9. Bendras filtravimo greitis mažėja pagal krypties linijos funkciją $y = -1,2086x + 13,483$. Naudojant lygtį apskaičiuojamas vidutinis filtravimo greitis – 11,82 l/m²*val.

Mėginys buvo skiedžiamas prie DV verčių: 0,325 – 61 mS/cm, 0,675 – 44 mS/cm, 1,15 – 25 mS/cm, 2 – 8,6 mS/cm, 2,55 – 3 mS/cm, 2,75 – 1,86 mS/cm. Kad mėginys pasiektų buferiniam tirpalui artimą savitąjį elektrinį laidį, mėginio terpę reikia pakeisti buferiniu tirpalu – 2,75 k. 1 l mėginio paruošimui buvo sunaudota 2,75 l buferinio tirpalo.

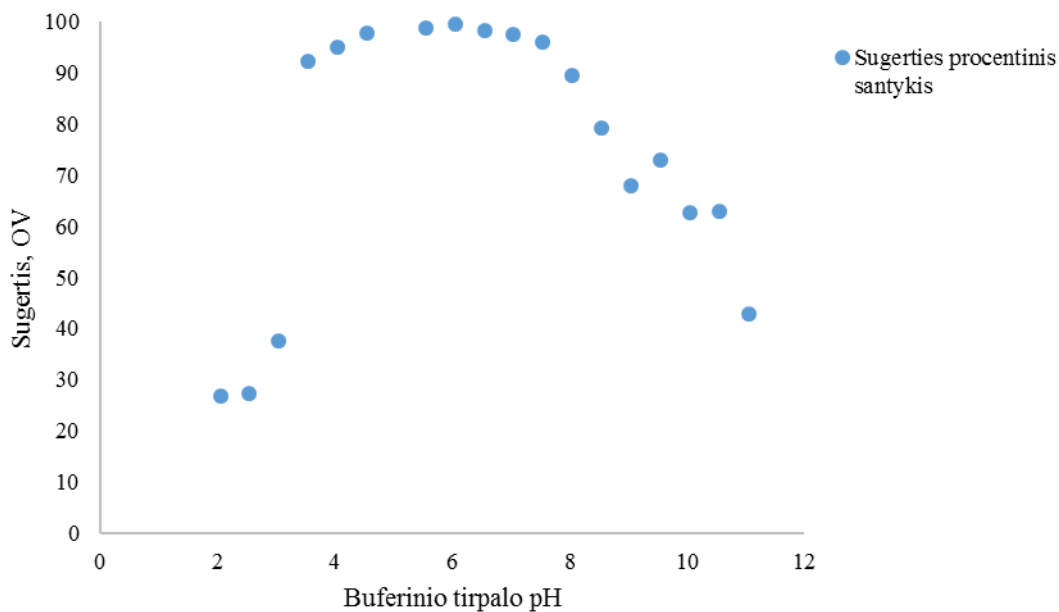


Pav. 3.5. Filtravimo greičio ir savitojo elektrinio laidžio priklausomybė nuo DV (Santykis tarp suminio filtrato tūrio ir pradinio mėginio tūrio).

3. 5. Fikocianino C stabilumo priklausomybė nuo pH

Atliekant eksperimentą kambario temperatūroje, supilsčius tiriamąjį baltymą į skirtingo pH tirpalus, rezultatai pateikiami grafiko forma (žr. 3.6. pav.). Iš grafiko – matyti, kad fikocianinui C būdinga spalva aiškiai pranyksta nuo 2 iki 3 pH (šiam intervale spalva pranyko vos įlašinus baltymą), sugerties santykis yra apie 27 %. Nuo 3,5 iki 7,5 pH fikocianinas C išsilaiko daugiau mažiau nepakitęs, sugerties santykis nuo 90 iki 100 %. Keliant tirpalo pH per 7,5 tikslinio baltymo sugertis pradeda tiesiškai mažėti. Kai tirpalo pH 11, procentinė sugertis yra apie 43 %.

Tikslinis baltymas yra stabilus pH intervale nuo 3,5 iki 7,5.

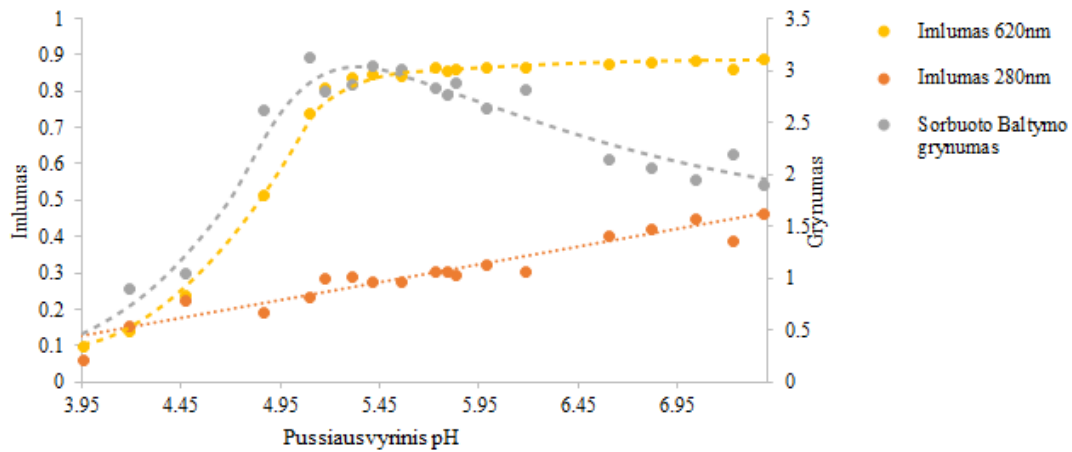


3.6. Pav. Fikocianino C stabilumo priklausomybė nuo tirpalo pH. Procentinis santykis apskaičiuojamas naudojant aukščiausią sugertį 620 nm ilgio bangoje.

3. 6. Jonito fikocianino C imlumo priklausomybė nuo pH statinėmis sąlygomis

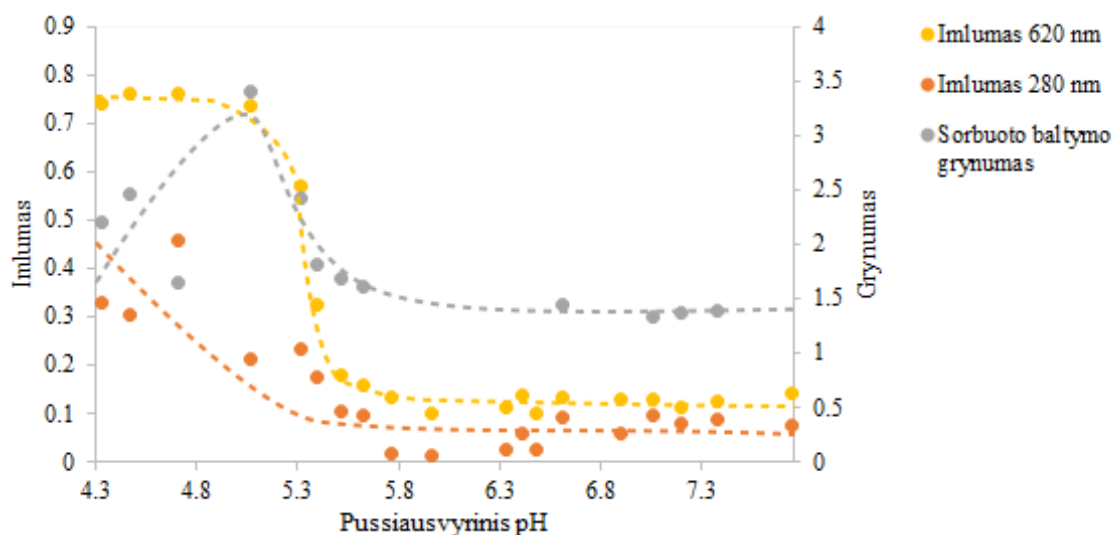
Tyrime buvo nagrinėjamas dviejų sorbentų (anijonų mainų – Q – Sepharose XL, ir katijonų mainų – SP – Sepharose XL), sorbento imlumas pagal tikslinį baltymą ir grynumas, esant skirtingoms pH vertėms.

Sorbcijos rezultatai su sorbentu Q – Sepharose XL pateikiami paveiksle (žr. 3.7. pav.). Iš grafiko – matyti, kad fikocianinas C sorbuojasi pH vertėse nuo 5,2, o žemiau šios vertės tikslinis baltymas nesorbuoja arba labai mažai sorbuojasi. Vertinant sorbuoto baltymo grynumą (A_{620nm}/A_{280nm}) – matyti, kad ties 5 pH verte sorbuoto baltymo grynumas yra didžiausias (3,3), mažinant pH vertę grynumas intensyviai sumažėja (sumažinus pH nuo 5 iki 4,5, grynumas sumažėjo nuo 3,3 iki 1,06). Keliant pH grynumas mažėja, bet ne taip intensyviai (pakėlus pH nuo 5 iki 5,5, grynumas sumažėjo nuo 3,3 iki 3,03). Bendras baltymų imlumas tiesiškai mažėja visame tiriamame diapazone, aukščiausia vertė yra esant pH 7,4, mažiausia – 3,95.



3.7. Pav. Fikocianino C imlumo (grafike „Imlumas 620nm“) ir grynumo (grafike „Sorbuoto baltymo grynumas“), ir bendro baltymų imlumo (grafike „Imlumas 280nm“) priklausomybė nuo tirpalo pH. Naudojamas sorbentas Q – Sepharose XL.

Rezultatai su sorbentu SP – Sepharose XL pateikiami paveiksle (žr. 3.8. pav.). Iš grafiko – matyti, kad esant pH vertei aukštesnei nei 5, fikocianinas C nesisorbuoja arba mažai sorbuojasi. Žiūrint į sorbuoto baltymo grynumą (A_{620nm}/A_{280nm}) – matyti, kad grynumas yra aukščiausias kai tirpalo pH – 5 (grynumas apie 3,5), didėjant pH virš šio taško, grynumas staigiai sumažėja (pakėlus pH nuo 5 iki 5,5, grynumas sumažėjo nuo 3,5 iki 1,5) ir išlieka apie 1,5 (aukštesnėse pH vertėse). Visų baltymų sorbcija pasiekia didžiausią vertę esant pH 4,7 (imlumas – 0,46), toliau didinant pH imlumas mažėja kol pasiekia vertę artimą nuliui.



3.8. Pav. Fikocianino C imlumo (grafike „Imlumas 620 nm“) ir grynumo (grafike „Sorbuoto baltymo grynumas“), ir bendro baltymų imlumo (grafike „Imlumas 280 nm“) priklausomybė nuo tirpalo pH. Naudojamas sorbentas SP – Sepharose XL.

3.7. Jonų mainų chromatografija

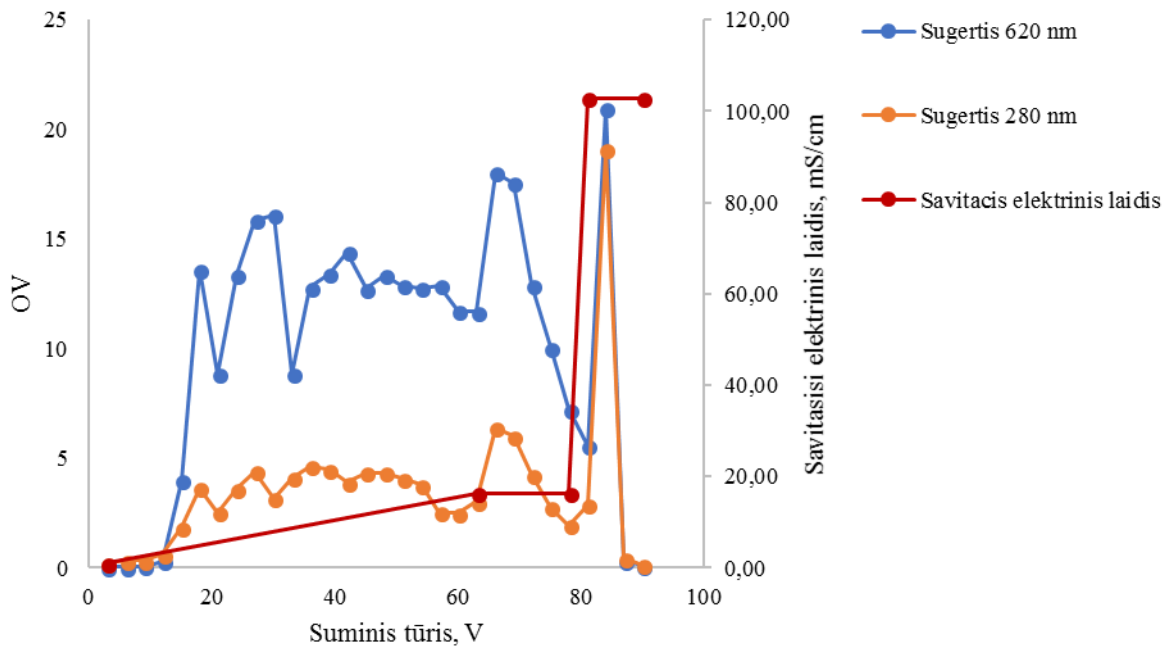
Tyrimė buvo nagrinėjamas Q – Sepharose XL ir SP – Sepharose XL tinkamumas chromatografiniam gryninimui. Iš ankščiau gautų rezultatų 3.6. ir 3.5 skyriuose, pasirenkami chromatografijoje naudojamų buferinių tirpalų pH – 6, 6,5 ir 7.

3.7.1. Anijonų mainų chromatografija

Naudojantis ankščiau aptartais rezultatais (žr. skyrius 3.5. ir 3.6.), anijonų mainų chromatografijai su sorbentu Q – Sepharose XL, pasirenkamos lygsvarinimo ir sorbcijos pH vertės. Chromatografija, desorbuojant druskos gradientu, buvo atlikta su dviem pH – 6 ir 7. Atliekant gryninimą esant 6 pH buvo naudojama 0,79 cm² skerspjūvio ploto kolona, kurioje buvo pakrauta 3,2 cm sorbento ($V_k - 2,51$ ml). Lygsvarinimas ($5 V_k$) ir atplovimas ($5 V_k$) buvo atliekami su 10 mM fosfatinu buferiniu tirpalu pH 6 (savitasis elektrinis laidis – 0,98 mS/cm). Buvo leidžiama 67,5 ml mėginio, kurio pH – 6 (1,04 mS/cm), sugertis 620 nm – 23,6 OV, 280 nm – 37,5 OV, grynumas (A_{620nm}/A_{280nm}) prieš stadiją – 0,629. Lygsvarinimas, atplovimas ir sorbcija buvo atliekami – 50 cm/val linijiniu greičiu. Desorbcija buvo atliekama 10 mM fosfatinu buferiniu tirpalu pH 6 su 0,15 M NaCl (16,33 mS/cm) ir 1 M NaCl (102,85 mS/cm). Tikslinio baltymo eliucija iš kolonos buvo atliekama 20 V_k gradientu, 5 cm/val linijiniu greičiu keliant NaCl koncentracija nuo 0 iki 0,15 M, koncentracija buvo išlaikoma 5 V_k , poto pakeliama iki 1 M ir išlaikoma 5 V_k . Stadijos chromatograma pateikiama prieduose (žr. priedą Nr. 1). Apjungus desorbcijos frakcijas ir išmatavus sugertis 620 nm yra 10,08 OV, 280 nm – 3,54 OV, buvo nustatyta, kad desorbuoto tikslinio baltymo grynumas – 2,84. Po stadijos grynumas padidėjo 4,5 karto. Chromatografijos masės balansas aprašomas lentelėje (žr. lentelė 3.1.). Iš masės balanso – matyti, kad apjungus visas frakcijas buvo desorbuota 80,9 % sorbuoto tikslinio baltymo ir 23 % visų baltymų. Iš grafiko (žr. 3.9. pav.) – matyti, kad desorbuojant 20 V_k gradientu gauname, kad visos frakcijos pasižymi sugertimi 620 nm, todėl didesnio mastelio chromatografijai, pasirenkama atlikti vieno laipto desorbciją.

