

Andrzej HEIM, Marek SOLECKI

e-mail: heim@wipos.p.lodz.pl

Katedra Aparatury Procesowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Kinetyka dezintegracji komórek drożdży w młynie perełkowym

Wprowadzenie

Wiele związków zawartych we wnętrzu komórek mikroorganizmów ma komercyjne znaczenie w przemyśle spożywczym. Zalicza się do nich białka, aminokwasy, witaminy, enzymy i tłuszcze. Są one wykorzystywane do kształtowania i utrwalania cech środków spożywczych. Przykładowo katalaza stosowana jest do usuwania H_2O_2 po sterylizacji mleka, β -galaktozydaza do hydrolizy laktozy w mleku i serwatce, oksydaza glukozowa do usuwania tlenu z żywności a inwertaza jest składnikiem wyrobów cukierniczych.

W celu wyodrębnienia związków zawartych we wnętrzu mikroorganizmów niezbędne jest zniszczenie ścian komórkowych i błon cytoplazmatycznych. Na skalę przemysłową proces dezintegracji drobnoustrojów przeprowadzany jest między innymi w młynach perełkowych. Urządzenia te są zalecane zwłaszcza do rozrywania komórek grzybów mikroskopowych, glonów i niektórych bakterii. Kinetyka procesu na ogół opisywana jest liniowym równaniem różniczkowym pierwszego rzędu [1–5]. Wykazano jednak, że zwiększanie koncentracji początkowej drobnoustrojów w zakresie dużych stężeń zawiesiny powoduje znaczne odchylenia przebiegu procesu od liniowości [3, 5, 6]. Zmiana szybkości dezintegracji wynika ze zmian warunków prowadzenia procesu, spowodowanych dezintegracją mikroorganizmów [6, 7].

W pracy przedstawiono wyniki badań wpływu stężenia zawiesiny mikroorganizmów na kinetykę dezintegracji dla szerokiego zakresu zmian początkowej koncentracji komórek mikroorganizmów. Ich celem było opisanie przebiegu procesu dla bardzo małych stężeń biomasy i porównanie go z kinetyką uzyskiwaną dla uprzednio stosowanych koncentracji mikroorganizmów.

Urządzenie badawcze

Doświadczenia przeprowadzono w poziomym młynie perełkowym z mieszadłem wielotarczowym. Pojemność walcowej komory roboczej o średnicy wewnętrznej 80 mm wynosiła około 1 dm^3 . Mieszadło wyposażone było w sześć kolistych tarcz o średnicy 66 mm zamocowanych centrycznie na wale w odstępach 30 mm. Elementy komory roboczej i mieszadła były wykonane ze stali kwasoodpornej. Wnętrze młyna wypełniano w 80% kulkami o średnicy w zakresie od 0,8 do 1,0 mm. Były one wykonane ze szkła bezołowiowego o gęstości właściwej około 2500 kg/m^3 . Płaszcz chłodzący młyna zasilano 50% roztworem wodnym glikolu etylenowego schładzanego w termostacie do 2°C .

Materiał biologiczny

Dezintegrowano drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* wyprodukowane w Śląskiej Fabryce Drożdży „Polmos” w Wołczynie. Materiał biologiczny pochodził z jednej fermentacji. Warunki termiczne magazynowania materiału biologicznego w postaci kostek drożdżowych o masie 10 g określone były temperaturą 4°C .

Zakres badań

Fazę ciągłą zawiesiny stanowił 0,1% roztwór wodny β -merkaptopetanolu zawierający 0,01 M EDTA i 0,001M PMSF. Odczyn $pH = 7$ utrzymywany był za pomocą bufora fosforanowego.

Eksperymenty przeprowadzono w warunkach pracy okresowej (stały wsad) dla prędkości obrotowej mieszadła 2500 obr/min. Stężenie zawiesiny mikroorganizmów zmieniano w zakresie od 0,0005 do 0,20 g s.m./ml.

Podczas trwania doświadczeń wewnątrz młyna schładzano zasilając płaszcz chłodzący 50% roztworem wodnym glikolu o temp. 4°C .

Metodyka badań

Stężenie zawiesiny mikroorganizmów wyznaczano na podstawie spektrofotometrycznych pomiarów (*Lambda 11, Perkin Elmer GmbH*). Korzystano z wyznaczonej zależności pochłaniania światła o długości fali $\lambda = 540 \text{ nm}$ od koncentracji mikroorganizmów w cieczy wyrażonej suchą masą zawartą w objętości jednostkowej.

