

Магистерская  
Всесоюзная  
конференция  
по дезинтеграции  
микроорганизмов  
1979, 281-286  
Турция

- 281 -

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ  
ДЕЗИНТЕГРАЦИИ КЛЕТОК CHLORELLA SP. K

М.Г.Зверева, В.М.Ушаков, В.Е.Семененко  
Институт фотосинтеза АН СССР,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,  
Пушино-на-Оке;  
Институт физиологии растений им. Тимирязева АН СССР,  
Москва

Разработке методов дезинтеграции одноклеточных водорослей посвящен ряд исследований /1-7/. Из существующих в настоящее время методов разрушения клеток (физических, механических, химических, энзиматических) наибольший интерес, применительно к дезинтеграции клеток хлореллы, вызывают баллистические методы /8/.

Целью данной работы было сравнительное изучение эффективности различных методов дезинтеграции клеток хлореллы и определение их пригодности для извлечения структурных и растворимых белков.

Объектом исследования служил штамм *Chlorella* sp. K. Культуру выращивали в накопительном /9/ и проточном /10/ режимах в автотрофных условиях на среде Тамия с нитратным азотом при температуре 36-38°C, непрерывном барботировании воздухом, содержащим 1,7% CO<sub>2</sub>, и круглосуточном освещении. Средний размер клеток к концу культивирования составлял 3-4 мкм.

Для разрушения клеток были использованы различные баллистические, экструзионные и ультразвуковые методы дезинтеграции. В качестве эталонного метода был применен способ дезинтеграции со стеклянными микрошариками на модифицированном вибраторе Новотного /11/. Разрушение осуществляли при 6,5-7 тыс об/мин и соотношении объемов суспензии и микрошариков 1:1 (диаметр микрошариков 250-350 мкм). Этот метод обеспечивал разрушение до 95% клеток в течение 15 мин.

Для баллистической дезинтеграции был также использован планетарный вибратор, установленный в рефрижераторной centrifuge ЦР-I (температура не выше +6°C при 1000 об/мин). В качестве абразива использовали кварцевые микрошарики размером 200, 350, 900 мкм /8/. Соотношение объемов суспензии и микрошариков 1:1. Наряду с баллистической дезинтеграцией применяли методы экструзии клеток из замороженного и жидкого состояния под давлением порядка 2500-3000 кг/см<sup>2</sup>. Для этих целей были использованы модифицированные нами прессы Хьюза и Френча. Ультразвуковую дезинтеграцию осуществляли на диспергаторе УЗДН-I в режиме 22 кГц (экспозиция 15 мин при 0,8 А).

Оценку степени разрушения клеток проводили посредством прямого подсчета числа клеток под микроскопом в счетной камере до и после разрушения. Степень разрушения выражали в процентах разрушенных клеток. Выделение растворимых белков проводили в фосфатном буфере pH 7,4. Количество белка определяли по методу Лоури. Структурные белки выделяли из нерастворимого остатка после двухчасовой обработки детергентом (тритон X-100 в 0,067 М фосфатном буфере pH 7,4). Количество их определяли по поглощению при 280 нм на предварительно проградуированном спектрофотометре.

Выход растворимых и структурных белков из клетки в зависимости от процента разрушенных клеток исследовали при баллистической дезинтеграции на модифицированном вибраторе Новотного.

На рисунке на оси абсцисс - время разрушения в минутах.

А. 1 - процент разрушенных клеток (левая шкала); 2 - выход структурного белка, мг на 10<sup>8</sup> кл. исходной суспензии (правая шкала); 3 - выход хлорофилла, ΔE<sub>670</sub> на 10<sup>8</sup> кл. исходной суспензии (правая шкала); 4 - выход растворимого белка, мг на 10<sup>8</sup> кл. исходной суспензии (правая шкала).

Б. 1 - выход растворимого белка; 2 - выход структурного белка; 3 - сумма растворимого и структурного белка. Выход белков указан в процентах от сухого веса биомассы (правая шкала); 4 - процент разрушенных клеток.

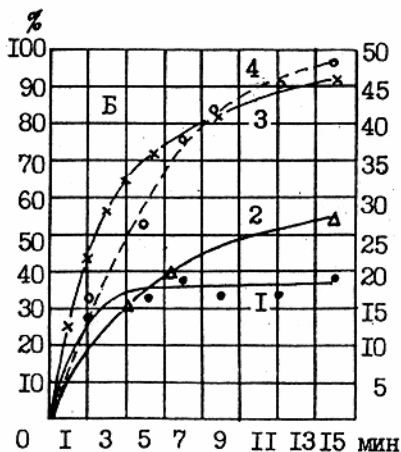
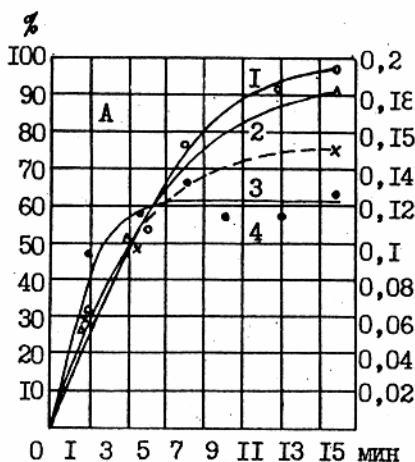


Рис. Характеристика связи между степенью разрушения клеток хлореллы и выходом структурного и растворимого белка.