Lentelė. 3.1. Chromatografijos su Q – Sepharose XL sorbentu masės balansas, kai sorbcijos pH – 6.

| | Sugertis 620 nm | | Sugertis 280 nm | | Grynumas, A_{620nm}/A_{280nm} |
|---------------------|-----------------|------|-----------------|------|------------------------------------|
| | TOD | % | TOD | % | |
| Sorbavosi | 1121,3 | 59,4 | 1358,3 | 45,3 | |
| Desorbuota, iš viso | 907,5 | 80,9 | 319,2 | 23,5 | 2,84 |



3.9. Pav. Desorbcijos chromatograma kai sorbcijos pH 6

Eksperimentas buvo atliekamas, kai sorbcijos mobilios fazės pH 7, 2,01 cm² skerspjūvio ploto kolonoje, kuri pakrauta 2,5 cm Q – Sepharose XL sorbentu (V_k – 5,02 ml). Kolonos lygsvarinimui buvo naudojamas 5 V_k 10 mM fosfatinis buferinis tirpalas pH 7 (savitasisi elektrinis laidis – 0,93 mS/cm). Buvo leidžiama 67,5 ml mėginio pH – 7 (0,91 mS/cm), kurio sugertis 620 nm – 19,6 OV, 280 nm – 22,1 OV, grynumas (A_{620nm}/A_{280nm}) – 0,89. Nesisorbavę baltymai buvo išplaunami 5 V_k lygsvarinimo buferiniu tirpalu. Desorbcija buvo atliekama (10 V_k) gradientu didinant mažamolekulinių jonų koncentraciją nuo 0 iki 0,5 M su 10 mM fosfatinio buferiniu tirpalu pH 7 (47,9 mS/cm). 0,5 M NaCl koncentracija buvo išlaikoma 5 V_k . Lygsvarinimas, sorbcija ir atplovimas buvo atliekami 81 cm/val linijiniu greičiu. Desorbcija buvo atliekama 8,1 cm/val linijiniu greičiu. Stadijos chromatograma pateikiama prieduose (žr. priedą Nr. 2). Iš chromatogramos – matyti, kad baltymai yra desorbuojami intervale nuo 0 iki 0,3 M NaCl, didinant šią vertę iki 0,5 M desorbuojamų baltymų kiekis mažėja. Apjungus desorbcijos frakcijas ir išmatavus sugertį 620 nm – 8,31 OV, 280nm – 3,22 OV, buvo nustatyta kad desorbuoto tikslinio baltymo grynumas – 2,58. Po stadijos grynumas padidėjo 2,909 k. Chromatografijos masės balansas aprašomas lentelėje (žr. lentelė. 3.2.). Iš masės balanso – matyti, kad apjungus visas frakcijas buvo desorbuota 93,3 % sorbuoto tikslinio baltymo ir 56,2 % visų baltymų.

Lentelė. 3.2. Chromatografijos su Q – Sepharose XL sorbentu masės balansas, kai sorbcijos pH – 7.

| | Sugertis 620 nm | | Sugertis 280 nm | | Grynumas, A_{620nm}/A_{280nm} |
|------------------|-----------------|------|-----------------|------|------------------------------------|
| | TOD | % | TOD | % | |
| Sorbavosi | 956,6 | 72,3 | 615,1 | 41,2 | |
| Desorbuota, viso | 892,9 | 93,3 | 345,8 | 56,2 | 2,58 |

Bandytas buvo atliekamas patikrinti desorbcijos efektyvumą mažinant eliuacijos pH. Chromatografija buvo atliekama 2,01 cm² skerspjūvio ploto kolonoje, kurioje buvo pakrauta 2,3 cm (V_k – 4,62 ml) Q – Sepharose XL sorbentu. Lygsvarinime ir atplovime buvo naudojamas 10 mM fosfatinis buferinis tirpalas pH 6,5 (savitasis elektrinis laidis – 0,89 mS/cm). Lygsvarinimui ir atplovimui buvo naudojama po 5 V_k buferinio tirpalo. Buvo sorbuojama 40,5 ml mėginio, kurio pH 6,5 (0,83 mS/cm), sugertis 620 nm – 9,43, 280 nm – 13,01, grynumas (A_{620nm}/A_{280nm}) – 0,72. Desorbcijai buvo naudojama 10 V_k 10 mM acetatinio buferinio tirpalo pH 4 (0,25 mS/cm). Eliuavus tikslinį baltymą, kolona praplaunama 0,1 M NaOH 81 cm/val greičiu. Lygsvarinimas, atplovimas ir sorbcija buvo atliekami 81 cm/val linijiniu greičiu. Desorbcija buvo atliekama 8,1 cm/val linijiniu greičiu. Chromatograma pateikiama prieduose (žr. priedą Nr. 3). Masės balansas pateikiamas lentelėje (žr. lentelė. 3.3.). Iš rezultatų – matyti, kad desorbavus, mažinant pH, gauname tikslinio baltymo grynumą – 2,83. Tikslinio baltymo grynumas po stadijos padidėjo 3,93 k. Eliuojama 36,7 % sorbuoto fikocianino C ir 19,3 % bendrų baltymų. Atplovus šarmu, iš viso desorbuota 40,9 % fikocianino C ir 23,3 % bendrų baltymų.

Lentelė. 3.3. Chromatografijos su Q – Sepharose XL sorbentu masės balansas, kai desorbcijos pH - 4.

| | Sugertis 620 nm | | Sugertis 280 nm | | Grynumas, A_{620nm}/A_{280nm} |
|------------------------|-----------------|------|-----------------|------|------------------------------------|
| | TOD | % | TOD | % | |
| Sorbavosi | 325,12 | 85,1 | 218,45 | 41,5 | |
| Desorbcija | 119,16 | 36,7 | 42,08 | 19,3 | 2,83 |
| Praplovimas 0,1 M NaOH | 13,67 | 4,2 | 8,73 | 4,00 | 1,57 |
| Desorbuota, viso | 132,83 | 40,9 | 50,81 | 23,3 | 2,61 |

3. 7. 2. Katijonų mainų chromatografija

Naudojantis aptartais rezultatais (žr. skyrius 3.5. ir 3.6.) pasirenkamos lygsvarinimo ir sorbcijos pH vertės, katijonų mainų chromatografijai su sorbentu SP – Sepharose XL. Chromatografija buvo atliekama 0,79 cm² skerspjūvio kolonoje, kurioje pakrauta 2 cm sorbento (V_k – 1,57 ml). Lygsvarinimas ir sorbcija buvo atliekama 46 cm/val, desorbcija – 4,60 cm/val linijiniais greičiais. Lygsvarinimas buvo atliekamas 5 V_k 10 mM acetatinio buferiniu tirpalu pH 5 (savitasis elektrinis laidis – 0,79 mS/cm). Sorbcija buvo atliekama įleidžiant į koloną 35 ml

mėginio, kurio pH – 5 (savitasis elektrinis laidis – 0,81 mS/cm), sugertis 620 nm ilgio bangoje – 6,53 OV, 280 nm – 8,95 OV, grynumas – 0,73. Desorbcija buvo atliekama laiptais didinant mažamolekulinių jonų koncentraciją, arba ir keliant eliuacijos pH. Desorbcijos tirpalai: I) 10 V_k 10 mM acetatiniu buferiniu pH 5 tirpalu su 0,5 M NaCl (savitasis elektrinis laidis – 50,9 mS/cm), II) 10 V_k 10 mM fosfatiniu buferiniu tirpalu pH 7,5 (savitasis elektrinis laidis – 1,39 mS/cm), III) 10 V_k 10 mM fosfatiniu buferiniu tirpalu 7,5 pH su 0,5 M NaCl (savitasis elektrinis laidis – 53,3 mS/cm), IV) 5 V_k 0,1 M NaOH, V) 5 V_k 0,5 NaOH. Chromatograma pateikiama prieduose (žr. priedą Nr. 4). Masės balansas pateikiamas lentelėje (žr. lentelė. 3.4.). Iš rezultatų – matyti, kad su pasirinktais parametrais (pH, sorbento aukščiu, linijiniu greičiu) sorbuojama 80,5 % tikslinio baltymo. Iš desorbcijos rezultatų buvo nustatyta, kad daugiausiai sorbuoto tikslinio baltymo (34,8 %) eliuuojama pirmuoju desorbcijos tirpalu (gaunamas grynumas – 3,14). Apjungus I-III desorbcijos rezultatus, eliuuojama 45,9 % sorbuoto fikocianino C, kurio grynumas – 2,62. Lyginant su mėginu prieš chromatografiją, tarpinio produkto grynumas padidėjo 3,6 k. Atplaunant koloną su natrio šarmu, likęs fikocianinas C eliuojasi, bet dėl aukšto pH greit denatūruoja, specifinė spalva (mėlyna) beveik pranyksta.

Lentelė. 3.4. Chromatografijos su SP – Sepharose XL sorbentu masės balansas.

| | Sugertis 620 nm | | Sugertis 280 nm | | Grynumas A _{620nm} /A _{280nm} |
|-----------------------|-----------------|------|-----------------|-------|--|
| | TOD | % | TOD | % | |
| Sorbavosi (frakcijos) | 184,00 | 80,5 | 59,2 | 18,88 | |
| Desorbcija I (1-3) | 64,02 | 34,8 | 20,40 | 34,49 | 3,14 |
| Desorbcija II(4-6) | 11,00 | 6 | 5,7 | 9,6 | 1,95 |
| Desorbcija III (7- 9) | 9,4 | 5,1 | 3,37 | 5,7 | 2,78 |
| Atplovimas IV (12,13) | 3,5 | 1,9 | 18,1 | 30,5 | 0,19 |
| Atplovimas V (14,15) | 0 | 0,00 | 1,5 | 2,5 | 0,00 |
| Desorbuota, viso | 87,9 | 47,8 | 49 | 82,8 | 1,79 |

Nustačius, kad tikslinis baltymas nesidesorbuoja su mažamolekuliniais priešjoniais, o atplaunant šarmu tikslinis baltymas yra inaktyvuojamas. Naudojantis aptartais rezultatais (žr. skyriuje 3.5.), buvo bandoma desorbuoti keliant eliuacijos pH. Tyrime buvo naudojama 2,01 cm² skerspjūvio ploto kolona, pakrauta 2,5 cm SP – Sepharose XL sorbentu (V_k – 5,02 ml). Sorbentas buvo lygsvarinamas 5 V_k 10 mM acetatiniu buferiniu tirpalu pH 5 (savitasis elektrinis laidis – 0,51 mS/cm). Į koloną buvo įleidžiama 40,5 ml mėginio, kurio pH 5 (savitasis elektrinis laidis – 0,53 mS/cm), sugertis 620 nm ilgio bangoje – 9,43 OV, 280 nm – 13,01 OV, grynumas – 0,725. Desorbcija buvo atliekama eliuuojant 10 V_k su 10 mM TRIS buferiniu tirpalu pH 9 (0,23 mS/cm). Po desorbcijos, kolona buvo atplaunama 0,1 M NaOH. Lygsvarinimas ir sorbcija buvo atliekami 81 cm/ val, desorbcija – 8,1 cm/val, linijiniais greičiais. Chromatograma

pateikiama prieduose (žr. priedą Nr.5). Masės balansas pateikiamas lentelėje (žr. lentelė. 3.5.). Lyginant su ankstesne katijonų mainų chromatografija (80,5 % desorbuota tikslinio baltymo), padidinus linijinį greitį, sorbavosi žymiai mažiau tikslinio baltymo (36,54 %). Padidinus pH, desorbuojamas panašus kiekis fikocianino C (37,02 % lyginama su 34,8 %), desorbuoto tarpinio produkto grynumas – 0,82 (po stadijos grynumas padidėjo tik 1,12 k.).

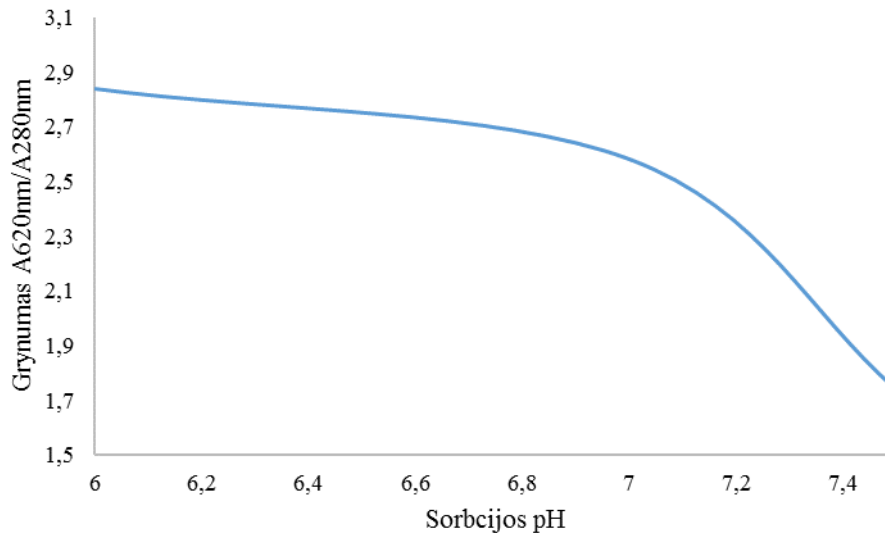
Lentelė. 3.5. Chromatografijos su SP – Sepharose XL sorbentu masės balansas, kai desorbcijos pH - 9.

| | Sugertis 620 nm | | Sugertis 280 nm | | Grynumas A_{620nm}/A_{280nm} |
|-----------------------|-----------------|-------|-----------------|------|-----------------------------------|
| | TOD | % | TOD | % | |
| Sorbavosi | 139,57 | 36,5 | 115,5 | 21,9 | |
| Desorbcija I | 51,67 | 37,02 | 63,3 | 54,9 | 0,82 |
| Atplovimas 0,1 M NaOH | 17,29 | 12,4 | 48,8 | 42,3 | 0,35 |
| Desorbuota, iš viso | 68,96 | 49,4 | 112,1 | 97,1 | 0,61 |

3. 7. 3. Sorbcijos sąlygų pasirinkimas

Lyginant dviejų sorbentų rezultatus – matyti, kad desorbcija, didinant mažamolekulinių jonų koncentraciją, yra eliuuojama daugiau sorbuoto baltymo nuo Q – Sepharose XL, nei SP – Sepharose XL (su Q – Sepharose XL vidutiniškai desorbuojama 87,1 %, su SP – Sepharose – 45,87 %). Iš gautų rezultatų, kai desorbcija yra atliekama keičiant eliuacijos pH – matyti, kad abiem sorbentais desorbuojama mažiau tikslinio baltymo (su Q – Sepharose XL – 36,7 %, SP – Sepharose XL – 37,02 %) nei atliekant desorbciją didinant mažamolekulinių jonų koncentraciją. Iš rezultatų nustatyta, kad tikslinio baltymo išėiga yra didesnė eliuuojant mažamolekuliniais jonais nuo anijonų mainų sorbento – Q – Sepharose XL.

Lyginant tikslinio baltymo grynumus, sorbavus ant Q – Sepharose XL skirtingais pH – matyti, kad kai sorbcijos pH 6 – gauname fikocianino C truputį aukštesnį grynumą (A_{620nm}/A_{280nm} – 2,84), nei kai pH – 7 (A_{620nm}/A_{280nm} – 2,58). Bakalauro baigiamojo projekto metu atlikus chromatografinio gryninimo stadiją, kai sorbcijos pH – 7,5 (naudotas sorbentas Q – Sepharose XL), eliuoto tikslinio baltymo grynumas – 1,74 – [26]. Iš gautų grynumo verčių sudaromas grynumo priklausomybės nuo pH grafikas (žr. 3.10. pav.). Iš grafiko – matyti, kad sumažinus sorbcijos pH nuo 7,5 iki 7 grynumas padidėja 1,5 k. Žinant, kad keliant pH, sąveika tarp sorbento ir baltymų išauga, todėl sorbcijai optimaliausias pH – 7 (gaunamas truputį mažesnis grynumas, bet yra sorbuojama daugiau tikslinio baltymo, todėl padidėja išėiga).



3.10. Pav. Desorbuoto fikocianino C grynumo priklausomybė nuo sorbcijos pH.

Su gautais parametrais atliekama didesnio mastelio chromatografija. Gryninimas yra atliekamas 5,31 cm² skerspjūvio ploto kolonoje, kurioje pakrauta 4,6 cm (V_k – 24,41 ml) Q – Sepharose XL. Lygsvarinimas yra atliekamas 5 V_k su 10 mM fosfatiniu buferiniu tirpalu pH 7 (savitasis elektrinis laidis – 1,1 mS/cm). Buvo sorbuojama 590 ml baltyminio tirpalo, kurio pH 7 (1,87 mS/cm), sugertis 620 nm – 27,3 OV, 280 nm – 30,1 OV, grynumas (A_{620nm}/A_{280nm}) – 0,91. Nesisorbavę baltymai buvo išplaunami iš kolonos 5 V_k lygsvarinimo buferiniu tirpalu. Desorbcija buvo atliekama eliuuojant, laiptu įleidžiant į koloną 5 V_k 10 mM fosfatinio buferinio tirpalo pH 7 su 0,3 M NaCl (31 mS/cm). Lygsvarinimas, sorbcija ir atplovimas buvo atliekami 80 cm/val linijiniu greičiu. Desorbcija buvo atliekama 8 cm/val linijiniu greičiu. Kolona buvo atplauna 4 V_k 1 M NaOH 40 cm/val linijiniu greičiu. Gryninimo chromatograma pateikiama prieduose (žr. priedą Nr. 6). Masės balansas pateikiamas lentelėje (žr. lentelė. 3.6.). Iš rezultatų – matyti, kad buvo sorbuojama 52,2 % įleisto tikslinio baltymo ir 24,2 % visų baltymų. Fikocianino C didžiausios koncentracijos buvo eliuuojamos 2 – 5 frakcijose, šių frakcijų tūris – 43 ml. Šiose frakcijose buvo eliuojama 67,3 % sorbuoto tikslinio baltymo ir 50 % visų baltymų. Apjungtų frakcijų grynumas – 2,63, lyginant su mėginiu prieš chromatografiją, grynumas padidėjo 2,9 k. Apjungtų frakcijų savitasis elektrinis laidis yra 31 mS/cm, todėl buvo dializuojamos 5 l 10 mM fosfatiniu buferiniu tirpalu (1,1 mS/cm). Po dializės, savitasis elektrinis laidis sumažėjo iki 1,3 mS/cm. Apjungus visas stadijas (lygsvarinimą, sorbciją, atplovimą, desorbciją, sorbento regeneravimą), proceso trukmė – 5,3 val.

Lentelė. 3.6. Didesnio mastelio chromatografijos masės balansas.

| | Sugertis 620 nm | | Sugertis 280 nm | | Grynumas $A_{620\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ |
|-------------------------------|-----------------|------|-----------------|------|---|
| | TOD | % | TOD | % | |
| Sorbavosi | 8402, | 52,2 | 4292,00 | 24,2 | |
| Desorbciija (2-5 frakcijos) | 5650,2 | 67,3 | 2145,7 | 50 | 2,63 |
| Desorbciija (1,6,7 frakcijos) | 87,4 | 1,04 | 137,9 | 3,2 | 0,63 |
| Desorbuota, viso | 5737,6 | 68,3 | 2283,6 | 53,2 | 2,51 |

3. 8. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford'o metodu

Po didesnio mastelio jonų mainų chromatografijos, buvo atliekamas baltymo koncentracijos nustatymas (mėginuose prieš ir po chromatografijos) Bradford'o metodu. Rezultatai pateikiami lentelėje (žr. lentelė. 3.7.). Mėginys prieš stadiją buvo skiestas 10 k. Mėginys po stadijos buvo skiestas 100 k. Užpylus abudu mėginius Bradford'o reagentu buvo fiksuojama (595 nm bangos ilgyje) šviesos sugertis. Mėginio prieš chromatografiją sugertis buvo – 0,686. Po chromatografijos – 0,344. Naudojantis sudaryta kalibracine kreive, gaunama, kad 10 k. skiesto mėginio koncentracija prieš chromatografiją – 0,776 mg/ml, neskiendus – 7,76 mg/ml. Skiesto mėginio koncentracija po chromatografijos – 0,376 mg/ml, neskiesto – 37,6 mg/ml.

Lentelė. 3.7. Bradford'o metodu gautos baltymų tipalų koncentracijos prieš ir po gryninimo.

| | Skiedimas | Sugertis 595 nm ilgio bangoje, OV | Grynumas praskiedus, mg/ml | Grynumas neskiendus, mg/ml |
|-----------------------|-----------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Prieš chromatografiją | 10 | 0.69 | 0.78 | 7.76 |
| Po chromatografijos | 100 | 0.34 | 0.38 | 37.63 |

3. 9. Liofilizavimas

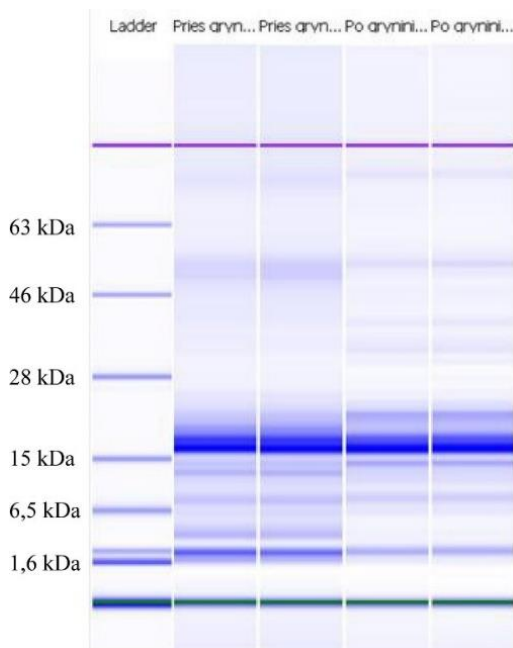
Baltymų tirpalas, gautas po didesnio mastelio jonų mainų chromatografijos, buvo liofilizuojamas. Įpylus 1 ml baltyminio tirpalo, po liofilizavimo, buvo gaunama 44 mg miltelių. Liofilizuotų mėginių atvaizdas pateikiamas paveiksle (žr. 3.12. pav.). Sudaromas pagaminto produkto analizės sertifikatas (žr. priedą Nr. 10).



3.11. Pav. Mėginiai gauti po liofilizacijos.

3. 10. Kapiliarinė elektroforezė

Atlikus kapiliarinę elektroforezę, redukuojančiomis sąlygomis, gaunamas baltymų pasiskirstymas pagal molekulinės dydį. Šie duomenys pateikti densitograma (žr. priedą Nr. 7) ir nudažyto gelio atvaizdu (žr. 3.13. pav.). Iš kreivės – matyti, kad fikocianino C prieš gryninimą α subvieneto molekulinė masė – 16,7 kDa, β – 20,7. Apskaičiavus bendrą kreivės plotą (373,8) ir fikocianino C subvienetų plotus (α – 111,6, β – 5,8), nustatome, kad fikocianinas C prieš gryninimą sudaro 35,6 %. Žiūrint į kreivę po gryninimo – matyti, kad fikocianinas C persidengia su alofikocianinu. Alofikocianino subvienetų molekulinės masės – 14,3 ir 17,7, o fikocianino C – 16,6 ir 21. Literatūroje fikocianino C subvienetų molekulinės masės yra nuo 17 iki 19, o alofikocianino 15 ir 17, tai reiškia kad densitogramoje šios molekulės persidengia – [27]. Apskaičiavus bendrą kreivės plotą (464,8) ir fikocianino C subvienetų plotus (α – 164,9, β – 59,3), nustatome, kad po gryninimo fikocianino C grynumas yra 48,5 %.



3.12. Pav. Mėginių, prieš ir po chromatografinio gryninimo, kapiliarinės elektroforezės rezultatai.

3. 11. Molekulinių sietų chromatografija

Molekulinių sietų chromatogramose (žr. priedą Nr. 9), kuriose buvo matuojama sugertis 280 nm ilgio bangoje. Iš chromatogramų sprendžiame, kad fikocianinas C eliuojasi ties 13,1 ir 12,7 min. Naudojantis kalibracine kreive nustatome, kad fikocianino C subvienetų molekulinės masės – 14 ir 21,4 kDa. Apskaičiuojama, kad fikocianinas C prieš gryninimą sudaro – 49,78 % nuo kreivės bendro ploto. Apskaičiuojama, kad fikocianinas C po gryninimo sudaro – 59,44 % nuo kreivės bendro ploto.

3. 12. Proceso projektavimas

Projektavimo tikslas yra apdoroti teorinį metinį melsvabakterijų derlių iš Lietuvos Kuršių marių ploto. Apskaičiuota, kad per metus, optimaliomis sąlygomis, priauga 7632 t (7632 m³) – [4]. Derlius apdorojamas nuo gegužės iki spalio mėnesių. Proceso eiga: 1) biomasės ardymas, 2) suardytų ląstelių atskyrimas, 3) įsotinimas amonio sulfatu, 4) išsodintų baltymų centrifugavimas, 5) nuosėdų tirpinimas, 6) tirpalo filtravimas, 7) diafiltravimas 8) anijonų mainų chromatografija, 9) diafiltravimas, 10) liofilizavimas.

3.1. skyriuje nustatyta, kad ardymas statoriumi – rotoriumi yra tikėtinais efektyvus ardant *Aphanizomenon flos – aquae* kultūrą. Proceso projektavime pasirenkamas pramoninis statorius – rotorius. Pagal pasirinktą ardymo trukmę, apskaičiuojamas žaliavos padavimo greitis.

Suardyta biomasė yra centrifuguojama. Suardyta biomasė nusėda ties 30000 min. ekvivalentinei trukmei – [26]. Pasirenkama pramoninio dydžio centrifuga. Su pasirinkta centrifuga atliekami tolimesni skaičiavimai. Bakalauro baigiamajam projekte nustatyta, kad po centrifugavimo nusėda 1,58 ml ląstelių nuolaužų iš 10 ml suspensijos, kai biomasėje yra 96,62 % drėgmės – [26]. Padidinus proceso mastelį, apskaičiuojamas nuosėdų kiekis ir supernatanto tūris.

Po centrifugavimo gautas supernatantas įsotinamas iki 50 % sausu amonio sulfatu. Apskaičiuojamas sauso amonio sulfato kiekis, druskos padavimo greitis, supernatanto tūris ištirpinus druską. Gautas tirpalas yra centrifuguojamas. Buvo nustatyta, kad fikocianinas C atskiriamas ties 70000 min ekvivalentinei trukmei [26]. Gaunama apie 1,5 ml baltymų iš 10 ml tirpalo – [26]. Parenkama centrifuga išsėdusių baltymų atskyrimui. Nuosėdos po centrifugavimo tirpinamos buferiniame tirpale santykiu 1:8.

Tirpalas po tirpinimo yra prafiltruojamas. Projektavimui pasirenkamas vakuuminis būgninis filtras. Pagal eksperimente rastą filtravimo greitį ir norimą filtravimo trukmę, apskaičiuojamas filtro plotas.

Mėginio dializė yra pakeičiama diafiltravimu, nes pagal rezultatus (žr. skyriuose 3.3. ir 3.4.) – matyti, kad sunaudojama mažiau buferinio tirpalo, ir procesas yra atliekamas greičiau. Projektavime bus naudojamas tas pats filtravimo greitis kaip ir eksperimente.

Su diafiltruotu baltyminiu tirpalu atliekama anijonų chromatografija (sorbentas – Q – Sepharose XL). Bus rojektuojama pagal atlikto didesnio mastelio chromatografijos rezultatus. Bus naudojamas tas pats kolonos aukštis, linijinis greitis. Procese bus didinamas kolonos skerspjūvio plotas, tūriniai greičiai, mėginio ir buferinių tirpalų sąnaudos. Gauta tarpinio produkto dializė pakeičiama diafiltravimu. Gautas fikocianino C tirpalas yra liofilzuojamas.

Skaičiavimų eiga:

1. Apskaičiuojamas žaliavos materialinis balansas. Kiek žaliavos apdorojama vienu taktu. Koks taktų skaičius reikalingas apdoroti visą metinę biomasę, jei vieno takto trukmė

- 5,3 val. Skaičiavimai pateikiami lentelėje (žr. lentelė. 3.8). Atlikus chromatografijos projektavimą, perskaičiuojamos žaliavos sąnaudos apvalintam kolonos skersmeniui.
2. Pagal žaliavos balansą atliekami chromatografijos skaičiavimai vienam taktui. Skaičiavimai pateikiami lentelėje (žr. lentelė. 3.9).
 3. Apskaičiuojama koku greičiu turi būti tiekama biomasė, kad vienam taktui reikalinga biomasė būtų suardyta per 5,3 val. Ardymas buvo atliekamas didžiausiu statoriaus – rotorius greičiu (tangentinis rotorius greitis – 40 m/s).
 4. Žinant pasirinktos centrifugos santykinę centrifugavimo jėgą, apskaičiuojama centrifugavimo trukmė ir žaliavos padavimo greitis. Žinant šias vertes, apskaičiuojama koku pajėgumu turi dirbti 2 centrifugos, kad apdorotų vienam taktui reikalingą biomasę per 5,3 val.
 5. Žinant pasirinktos centrifugos santykinę centrifugavimo jėgą, apskaičiuojama centrifugavimo trukmė ir amonio sulfato išsodintų baltymų suspensijos padavimo greitis. Žinant šias vertes, apskaičiuojama koku pajėgumu turi dirbti 3 centrifugos, kad apdorotų vienam taktui reikalingą suspensijos tūrį per 5,3 val.
 6. Žinant normalaus filtravimo greitį, apskaičiuojamas filtro plotas, kad būtų prafiltruojamas vieno takto baltyminis tirpalas per 5,3 val. Su rastu plotu, apskaičiuojamas baltyminio tirpalo padavimo greitis.
 7. Žinant DV ir diafiltravimo greitį, apskaičiuojamas membranos plotas, kad būtų diafiltruojamas baltyminis tirpalas per 5,3 val. Su rastu plotu apskaičiuojamas baltyminio tirpalo cirkuliacinis greitis. Apskaičiuojami produkto diafiltravimo parametrai.
 8. Sudaromas naudojamų tirpalų materialinis balansas kiekvienai stadijai. Lentelėje pateikiamos vandens, koncentruotos fosforo rūgšties (85 %), sauso natrio šarmo ir natrio chlorido sąnaudos (žr. lentelė. 3.10.).

Sudarant žaliavos materialinį balansą apskaičiuojama, kiek bus atliekama gamybinių taktų per darbo savaitės 144 val. Padalinus 144 iš 5,3 val. gauname, kad per savaitę bus atliekama apytiksliai 28 gamybiniai taktai. Žinant kiek taktų atliekama per savaitę, yra apskaičiuojama kiek bus – per mėnesį ir per 6 mėnesius. Per 6 mėnesius atliekami 648 taktai. Žinant ši dydį apskaičiuojama, kiek bus biomasės apdorojama per vieną gamybinį taktą, tai atliekama padalinant 7632 m^3 iš 648, gauname $11,78 \text{ m}^3$. Tolimesni skaičiavimai pateikiami lentelėje (žr. lentelė. 3.8.). Lentelėje, skaičiavimų stulpelyje dydis – 0,54 ml/g, yra amonio sulfato savitasis tūris. Dydis 0,313 t, tai amonio sulfato kiekis reikalingas įsotinti 1 m^3 nuo 0 iki 50 %.