Как видно из рисунка, выход растворимых белков в зависимости от степени дезинтеграции клеток значительно отличается от динамики выхода структурных белков. Растворимые белки (рис. А, кривая 4) практически полностью извлекаются из всех клеток уже через 7 мин дезинтеграции, когда количество разрушенных клеток составляет не менее 75% (рис. А, кривая 1), что свидетельствует, очевидно, о том, что оставшиеся 25% клеток достаточно повреждены и их оболочки не препятствуют выходу растворимых веществ. Структурные же белки (после обработки нерастворимого остатка детергентом) извлекаются в это время лишь на 77% (рис. А, кривая 2) и динамика выхода их прямо пропорциональна степени разрушения.

Сопоставление количеств ( в процентах от сухого веса биомассы) растворимого и структурного белка с общим (определяемым по Кьельдалю) его количеством

(рис. Б) показывает, что при 95-97% разрушенных клеток имеет место достаточно полное извлечение всех белков. Это явно следует из того, что сумма растворимый + структурный белок, как видно из рис. Б (кривая 3), составляет 46% от сухого веса биомассы, а содержание общего количества белка у хлореллы, как известно, составляет обычно 50%.

Исследование степени разрушения клеток хлореллы с применением модифицированных прессов Хьюза и Френча проводили при плотности культуры от  $107 \cdot 10^6$  до  $244 \cdot 10^8$  кл./мл.

Как видно из табл. I, процент разрушения заметно не зависит от плотности культуры и составляет около 70% при экструзии из твердого состояния и 90% - из жидкого. Следует отметить, что при экструзии из твердого состояния субклеточные частицы крупнее, чем при экструзии из жидкого состояния.

Таблица I

Влияние концентрации клеток *Chlorella* sp.К. на степень разрушения при различных методах дезинтеграции.

Методы дезинтеграции	Плотность культуры при разрушении ( $\times 10^6$ кл./мл)	Процент разрушенных клеток
Пресс Хьюза (экструзия из твердого состояния)	107	72,2
	382	73,0
	390	68,0
	743	69,7
	1415	72,0
	3463	68,2
Пресс Френча (экструзия из жидкого состояния)	107	90,9
	298	91,3
	920	88,3
	2330	86,5
	24400	88,5
Ультразвук	1490	46,3

При дезинтеграции ультразвуком процент разрушенных клеток составил лишь 46% (см. табл. I). При этом субклеточные частицы были очень мелкими.

Рефрижераторная планетарная мельница обладает тем преимуществом, что позволяет разрушить одновременно два образца при заданной температуре, что особенно важно, если необходимо выделение нативных биополимеров. Полное разрушение клеток достигается через 6 мин независимо от размера микрошариков. Вместе с тем степень дезинтеграции существенно зависит от диаметра шариков.

Как видно из табл. 2, при диаметре шариков в 200 мкм уже через 1 мин разрушается 91% клеток, тогда как при диаметре 900 мкм такое разрушение наступает лишь через 4 мин. Однако размер субклеточных частиц значительно больше при дезинтеграции с крупными микрошариками.

Таблица 2

Зависимость дезинтеграции клеток хлореллы от размера микрошариков и продолжительности разрушения на планетарной мельнице

Размер микрошариков, мкм	Плотность культуры при разрушении ( $\gamma^{-6}$ кл/мл)	Процент разрушенных клеток при экспозиции			
		1 мин	2 мин	3 мин	4 мин
200	160	90,6	96,9	98,8	-
350	160	86,3	93,8	97,8	-
900	160	51,6	67,8	83,4	86,3

Таким образом, все испытанные методы баллистической и экструзионной дезинтеграции обеспечивают эффективное разрушение клеток *Chlorella sp. K.* Наиболее эффективными из них с точки зрения степени разрушения (процента разрушенных клеток) являются баллистические методы. В сочетании с микро-

шариками малых размеров (200-300 мкм) они обеспечивают почти тотальное разрушение клеток и полный выход из них растворимых и структурных белков. При баллистической дезинтеграции с применением крупных микрошариков, а также при экструзии из замороженного состояния наблюдается минимальная фрагментация субклеточных структур. Эти способы дезинтеграции следует, по-видимому, использовать в тех случаях, когда желательна сохранение морфологической интактности органелл клетки.

Ультразвуковая дезинтеграция клеток хлореллы оказалась малоэффективной.

#### ЛИТЕРАТУРА

- I. French C.S., Milner H.W. In: "Methods in Enzymology", v. I, N.Y., 1955, p. 64.
- ✓ 2. Nedenskog G. et al., Biotechnol. Bioengineering, 11, 37 (1969).
3. Tetik K. Annual report of the laboratory of algology. CSAV, 1969, p. 66.
4. Vendlova J. Annual report of the laboratory of experimental algology and department of applied algology. CSAV, 1968, p. 147.
5. Гуляев Л.С., Левинсон М.С., Изв. СО АН СССР, сер. биол.-мед. наук, 15, 3, 63 (1968).
6. Роменов В.И., Евстигнеева З.Г., Кретович В.Л., Прикл. биохим. и микробиол., 1, 494 (1965).
7. Бойко Н.Н., Климкина Н.С., Кондратьев Ю.И., Вопросы питания, 5, 3 (1964).
8. Силакова А.Н., Ушаков В.М., Фихман Б.А., Прикл. биохим. и микробиол., 7, 3, 348 (1971).
9. Владимиров М.Г., Семенов В.Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М., Изд. АН СССР, 1962.
10. Семенов В.Е. и др. Управляемый биосинтез. М., "Наука", 1966.
- II. Novotny P., Nature, 203, 364 (1964).