Lentelė. 3.8. Stadijų žaliavos ir tarpinio produkto materialinis balansas.

| Stadija | Eksperimentinė dalis | | Projektavimo rezultatai | | | | | | Dimensija | | |
|--|----------------------|--------------|----------------------------------|-------|---|---------|---------|----------|----------------|--|--|
| | | | Taktai | | | | | | | | |
| | | | Neapvalinus skersmens | | Apvalinus skersmenį ir apjungus visas kolonas | | | | | | |
| | | | 1 | 1 | 28 | 108 | 648 | | | | |
| Dimensija | Duomenys | skaičiavimas | Rezultatai | 1 | 28 | 108 | 648 | | | | |
| Suardytos Biomasės tūris | ml | 10 | $\frac{7632}{648}$ | 11,78 | 11,82 | 331,03 | 1276,83 | 7660,99 | m ³ | | |
| Centrifugavus, ląstelių nuolaužas tūris | ml | 1,58 | $\frac{11,78 \cdot 1,58}{10}$ | 1,86 | 1,87 | 52,30 | 201,74 | 1210,44 | m ³ | | |
| Supernatanto tūris | ml | 8,42 | 11,78-1,86 | 9,92 | 9,95 | 278,73 | 1075,09 | 6450,56 | m ³ | | |
| Sauso amonio sulfato kiekis reikalinga įsotinti iki 50 % | - | - | 9,92·0,313 | 3,10 | 3,12 | 87,24 | 336,50 | 2019,02 | t | | |
| Tūris įmaišius amonio sulfatą | - | 10 | 9,92+(3,10·0,54) | 11,59 | 11,64 | 325,84 | 1256,80 | 7540,83 | m ³ | | |
| Nuosėdų tūris, nucentrifugavus baltymų suspensiją | ml | 1,5 | $\frac{11,59 \cdot 1,5}{10}$ | 1,74 | 1,75 | 48,88 | 188,52 | 1131,12 | m ³ | | |
| Supernatanto tūris | ml | 8,5 | 11,59-1,74 | 9,85 | 9,89 | 276,96 | 1068,28 | 6409,70 | m ³ | | |
| Ištirpinus nuosėdas | | - | 1,74·8 | 13,91 | 13,96 | 391,01 | 1508,17 | 9048,99 | m ³ | | |
| Žaliavos tūris praleistas pro koloną | ml | 590 | - | 13,91 | 13,96 | 391,01 | 1508,17 | 9048,99 | m ³ | | |
| Atliekų kiekis po chromatografijos | ml | 921,69 | $\frac{13,91 \cdot 921,69}{590}$ | 21,73 | 21,82 | 610,82 | 2356,04 | 14136,22 | | | |
| Po chromatografijos tarpinio produkto tūris | ml | 43 | $\frac{13,91 \cdot 43}{590}$ | 1,01 | 1,02 | 28,50 | 109,92 | 659,50 | m ³ | | |
| Produkto masė po liofilizavimo | mg | 1892 | $\frac{1,01 \cdot 1892}{43}$ | 44,61 | 44,78 | 1253,87 | 4836,36 | 29018,13 | kg | | |

Lentelė. 3.9. Chromatografinio gryninimo projektavimo skaičiavimai.

| | Tyrimų duomenis | Skaičiavimai | Projektavimo dalis | Skaičiavimai | Projektavimo dalis 4 kolonomis | Skaičiavimai | Projektavimo dalis apvalinus 4 kolonų skersmenį | Apjungus kolonas | |
|---|----------------------|--|--|---|---|---|---|------------------------|--------------|
| Pradinio mėginio tūris | 590,00 | (žr. lentelė. 3.8.) | 13912,75 l | $\frac{13912,75}{4}$ | 3478,19 l | $\frac{5917,16 \cdot 590}{1000}$ | 3491,12 l | 13964,50 l | |
| Gamybinio takto dydis lyginant su eksperimentiniu | 1,00 | $\frac{13912,75 \cdot 1000}{590}$ | 23580,94 k. | $\frac{3478,19 \cdot 1000}{590}$ | 5895,23 k. | $\frac{144440,00}{24,42}$ | 5917,16 k. | 23668,64 k. | |
| Sorbento aukštis, cm | 4,60 | | | | | | | | |
| Sorbento tūris | 24,41 ml | 24,41·23580,94 | 575619,14 ml | 24,41·5895,23 | 143904,79 ml | 31400,00·4,60 | 144440,00 ml | $\frac{577760,00}{ml}$ | |
| Kolonos skerspjūvio plotas | 5,31 cm ² | $\frac{575619,14}{4,60}$ | 125134,60 cm ² | $\frac{143904,79}{4,60}$ | 31283,65 cm ² | $3,14 \cdot \left(\frac{200}{2}\right)^2$ | 31400,00 cm ² | 125600,00 | |
| Kolonos skersmuo | 2,60 cm | $\sqrt{\frac{125134,6}{3,14}} \cdot 2$ | 399,26 cm | $\sqrt{\frac{31283,65}{3,14}} \cdot 2$ | 199,63 cm | - | 200,00 cm | 200 x 4 | |
| Kolonų skaičius, vnt | 1 | - | 1 | - | 4 | - | 4 | 4 | |
| Linijiniai greičiai | Sorbicija | 80,00 cm/val | | | | | | | |
| | Desorbicija | 8,00 cm/val | | | | | | | |
| | Regeneravimas | 40,00 cm/val | | | | | | | |
| Tūrinis greičiai | Sorbicija | $\frac{7,08}{ml/min}$ | $\frac{125134,60 \cdot 80}{1000 \cdot 60}$ | 166,85 l/min | $\frac{31283,65 \cdot 80}{1000 \cdot 60}$ | 41,71 l/min | $\frac{31400,00 \cdot 80}{1000 \cdot 60}$ | 41,87 l/min | 167,47 l/min |
| | Desorbicija | $\frac{0,71}{ml/min}$ | $\frac{125134,60 \cdot 8}{1000 \cdot 60}$ | 16,68 l/min | $\frac{31283,65 \cdot 8}{1000 \cdot 60}$ | 4,17 l/min | $\frac{31400,00 \cdot 8}{1000 \cdot 60}$ | 4,19 l/min | 16,75 l/min |
| | Regeneravimas | $\frac{3,54}{ml/min}$ | $\frac{125134,60 \cdot 40}{1000 \cdot 60}$ | 83,42 l/min | $\frac{31283,65 \cdot 40}{1000 \cdot 60}$ | 20,86 l/min | $\frac{31400,00 \cdot 40}{1000 \cdot 60}$ | 20,93 l/min | 83,73 l/min |
| Liofilizuoto Produkto kiekis | 1892,00 mg | $\frac{1892,00 \cdot 23580,94}{1000000}$ | 44,62 kg | $\frac{1892,00 \cdot 5895,23}{1000000}$ | 11,15 kg | $\frac{1892,00 \cdot 5917,16}{1000000}$ | 11,20 kg | 44,78 kg | |
| Lygsvarinimas | 0,29 val | | | | | | | | |
| Sorbicija | 1,39 val | | | | | | | | |
| Atplovimas | 0,29 val | | | | | | | | |
| Desorbicija | 2,9 val | | | | | | | | |
| Regeneravimas, | 0,46 val | | | | | | | | |
| Bendra trukmė | 5,3 val | | | | | | | | |

Iš chromatografinio gryninimo projektavimo rezultatų (žr. lentelė. 3.9.) – matyti, kad apdorojant 13912,75 l reiktų kolonos, kurios skersmuo 399,26 cm. Tokio dydžio kolonų negaminama, todėl vienos kolonos sorbento tūris yra padalinamas į 4 kolonas (išlaikant tą patį sorbento aukštį). Vienos kolonos skersmuo turi būti 199,63 cm, kad 4 tokio skersmens kolonos apdorotų tą patį žaliavos kiekį. 199,63 cm apvalinama į 200 cm. Projektavime naudojama VERDOT InPlace™ 2 m skersmens chromatografinė kolona. Su apvalintu skersmeniu perskaičiuojami kiti parametrai. Perskaičiuojami parametrai apjungus kolonas. Iš 13964,50 l žaliavos gauname 44,78 kg liofilizuoto produkto. Su gautu žaliavos tūriu perskaičiuojamas žaliavos materialinis balansas lentelėje (žr. lentelė. 3.8.).

Vienam taktui reikalingas biomasės tūris yra 11820 l, kad per 5,3 val būtų apdorota reikalinga biomasė, padavimo greitis turi būti – 2230,189 l/val, 37,17 l/min. Biomasės ardymui pasirenkamas statorius – rotorius – DISPAX–REACTOR® Inline DRS 2000/10. Pasirinkto statoriaus – rotoriaus didžiausias padavimo greitis yra 2500 l/val, tangentinis greitis – 40 m/s.

Suardytos biomasės centrifugavimui pasirenkama diskinė centrifuga – Alfa Laval Merco CH-38 GOF Separator. Pasirinktos centrifugos didžiausia santykinė centrifugavimo jėga – 4850 g, rotoriaus talpa – 202 l. Vienam taktui reikalingas suardytos biomasės tūris – 11820 l. Ląstelių nuolaužos pilnai nusėda centrifuguojant ekvivalentine trukme – 30000 min. Su pasirinkta centrifuga apskaičiuojama išlaikymo centrifugoje trukmė – 6,186 min (reikšmė gaunama 30000 min ekvivalentinę trukmę padalinant iš 4850 g), apskaičiuojamas suspensijos padavimo greitis 32,66 l/min (reikšmė gaunama padalinant rotoriaus talpą – 202 l iš 6,186 min). Vieno takto biomasės centrifugavimas užtruks 6,03 val. Kad takto biomasė būtų nucentrifuguota per 5,3 val. biomasė turi būti tiekiamas 37,17 l/min greičiu. Naudojant vieną centrifugą, suspensija nebus pilnai nuskaidrinta. Padalinus srautą į dvi centrifugas, gauname padavimo greitį – 18,59 l/min (į vieną centrifugą), perskaičiuojama užlaikymo trukmė – 10,87 min. Gauti centrifugavimo parametrai vienai centrifugai: žaliavos padavimo greitis – 18,59 l/min, užlaikymo trukmė – 10,87 min, apdorojamos žaliavos kiekis – 5910 l. Po centrifugavimo iš abiejų centrifugų gauname 9950 l supernatanto ir 1860 l nuosėdų. 9950 l supernatanto įsotinimui reikia 3100 kg amonio sulfato, kuris turi būti tiekiamas 9,75 kg/min greičiu.

Išsodintų baltymų centrifugavimui pasirenkama diskinė centrifuga – Alfa Laval Merco CH-38 GOF Separator. Pasirinktos centrifugos didžiausia santykinė centrifugavimo jėga – 4850 g, rotoriaus talpa – 202 l. Vienam taktui nuskaidrinti reikalingas baltymų suspensijos kiekis – 11637,08 l. Išsodintų baltymų suspensija pilnai perskiriama centrifuguojant ekvivalentine trukme – 70000 min. Naudojant vieną centrifugą, kuri dirba didžiausiu našumu, apskaičiuojama užlaikymo trukmė – 14,43 min, baltymų suspensijos padavimo greitis – 14 l/min. Vieno takto

suspensijos centrifugavimas užtruks 13,86 val. Kad išsodintų baltymų suspensija būtų nucentrifuguota per 5,3 val, suspensija turi būti tiekama 36,59 l/min. Tiekiant suspensiją tokiu greičiu, baltymai nepilnai nusės, todėl suspensija paskirstoma į 3 centrifugas. Padalinus srautą į 3 centrifugas gauname, kad į vieną centrifugą suspensija turi būti tiekama 12,2 l/min greičiu, o išlaikymo trukmė centrifugoje – 16,56 min.. Gauti parametrai vienai centrifugai: suspensijos padavimo greitis – 12,2 l/min, išlaikymo trukmė – 16,56 min, apdorojamas suspensijos kiekis – 3879,03 l. Po centrifugavimo (apjungus 3 centrifugas) gauname 1740 l nuosėdų, kurios yra ištirpinamos su 12170 l buferiniu tirpalu tiekiamu 38,27 l/min greičiu.

Normalaus filtravimo tiriamojoje dalyje buvo nustatyta, kad filtruojant per $5,3 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ skerspjūvio ploto filtrą, tiekiant filtruojamą tirpalą 0,6 l/val greičiu, filtravimo greitis – $938 \text{ l/m}^2 \cdot \text{val}$. Filtruojamo tirpalo tūris vienam projektavimo taktui – 13964,5 l. Kad taktui reikalingas tirpalas būtų prafiltruotas per 5,3 val.: apskaičiuojamas membranos plotas – $2,809 \text{ m}^2$, tirpalo padavimo greitis – 52,99 l/min, filtrato greitis – 43,91 l/min. Susidariusios nuosėdos praplaunamos 6982.25 l buferiniu tirpalu 21.96 l/min greičiu.

Diafiltravimo tiriamojoje dalyje buvo nustatyta, kad filtruojant per $0,14 \text{ m}^2$ skerspjūvio ploto membraną, vidutinis filtravimo greitis – $11,82 \text{ l/m}^2 \cdot \text{val}$ ir DV – 2,75, kai cirkuliacinis greitis – 1 l/min ir transmembraninis slėgis – 1,4 bar. Diafiltruojamo tirpalo tūris vienam taktui – 13964,5 l. Padauginę vieno takto tūrį iš DV, gauname, kad bus prafiltruojama 38402,37 l permeato. Atlikus žaliavos diafiltravimą, membrana plaunama 0,5 val. 1M NaOH (4467.96 l tirpalo). Atplovus šarmu, sistema valoma 0,5 val. (4467.96 l tirpalo) buferiniu tirpalu. Kad viso proceso trukmė būtų 5,3 val., membranos plotas turi būti 756 m^2 , cirkuliacinis greitis – 5400 l/min (transmembraninis slėgis išlaikomas toks pat). Gauname permeato tėkmės greitį – 148,93 l/min. Retantas yra papildomas buferiniu tirpalu 148,93 l/min greičiu. Gauname, kad diafiltracijos procesas užtruks 4,3 val., atplovimas šarmu – 0,5 val., atplovimas buferiniu tirpalu – 0,5 val.

Produkto diafiltravimas atliekamas vidutiniu greičiu – $9,25 \text{ l/m}^2 \cdot \text{val}$, DV – 7, po chromatografijos gauname 1020 l produkto. Pagal DV apskaičiuojame, kad reikės 7124,26 l buferinio tirpalo. Esant transmembraniniam slėgiui – 1,4 bar, diafiltravimas atliekamas per 4,3 val. su 179 m^2 ploto membrana. Membrana plaunama 0,5 val. su 1 M natrio šarmu (827,88 l). Po to plaunama 0,5 val. buferiniu tirpalu (827,88 l). Visas procesas užtrunka 5,3 val. Permeato tėkmės greitis – 27,6 l/min, recirkuliacinis greitis – 1278,571 l/min, retantas papildomas 27,6 l/min greičiu.

Tirpalų materialinis balansas pateikiamas lentelėje (žr. lentelė. 3.10.). Buferinių tirpalų NaOH sąnaudos apskaičiuojamos pirma nustačius, kiek reikia NaOH paruošti 1 l buferinio tirpalo. Skaičiavimai atliekami naudojant Henderson'o – Hasselbalch'o lygtį (3.1). Randama, kad 1 l

10 mM fosfatiniam buferiniam tirpalui pH 7 reiks 0,68 g NaOH. Skaičiuojant 85 % fosforo rūgšties sąnaudas, naudojamas tankis – 1,885 kg/l.

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10} \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right) \quad (3.1)$$

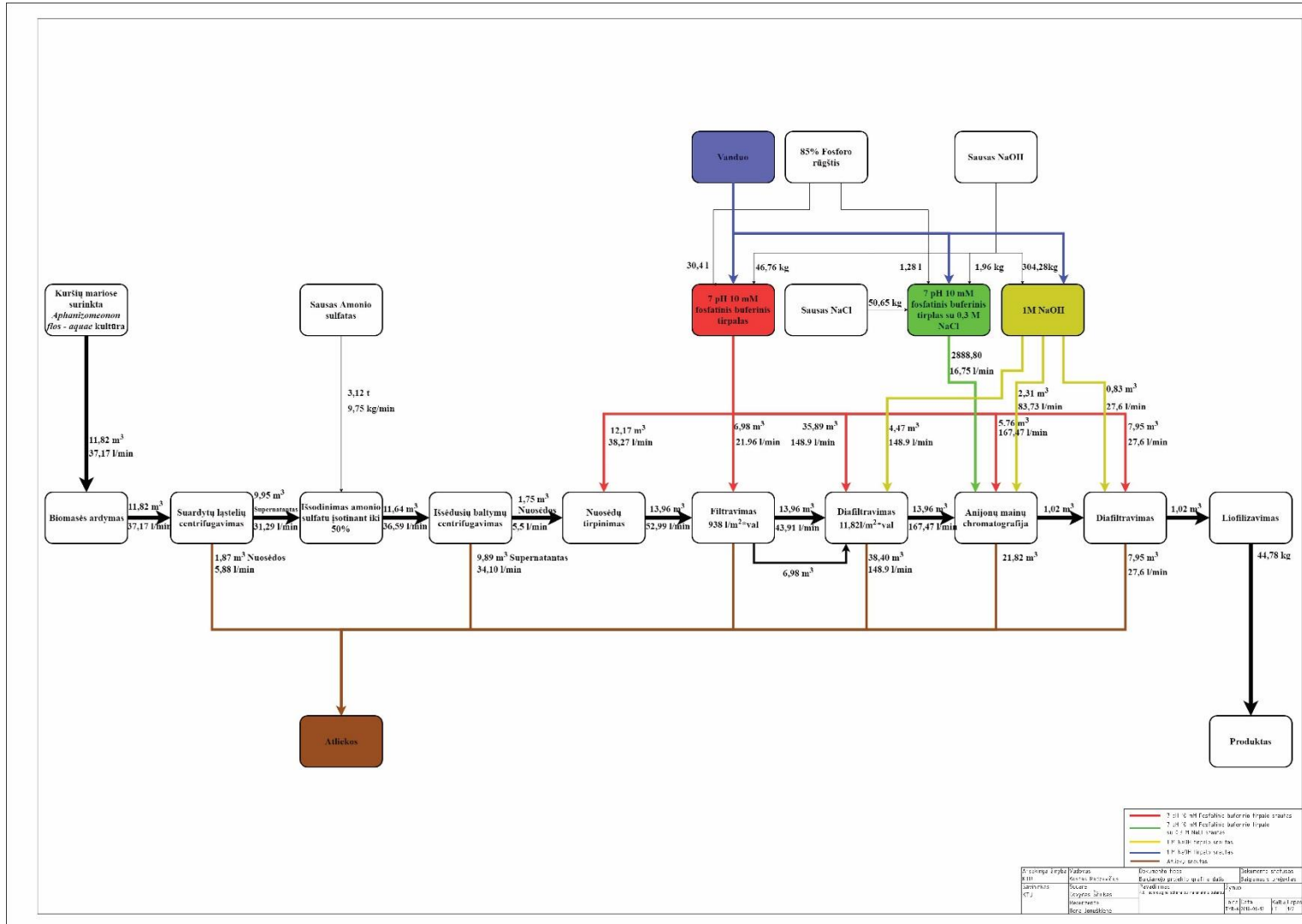
Čia: pK_a – Fosforo rūgšties disociacijos konstantos neigiamas dešimtainis logaritmas – 7,2, α – disociacijos laipsnis.

Lentelė. 3.10. Buferinių tirpalų sąnaudų materialinis balansas vienam gamybiniam taktui.

| Tirpalas | Stadija | | Sąnaudos vienas taktui | | | |
|--|-------------------------|--|------------------------|-------------------------|----------|----------|
| | | | Tirpalo tūris, l | 85 % fosforo rūgštis, l | NaOH, kg | NaCl, kg |
| 7 pH 10 mM Fosfatinis buferinis | Suspendavimas | Nuosėdų po išsodinimo amonio sulfatu suspendavimas | 12172,69 | 5,38 | 8,28 | 0,00 |
| | Filtravimas | Nuosėdų atplovimas | 6982,25 | 3,09 | 4,75 | 0,00 |
| | Diafiltravimas | Baltyminio tirpalo skiedimas diafiltruojant | 31420,12 | 13,88 | 21,37 | 0,00 |
| | | Membranos atplovimas buferiniu tirpalu | 4467,96 | 1,97 | 3,04 | 0,00 |
| | Chromatografija | Chromatografinės kolonos lygsvarinimas | 2888,80 | 1,28 | 1,96 | 0,00 |
| | | Chromatografinės kolonos Atplovimas | 2888,80 | 1,28 | 1,96 | 0,00 |
| | Produkto diafiltravimas | Baltyminio tirpalo skiedimas diafiltruojant | 7124,26 | 3,15 | 4,84 | 0,00 |
| | | Atplovimas buferiniu tirpalu po plovimo šarmu | 827,88 | 0,37 | 0,56 | 0,00 |
| 7 pH 10 mM Fosfatinis buferinis tirpalas su 0,3 M NaCl | Chromatografija | Desorbicija | 2888,80 | 1,28 | 1,96 | 50,65 |
| | | Regeneravimas | 2311,04 | 0,00 | 92,44 | 0,00 |
| 1 M NaOH tirpalas | Diafiltravimas | Membranos atplovimas | 4467,96 | 0,00 | 178,72 | 0,00 |
| | Produkto Diafiltravimas | Membranos atplovimas | 827,88 | 0,00 | 33,12 | 0,00 |
| Iš viso | | | 79268,43 | 31,66 | 353,00 | 50,65 |

4. GRAFINĖ DALIS

4.1. Technologinė schema su materialiniu balansu

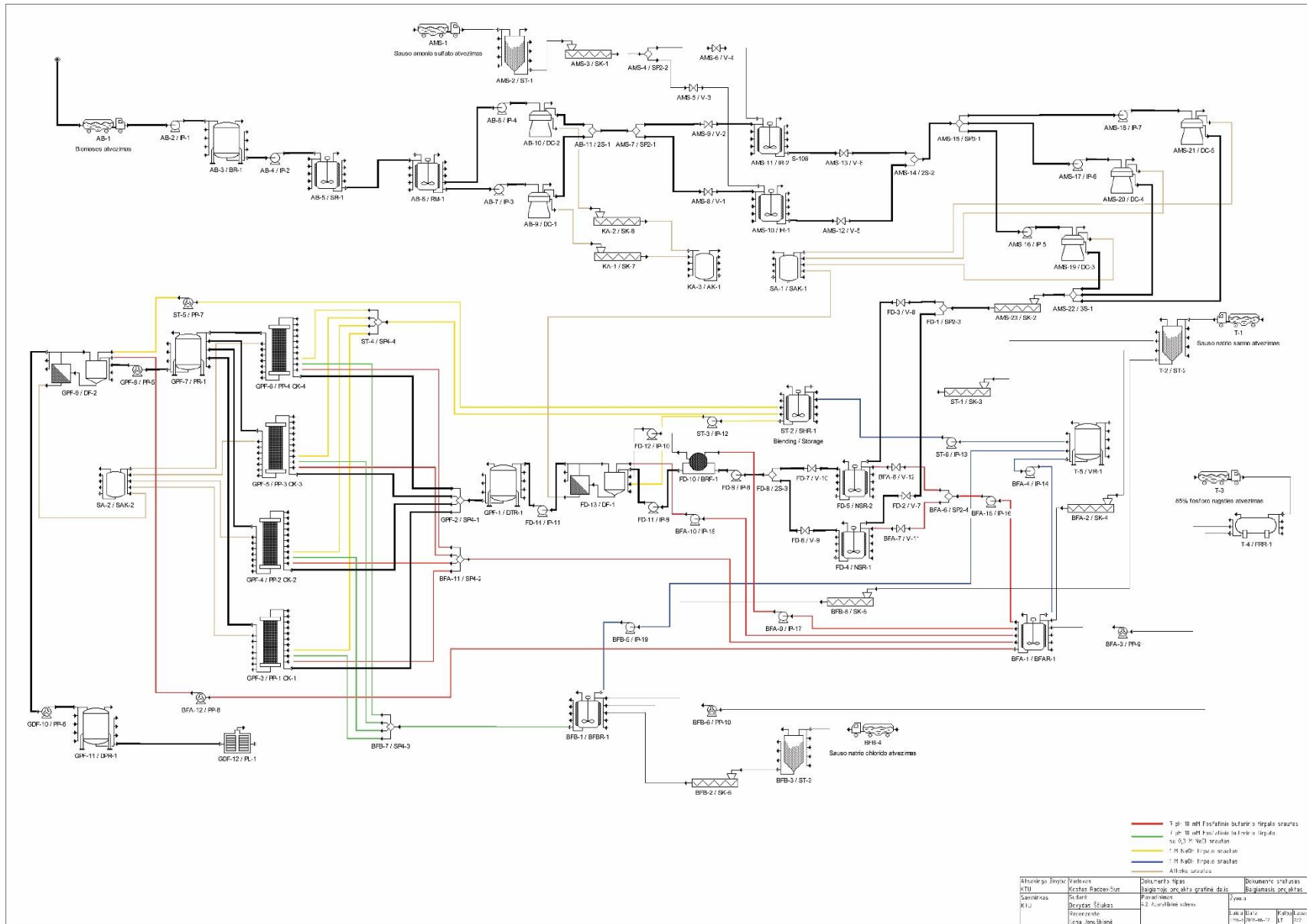


4.2. Aparatūrinė schema

Projektuojamoje dalyje naudojama įranga

| Žymėjimas brėžinyje | Įranga | Gamintojas |
|---------------------------------|---|------------|
| 2S-1, 2S-2, 2S-3, 3S-1 | 2 srauto kelių maišyklė 3 srauto kelių maišyklė | - |
| AK-1 | 58 m ³ talpykla ląstelių nuolaužų nuosėdoms | - |
| BFAR-1 | 2150 m ³ talpos maišomas rezervuaras 7 pH 10 mM fosfatiniam buferiniam tirpalui | - |
| BFBR | 90 m ³ talpos rezervuaras 7 pH 10 mM fosfatiniam buferiniam tirpalui su 0,3 M NaCl | - |
| BR-1 | 55 m ³ talpos rezervuaras Biomasei | - |
| BRF-1 | 2,809 m ² ploto būgninis rotorinis filtras | ANDRITZ |
| CK-1, CK-2, CK-3, CK-4 | 2 m skersmens chromatografinė kolona – „InPlace™“ | VERDOT |
| DC-1, DC-2, DC-3, DC-4, DC-5 | Diskinė centrifuga – „Merco CH-38 GOF Separator“ | Alfa Laval |
| DF-1 | Diafiltravimo sistema su 756 m ² ploto membrana | NOVASEP |
| DF-2 | Produkto diafiltravimo sistema su 179 m ² ploto membrana | NOVASEP |
| DPR-1 | 1,2 m ³ talpos rezervuaras dializuotui tarpiniam produktui | - |
| FRR-1 | 20 m ³ talpos rezervuaras 85 % fosforo rūgščiai | - |
| IP - 15 | Išcentrinis siurblys – „K 100/160A 6000 l/min“ | City pumps |
| IP 13 | Išcentrinis siurblys – „NMD NM 40/16A-60/C 700 l/min“ | Calpeda |
| IP-1 | Išcentrinis siurblys – „AM 50-125CE 450 l/min“ | Calpeda |
| IP-11 | Išcentrinis siurblys – „NMD NM 25/160AE-60“ 200 l/min“ | Calpeda |
| IP-18 | Išcentrinis siurblys – „NM 25/160BE-60 160 l/min“ | Calpeda |
| IP-19 | Išcentrinis siurblys – „NM 32/16B-60/A 280 l/min“ | Calpeda |
| IP-2, IP-16 | Išcentrinis siurblys – „C 16/1E 40 l/min“ | Calpeda |
| IP-3, IP-4, IP-10, IP-12, IP-17 | Išcentrinis siurblys – „59530 P4 23 l/min“ | JABSCO |
| IP-5, IP-6, IP-7 | Išcentrinis siurblys – „UNISTAR 2000 – A 15 l/min“ | ZUWA |
| IP-8, IP-9 | Išcentrinis siurblys – „NMD 20/110B-60/A 60 l/min“ | Calpeda |
| IR-1, IR-2 | 13 m ³ talpos reaktorius su maišykle išsodinimui amonio sulfatu | - |

| Žymėjimas brėžinyje | Įranga | Gamintojas |
|---|---|---------------------------------|
| NSR-1, NSR-2 | 15,5 m ³ talpos rezervuaras su maišykle baltymų nuosėdoms ištirpinti | - |
| PL-1 | Liofilizatorius | - |
| PP-1, PP-2, PP-3, PP-4, PP-5, PP-6, PP-7, PP-8 | Peristaltinis siurblys – „B/T Pump - Variable-Speed 42 l/min“ | Masterflex |
| PP-10 | Peristaltinis siurblys – „ECOLINE VC-MS/CA4-12 150 ml/min“ | Ismatec |
| PP-9 | Peristaltinis siurblys – „N6-3L 3,6 l/min“ | BAODING SHENCHEN PRECISION PUMP |
| PR-1 | 1,2 m ³ talpos rezervuaras tarpiniam produktui | - |
| RM-1 | 2 m ³ talpos rezervuaras su maišykle suardytai biomasei | - |
| SAK-1 | 1640 m ³ rezervuaras skystoms atliekoms | - |
| SAK-2 | 950 m ³ rezervuaras skystoms atliekoms | - |
| SHR-1 | 237 m ³ talpos maišomas rezervuaras 1 M natrio šarmo tirpalui | - |
| SK-1 | Sraigtinis konvejeris sausam amonio sulfatui transportuoti | - |
| SK-2 | Sraigtinis konvejeris baltymų nuosėdoms transportuoti | - |
| SK-3, SK-4, SK-5 | Sraigtinis konvejeris sausam natrio šarmui transportuoti | - |
| SK-6 | Sraigtinis konvejeris natrio chloridui transportuoti | - |
| SK-7, SK-8 | Sraigtinis konvejeris ląstelių nuolaužoms transportuoti | - |
| SP2-1, SP2-2, SP2-3, SP2-4 | 2 srauto kelių daliklis | - |
| SP3-1 | 3 srauto kelių daliklis | - |
| SP4-1, SP4-2, SP4-3, SP4-4 | 4 srauto kelių daliklis | - |
| SR-1 | Statorius rotorius – „DISPAX-REACTOR® Inline DRS 2000/10“ | IKA |
| ST-1 | 55 m ³ talpykla amonio sulfato druskai sandėliuoti | - |
| ST-2 | 5 m ³ talpykla natrio šarmui sandėliuoti | - |
| ST-3 | 15 m ³ talpykla natrio chloridui sandėliuoti | - |
| V-1, V-2, V-3, V-4, V-5, V-6, V-7, V-8, V-9, V-10, V-11, V-12 | Elektrinis sklendės – „172 - Stainless steel - EPDM gasket“ | LAURISSEN industri |
| VR-1 | 2500 m ³ rezervuaras vandeniui | - |



5. DARBUOTOJŲ SAUGA IR SVEIKATA

Projektuojamo proceso metu naudojama įranga: centrifugos, siurbliai, statorius – rotorius, konvejeriai. Proceso naudojamos cheminės medžiagos – natrio šarmas, fosforo rūgštis, amonio sulfatas, natrio chloridas. Pagal naudojamą įrangą, chemines medžiagas, galime suskirstyti atsirandančius kenkiančius profesinės rizikos veiksnius į fizinius ir cheminius.

Pagal Reglamentą (EB) Nr 1907/2006, natrio šarmas ir fosforo rūgštis yra medžiagos klasifikuojamos kaip sukeliančios pavojingą cheminį veiksni (piktogramos, pavojingumo frazės, atsargumo frazės pateikiamos žemiau). Pagal Reglamentą amonio sulfatas ir natrio chloridas nereikalauja žymėjimo. Kad būtų išvengta nukentėjimų su aptartomis medžiagomis, reagentų talpyklos būtų žymimos atitinkamomis etiketėmis (piktogramomis). Tolimesnė rizika būtų mažinama mažinant darbuotojų kontakto laiką su pavojingomis medžiagomis, automatizuojant tirpalų gamybą. Žmonės, kurie dirbtų prie šių medžiagų, privalėtų nešioti apsauginius drabužius, avalynę. Naudojamas natrio šarmas yra sausoje formoje, tai gali sukelti medžiagos dulkelį, o fosforo rūgštis garuoja, todėl darbuotojai turėtų nešioti respiratorius, kad kenksminga medžiaga nepatektų į kvėpavimo takus. Darbuotojai privalėtų nešioti akinius, kad medžiagos nepakliūtų į akis.

Fosforo rūgštis

Piktograma(GHS05):



Pavojingos frazės

H290 – Gali ėsdinti metalus. **H314** – Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis.

Atsargumo frazės – prevencinės

P280 – Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/naudoti akių apsaugos priemones/veido apsaugos priemones.

Atsargumo frazės – atoveikis

P303+P361+P353 – patekus ant odos (arba plaukų): nusivilkite visus užterštus drabužius. Nuplaukite odą vandeniu/po dušu.

P305+P351+P338 – patekus į akis: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

P310 - skambinti į apsinuodijimų kontrolės ir informacijos biurą/kreiptis į gydytoją.

Natrio šarmas

Piktograma(GHS05):



Pavojingos frazės

H290 – Gali ėsdinti metalus. **H314** – Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis.

Atsargumo frazės – prevencinės

P280 – Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/naudoti akių apsaugos priemones/veido apsaugos priemones.

Atsargumo frazės – atoveikis

P301+P330+P331 – prarijus: išskalauti burną. Neskatinėti vėmimo.

P305+P351+P338 – patekus į akis: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

P310 – skambinti į apsinuodijimų kontrolės ir informacijos biurą/kreiptis į gydytoją.

Pavojingi fiziniai veiksniai iš aptartos įrangos gali pasireikšti: vibracijos, triukšmo, slėginio sprogo formomis. Apsaugai nuo vibracijos, po problemine įranga, įrengiamos vibraciją sugeriančios grindys. Apsaugoti nuo triukšmo darbuotojai būtų aprūpinami garso nepralaidžiomis ausinėmis. Apsaugai nuo sprogo (dėl per didelio slėgio), būtų įmontuojami apsauginiai vožtuvai, kurie pakilus slėgiui iki pavojingos vertės automatiškai suveiktų. Darbuotojai būtų apmokomi, kaip naudotis aptarta įranga, kad nenutiktų nelaimingų atsitikimų.

IŠVADOS

1. Pagal biomasės mikroskopijos nuotraukas, prieš ardymą ir po kiekvienos ardymo trukmės, galima teigti, kad statorių – rotorių galima naudoti šviežios biomasės ardymui.
2. Atlikus normalųjį filtravimą su tirpalu, gautu ištirpinus amonio sulfatu išsodintus baltymus, buvo nustatyta, kad tiekiant tirpalą 0,6 l/val greičiu, nustatytas filtravimo greitis – 999,01 l/m²*val išlaikant pastovų slėgį iki 2 atm. Prafiltravus 125 ml sunaudojama 5,3 ml ceolito.
3. Atlikus dializę su tirpalu, gautu ištirpinus amonio sulfatu išsodintus baltymus, buvo nustatyta, kad sumažinti 100 ml mėginio savitąjį elektrinį laidį iki 1 mS/cm, reikia VS – 50 dializės buferinio tirpalo, pakeičiant buferinį tirpalą 2 kartus.
4. Su tirpalu, gautu ištirpinus amonio sulfatu išsodintus baltymus, atlikus diafiltravimą buvo nustatyta, kad vidutinis filtravimo greitis – 11,82 l/m²*val. Kad 1 l mėginio pasiektų buferiniui tirpalui artimą savitąjį elektrinį laidį, reikia sunaudoti 2,75 l buferinio tirpalo.
5. Išanalizavus fikocianino C stabilumo priklausomybės nuo pH rezultatus, buvo nustatyta, kad tikslinis baltymas yra stabilus pH intervale nuo 3,5 iki 7,5.
6. Atlikus statinėmis sąlygomis fikocianino C imlumo priklausomybės nuo pH tyrimą (su dviem sorbentais – anijonito Q – Sepharose XL ir katijonito SP – Sepharose XL), buvo nustatyta, kad tikslinis baltymas sorbuojasi ant anijonito, kai pH yra aukščiau 5,2. Tikslinis baltymas ant katijonito sorbuojasi pH vertėse mažesnėse už 5.
7. Atlikus chromatografiją su dviem sorbentais – anijonitu Q – Sepharose XL ir katijonitu SP – Sepharose XL, buvo nustatyta, kad desorbuojant mažamolekuliniu priešjonių nuo anijonito, vidutiniškai eliuuojasi 80,1 % sorbuoto tikslinio baltymo. Desorbuojant mažamolekuliniu priešjonių nuo katijonito, eliuojasi 35 % sorbuoto tikslinio baltymo. Desorbuojant keičiant pH nuo anijonito, eliuojasi apie 36,7 % sorbuoto tikslinio baltymo, katijonito – 37,02 %. Didžiausia tikslinio baltymo išeiga gaunama naudojant anijonitą ir atliekant desorbciją, didinant mažamolekulinių priešjonių koncentraciją. Mažinant sorbcijos pH, gauname didesnę grynumą (sorbcijos pH – 6 grynumas – 2,84, pH – 7 grynumas – 2,58), bet žinant, kad dinaminėmis sąlygomis mažinant pH yra sorbuojama mažiau baltymo, didesnio mastelio chromatografijai pasirenkamas sorbcijos pH – 7.
8. Atlikus didesnio mastelio chromatografiją, iš 590 ml praleisto mėginio, gauname 43 ml 37,6 mg/ml baltymų koncentracijos tirpalą su grynumu (A_{620nm}/A_{280nm}) – 2,63.
9. Atlikus produkto liofilizavimą iš 1 ml produkto gaunama 44 mg miltelių.
10. Atlikus kapiliarinę elektroforezę buvo nustatyta, kad fikocianino C subvienetų molekulinės masės – 16,6 ir 21 kDa.

11. Atlikus molekulinę sietų chromatografiją buvo nustatyta, kad fikociano C subvienetų molekulinės masės – 14 ir 21,4 kDa.
12. Atlikus gamybos projektavimą esant tikslui apdoroti metinį melsvabakterijų derlių iš Lietuvos Kuršių marių per pusę metų, gauname, kad 7661 m³ biomasei apdoroti reikės atlikti 648 gamybinius taktus. Vieno takto trukmė 5,3 val., per kurias bus apdorojama 11,82 m³ biomasės ir gaunama 44,78 kg liofilizuoto produkto.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Abed R.M.M., Dobretsov S. and Sudesh K. Applications of Cyanobacteria in Biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 01/01; 2018/05, 2009, vol. 106, no. 1. pp. 1-12 ISSN 1364-5072.
2. ENZING, C., et al. ***Microalgae-Based Products for the Food and Feed Sector: An Outlook for Europe***. [EUR - Scientific and Technical Research Reports]. Publications Office of the European Union. , 2014 ISBN 978-92-79-34037-6.
3. ROMAY, C., et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of C-Phycocyanin from Blue-Green Algae. *Inflammation Research*, 01/01, 1998, vol. 47, no. 1. pp. 36-41 ISSN 1420-908X.
4. ŠULČIUS, S. *Phycocyanin Harvesting from Natural Environment*. Lietuvos gamtos tyrimų centras: , 2015.
5. KUMAR, D., DHAR, D.W. and PABBI, S. ***Extraction and Purification of C-Phycocyanin from Spirulina Platensis (CCC540)***. India: Springer India, 2014, 2014 ISBN - 0974-0252.
6. SINGH, N.K., PARMAR, A. and MADAMWAR, D. *Optimization of Medium Components for Increased Production of C-Phycocyanin from Phormidium Ceylanicum and its Purification by Single Step Process*. , February 2009, 2009 ISBN 0960-8524.
7. CHANEVA, G., FURNADZHIEVA, S., MINKOVA, K. and LUKAVSKY, J. Effect of Light and Temperature on the Cyanobacterium Arthonema Africanum - a Prospective Phycobiliprotein-Producing Strain. *Journal of Applied Phycology*, 10/01, 2007, vol. 19, no. 5. pp. 537-544 ISSN 1573-5176.
8. ERIKSEN, N.T. Production of Phycocyanin—a Pigment with Applications in Biology, Biotechnology, Foods and Medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, vol. 80, no. 1. pp. 1-14 ISSN 0175-7598.
9. CHAIKLAHAN, R., CHIRASUWAN, N. and BUNNAG, B. *Stability of Phycocyanin Extracted from Spirulina Sp.: Influence of Temperature, pH and Preservatives*. , April 2012, 2012 ISBN 1359-5113.
10. MISHRA, S.K., SHRIVASTAV, A. and MISHRA, S. *Effect of Preservatives for Food Grade C-PC from Spirulina Platensis*. , April 2008, 2008 ISBN 1359-5113.
11. KAO, O.H., EDWARDS, M.R. and BERNS, D.S. Physical-Chemical Properties of C-Phycocyanin Isolated from an Acido-Thermophilic Eukaryote, Cyanidium Caldarium. *Biochemical Journal*, 04, 1975, vol. 147, no. 1. pp. 63-70 PMC. ISSN 0264-6021; 1470-8728.
12. SANTIAGO-SANTOS, M.C., et al. *Extraction and Purification of Phycocyanin from Calothrix Sp.* , 29 October 2004, 2004 ISBN 1359-5113.
13. BENEDETTI, S., et al. Purification and Characterization of Phycocyanin from the Blue-Green Alga *Aphanizomenon Flos-Aquae*. *Journal of Chromatography B*, 3/20, 2006, vol. 833, no. 1. pp. 12-18 ISSN 1570-0232.

14. PATEL, A., MISHRA, S., PAWAR, R. and GHOSH, P.K. Purification and Characterization of C-Phycocyanin from Cyanobacterial Species of Marine and Freshwater Habitat. *Protein Expression and Purification*, 4, 2005, vol. 40, no. 2. pp. 248-255 ISSN 1046-5928.
15. RAMOS, A., et al. Development of a Process for Large-Scale Purification of C-Phycocyanin from *Synechocystis Aquatilis* using Expanded Bed Adsorption Chromatography. *Journal of Chromatography B*, 3/1, 2011, vol. 879, no. 7–8. pp. 511-519 ISSN 1570-0232.
16. MORAES, C.C., MAZUTTI, M.A., MAUGERI, F. and KALIL, S.J. *Modeling of Ion Exchange Expanded-Bed Chromatography for the Purification of C-Phycocyanin.* , 15 March 2013, 2013 ISBN 0021-9673.
17. NIU, J., WANG, G., LIN, X. and ZHOU, B. Large-Scale Recovery of C-Phycocyanin from *Spirulina Platensis* using Expanded Bed Adsorption Chromatography. *Journal of Chromatography B*, 5/1, 2007, vol. 850, no. 1–2. pp. 267-276 ISSN 1570-0232.
18. CHAIKLAHAN, R., et al. Separation and Purification of Phycocyanin from *Spirulina Sp.* using a Membrane Process. *Bioresource Technology*, 7, 2011, vol. 102, no. 14. pp. 7159-7164 ISSN 0960-8524.
19. PATIL, G. and RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous Two Phase Extraction for Purification of C-Phycocyanin. *Biochemical Engineering Journal*, 5, 2007, vol. 34, no. 2. pp. 156-164 ISSN 1369-703X.
20. PATIL, G., CHETHANA, S., MADHUSUDHAN, M.C. and RAGHAVARAO, K.S.M.S. Fractionation and Purification of the Phycobiliproteins from *Spirulina Platensis*. *Bioresource Technology*, 10, 2008, vol. 99, no. 15. pp. 7393-7396 ISSN 0960-8524.
21. CHETHANA, S., NAYAK, C.A., MADHUSUDHAN, M.C. and RAGHAVARAO, K.S.M.S. Single Step Aqueous Two-Phase Extraction for Downstream Processing of C-Phycocyanin from *Spirulina Platensis*. *Journal of Food Science and Technology*, 02/07, 2014, vol. 52, no. 4. pp. 2415-2421 PMC. ISSN 0022-1155; 0975-8402.
22. MORAES, C.C. and KALIL, S.J. *Strategy for a Protein Purification Design using C-Phycocyanin Extract.* , November 2009, 2009 ISBN 0960-8524.
23. BENEDETTI, S., et al. Purification and Characterization of Phycocyanin from the Blue-Green Alga *Aphanizomenon Flos-Aquae*. *Journal of Chromatography B*, 2006, vol. 833, no. 1. pp. 12-18.
24. RITO-PALOMARES, M., NUÑEZ, L. and AMADOR, D. *Practical Application of Aqueous Two-Phase Systems for the Development of a Prototype Process for C-Phycocyanin Recovery from Spirulina Maxima.* , 11/13, 2001.
25. BOUSSIBA, S. and RICHMOND, A.E. Isolation and Characterization of Phycocyanins from the Blue-Green Alga *Spirulina Platensis*. *Archives of Microbiology*, 1979, vol. 120, no. 2. pp. 155-159 ISSN 0302-8933.

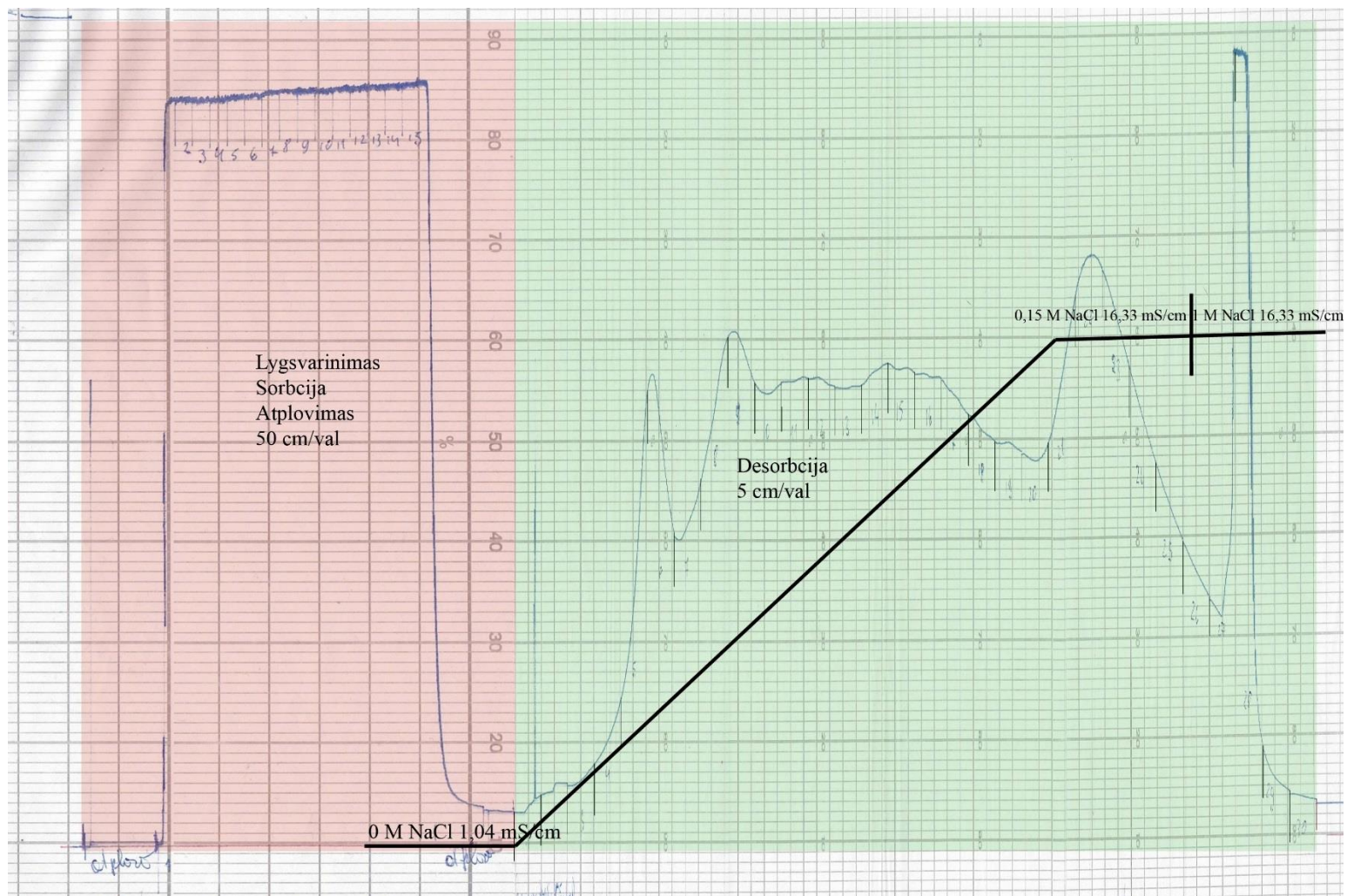
26. ŠČIUKAS, D. *C-fikocianino Išskyrimas Iš Melsvabakterijų Aphanizomenon Flos-Aquae: Bakalauro Darbas*. Kaunas: Kauno technologijos universitetas. Prieiga per eLABa – nacionalinė Lietuvos akademinė elektroninė biblioteka, 2016.

27. YAN, S., et al. *Single-Step Chromatography for Simultaneous Purification of C-Phycocyanin and Allophycocyanin with High Purity and Recovery from Spirulina (Arthrospira) Platensis*. , 02/01, 2011.

PRIEDAI

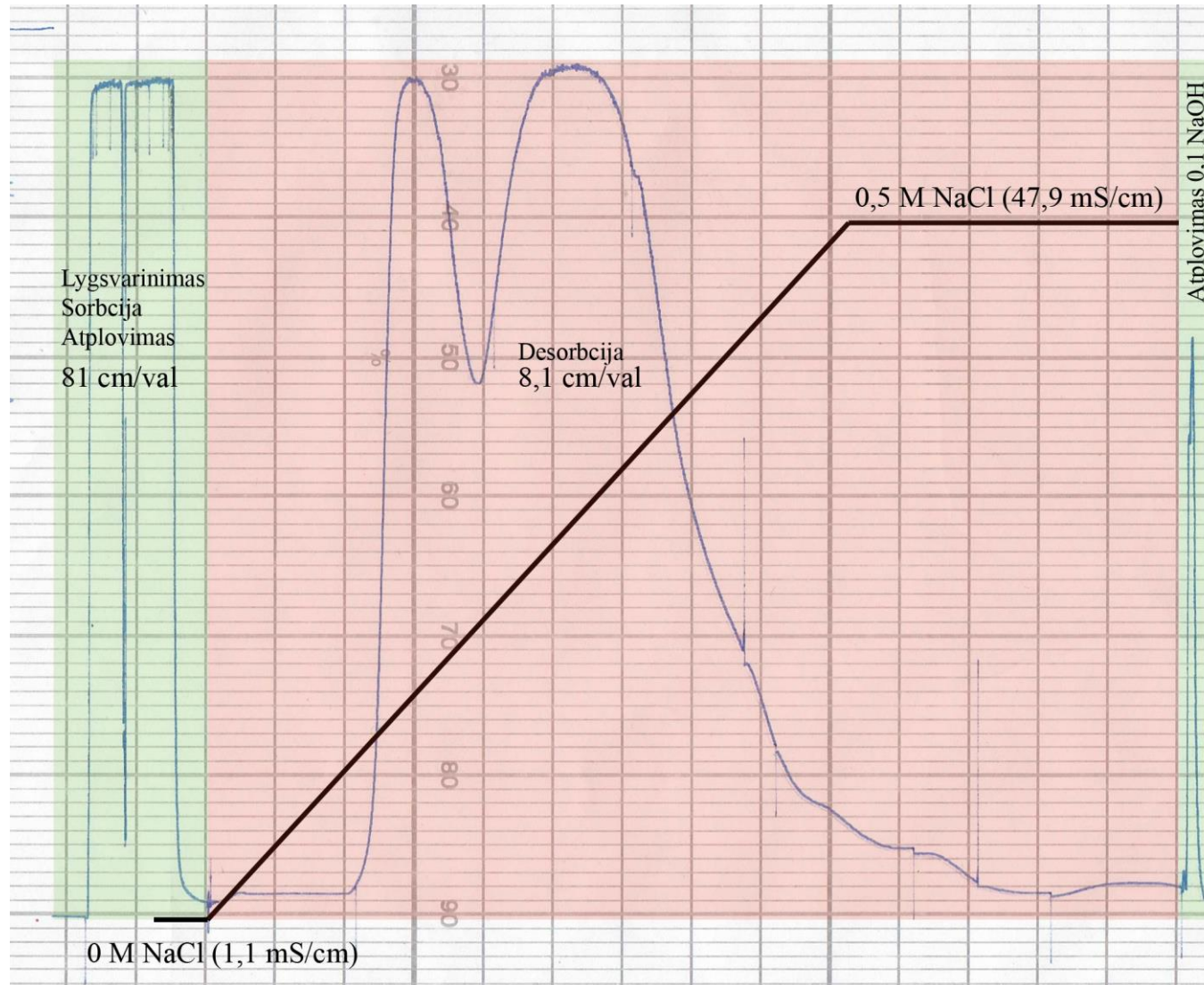
Nr. 1

Anijonų mainų chromatograma kai sorbcijos pH 6



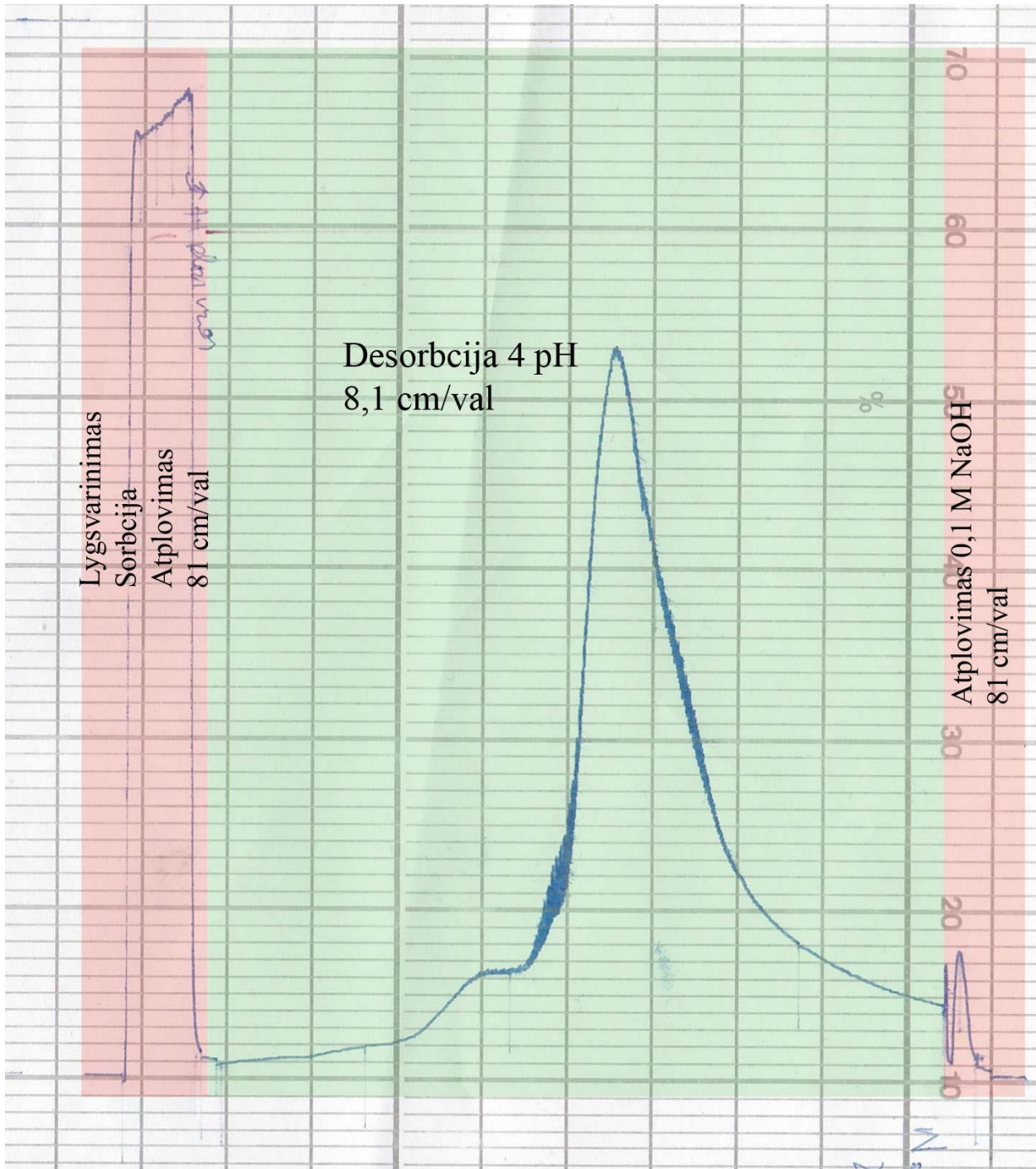
Nr. 2

Anijonų mainų chromatograma kai sorbcijos pH 7



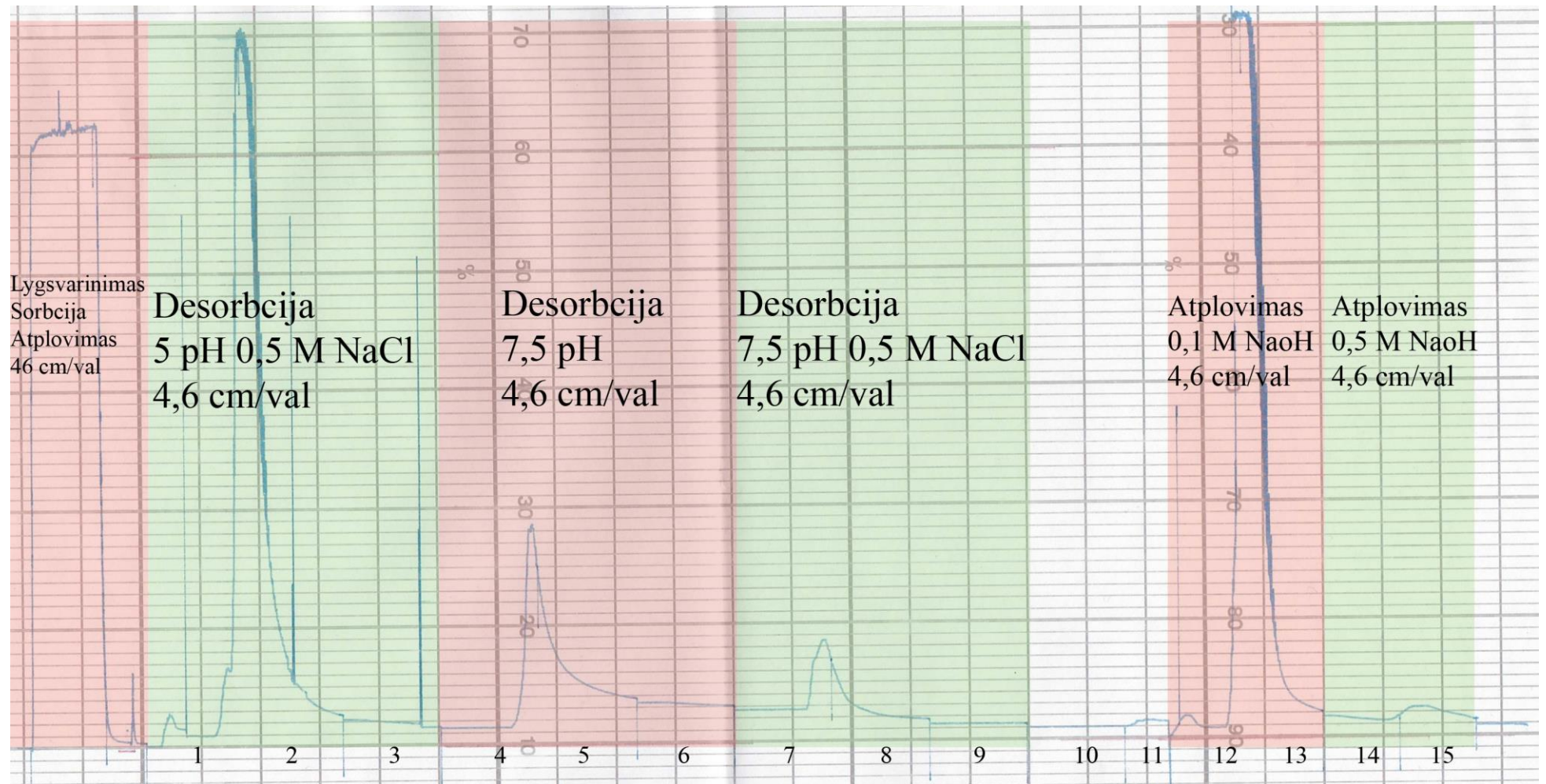
Nr. 3

Anijonų mainų chromatograma desorbuojant sumažinus pH iki 4



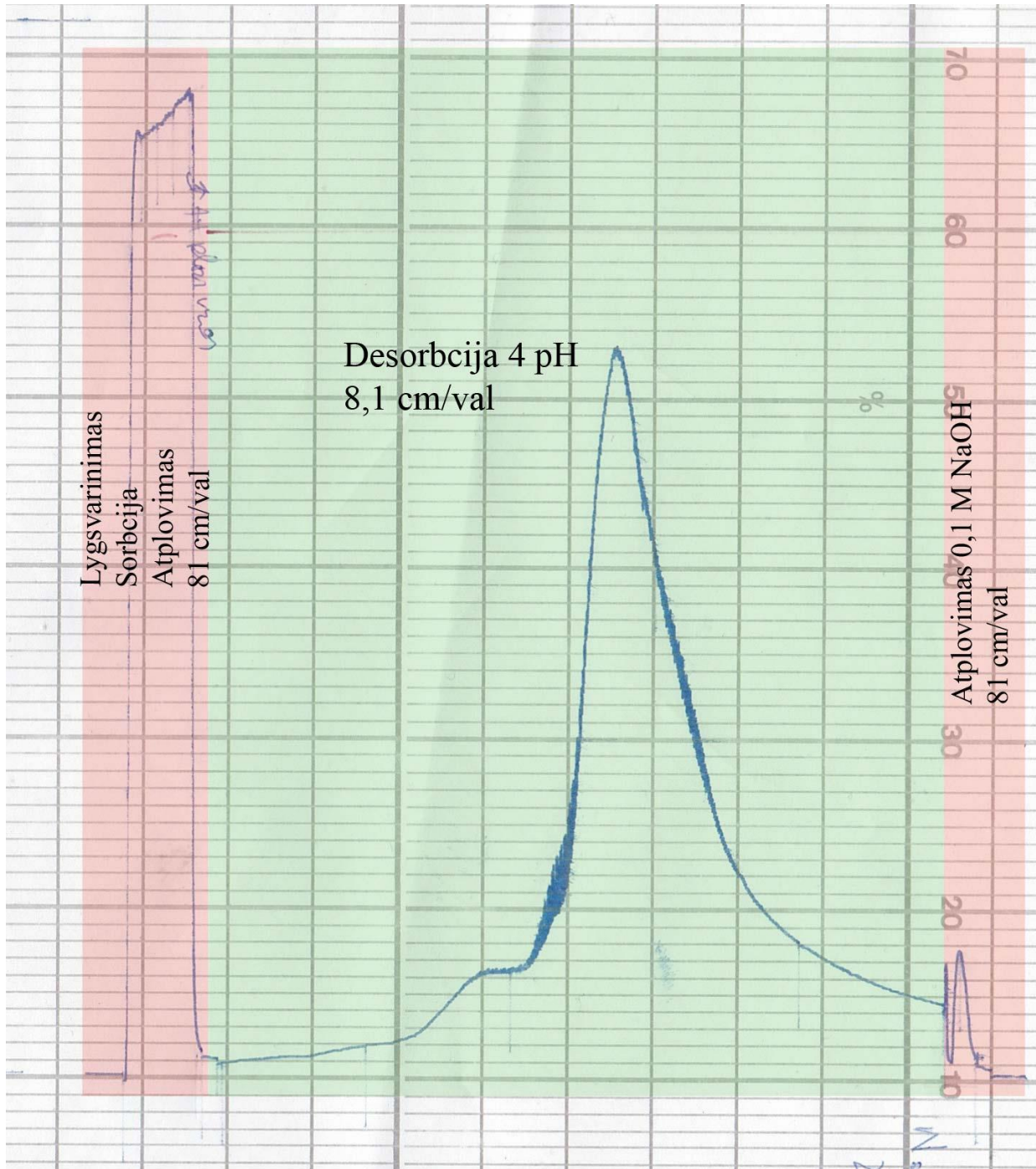
Nr. 4

Katjonų mainų chromatograma desorbuojant skirtingomis sąlygom



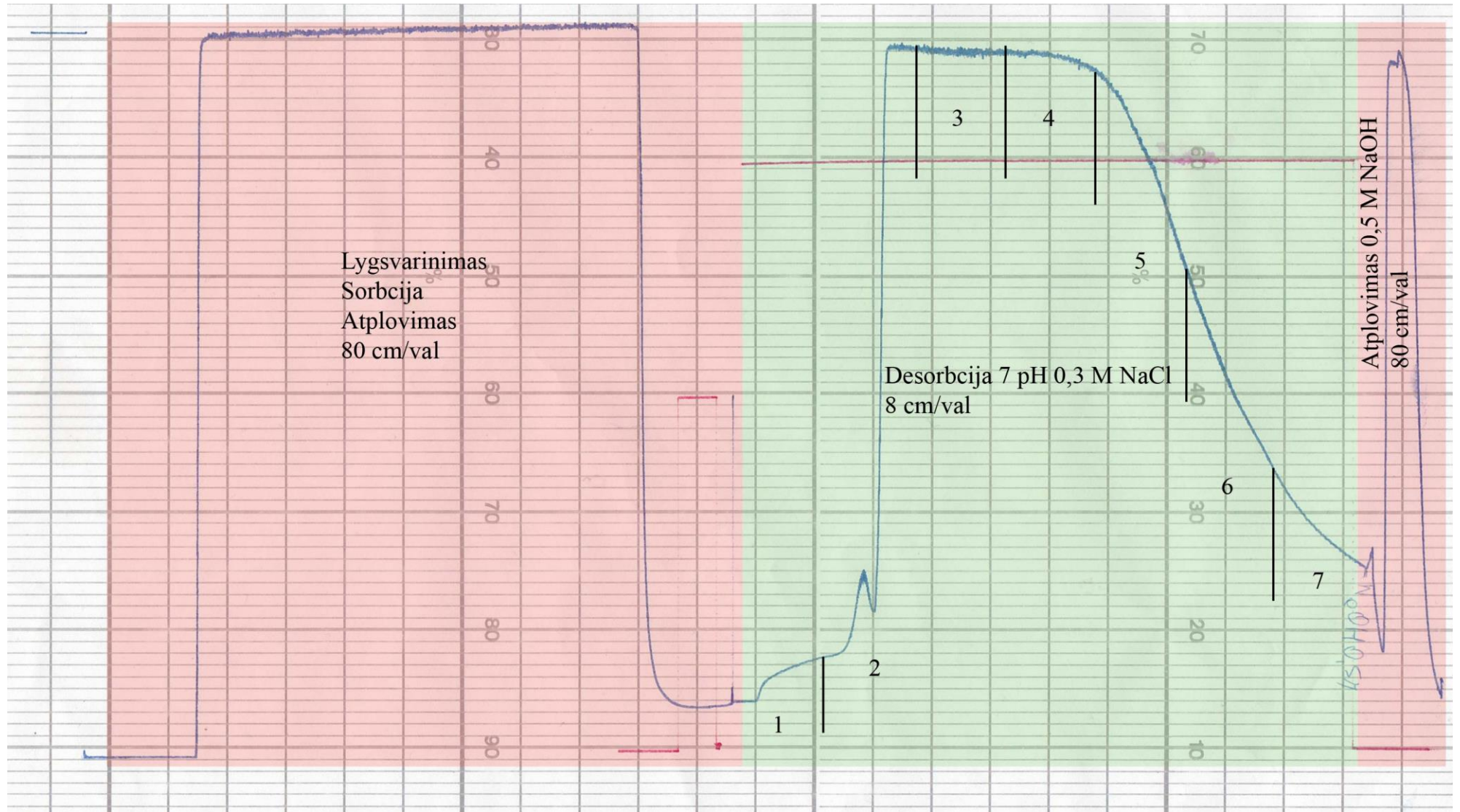
Nr. 5

Katjonų mainų chromatografija desorbuojant didinant pH



Nr. 6

Didesnio mastelio anijonų mainų chromatografija

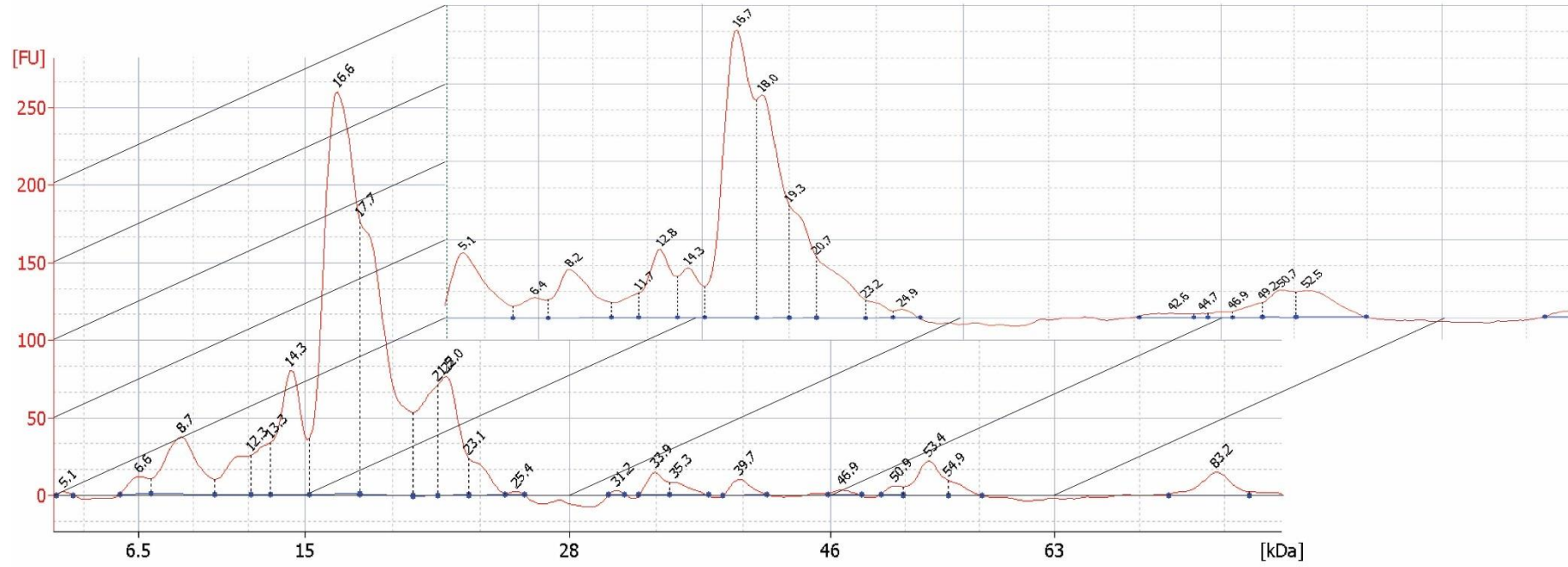


Nr. 7

Prieš ir po gryninimo densitogramos

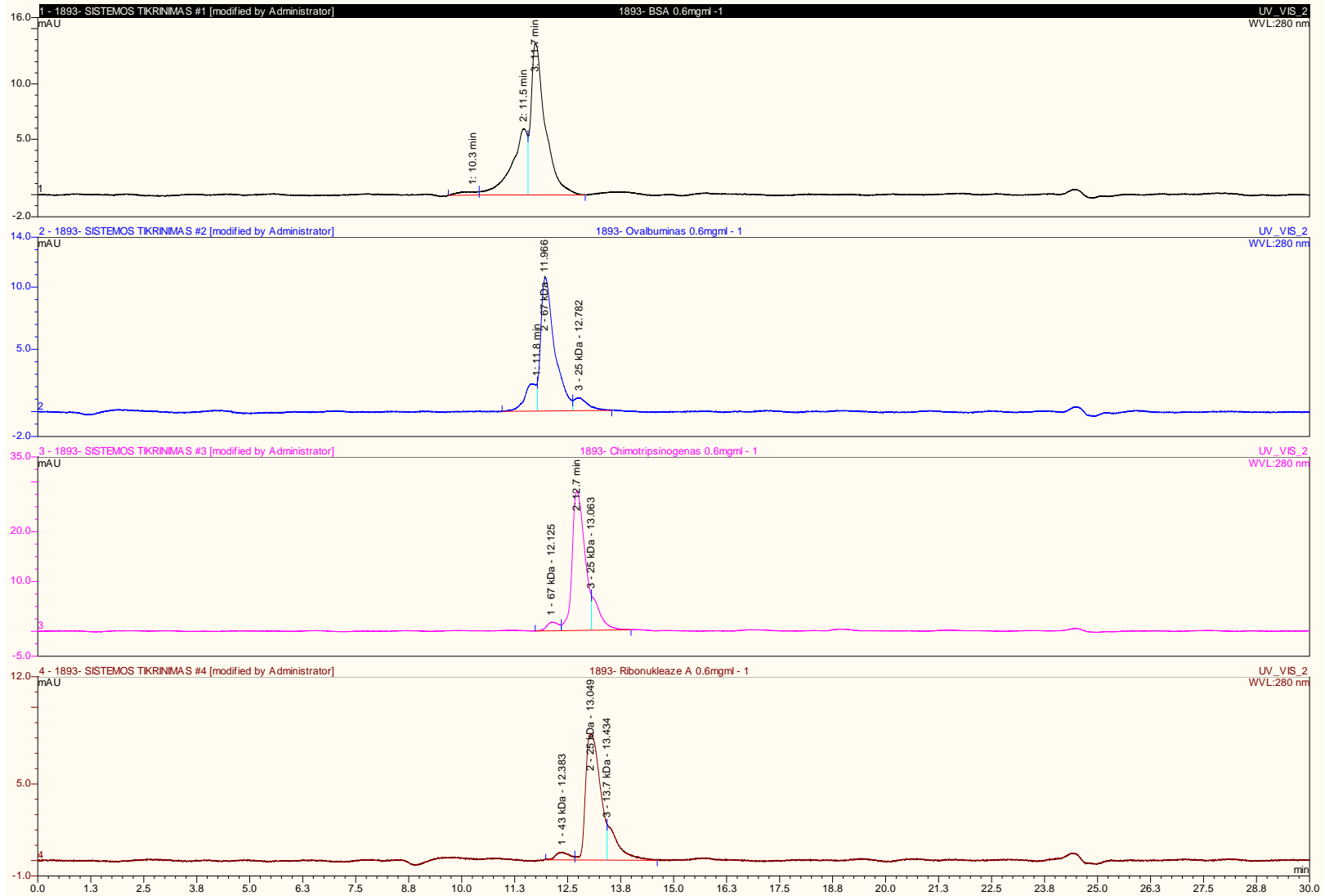
Po gryninimo

Prieš gryninimą



Nr. 8

Molekulinį sietų chromatografijos standartiniai baltymai

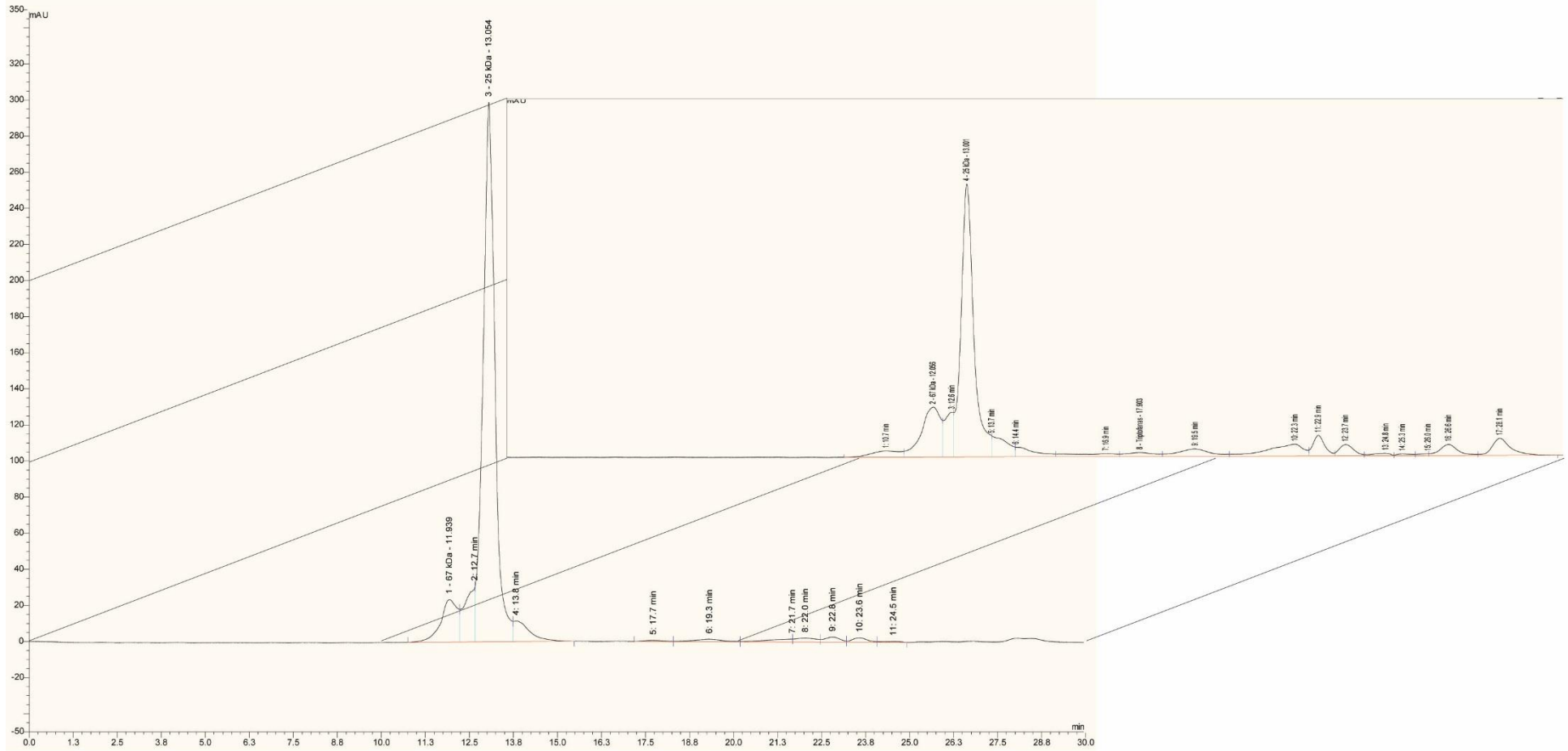


Nr. 9

Prieš ir po gryninimo densitogramos

Po gryninimo

Prieš gryninimą



Nr. 10

Produkto analizės sertifikatas

Produkto pavadinimas – Fikocianinas C

Šaltinis – melsvabakterė *Aphanizomenon flos – aquae*

Išvaizda – mėlynos spalvos milteliai

Sudėtis – 10 mM natrio fosfatinis buferinis tirpalas 7 pH 1 mM DTT; kiekis – 37,6 mg baltymų viename buteliuke (Bradford'o metodas)

Savybės – sugerties maksimumas 620 nm ilgio bangoje, fluorescencijos sužadinimas – 580nm, emisija – 640 nm ilgio bangose

Grynumas – sugerčių santykis (A_{620nm}/A_{280nm}) – 2,63,

produkto grynumas – 48,5% (kapiliarinė elektroforezė),

produkto grynumas – 59,44% (molekulinių sietų chromatografija)

Partijos numeris – 180505 1

Pagaminimo data – 2018 – 05 – 05

Stabilumas– stabilus pH intervale nuo 3,5 iki 7,5