Do analizy stanu zniszczenia komórek mikroorganizmów w pobranych podczas dezintegracji próbkach zastosowano metodę pośrednią. Opartą ją na zmianach absorbancji światła A w supernatancie powodowanych roztwarzaniem w fazie ciągłej uwolnionych związków wewnątrzkomórkowych. Pomiarów wykonywano przy długości fali $\lambda = 260 \text{ nm}$. W pobliżu stosowanej długości fali charakterystyki spektralne kwasów nukleinowych RNA i DNA osiągają maksima. Supernatant otrzymano po odwirowaniu zawiesiny (3K30 B, *Braun Biotech International GmbH*) przez 20 min przy przyspieszeniu odśrodkowym 34000 g. Podczas tej operacji wewnątrz wirówki schładzano od temperatury 4°C . Absorbancję A przeliczano na ilość uwolnionych z komórek drożdży kwasów nukleinowych C .

Rezultaty i dyskusja

Stopień dezintegracji X komórek drożdży opisano wykorzystując wyznaczone ilości kwasów nukleinowych uwolnionych w trakcie procesu

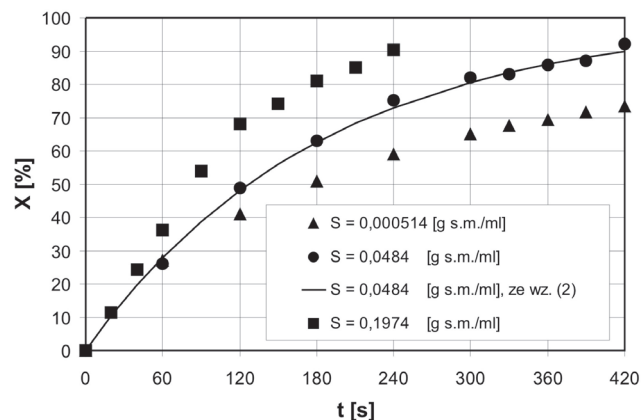
$$X = \frac{C}{C_m} 100\% \quad (1)$$

Kinetykę procesu, bazując na modelu opartym na wymianie masy, opisano równaniem różniczkowym pierwszego rzędu [3]

$$dC = k(C_m - C)dt \quad (2)$$

Maksymalną możliwą do uwolnienia przy danym stężeniu zawiesiny ilość kwasów nukleinowych C_m wyznaczano na podstawie pomiarów absorbancji wykonanych dla zakresu stopnia dezintegracji od około 98 do ponad 99,9% i równania (2) [8].

Liniowy przebieg procesu uzyskano tylko dla procesu dezintegracji mikroorganizmów w zawieszynie o stężeniu 0,05 g s.m./ml (Rys. 1) i 0,08 g s.m./ml. Uzyskane wartości współczynników korelacji wynosiły odpowiednio 0,9963 i 0,9995.



Rys. 1. Zmiany stopnia dezintegracji komórek drożdży w młynie dla wybranych stężeń zawiesiny

Dla wyższych koncentracji drożdży szybkość uwalniania związków wewnątrzkomórkowych zwiększa się wraz z upływem czasu trwania procesu. Odchylenie od liniowości zwiększa się na ogół wraz ze zwiększaniem stężenia zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami [3, 5, 6]. Uzyskana wartość współczynnika korelacji dla stężenia zawiesiny 0,1992 g s.m./ml wynosiła 0,9889. Zmiany stopnia dezintegracji dla tego przypadku przedstawiono na rys. 1.

Z kolei w przypadku najmniejszej wartości koncentracji drożdży (0,0005 g s.m./ml) podczas trwania procesu szybkość dezintegracji zmniejsza się (Rys. 1). Uzyskana wartość współczynnika korelacji wyniosła 0,9827.

Spodziewano się nieco innego rezultatu. Przy znikomej zmianie własności reologicznych fazy ciągłej i niewielkim stężeniu drobnych ścian komórkowych przebieg procesu powinien być liniowy, współczynnik korelacji najwyższy, a współczynnik regresji zbliżony do uzyskanego dla stężenia 0,05 g s.m./ml. Doświadczenie dla zawiesiny o stężeniu 0,0005 g s.m./ml powtarzano trzykrotnie uzyskując za każdym razem zbliżony przebieg procesu (Rys. 2).

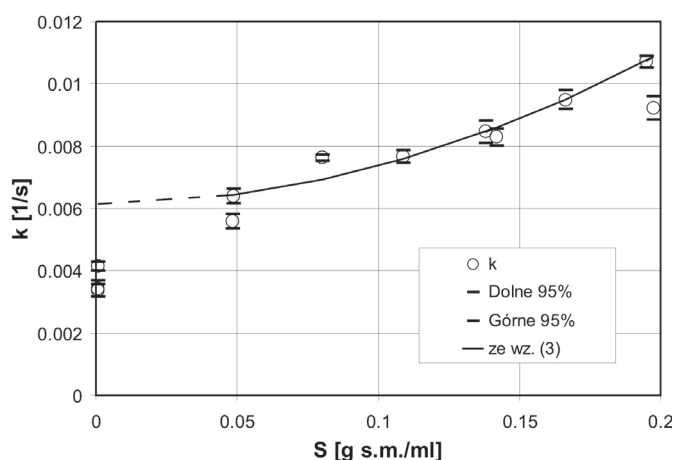
Można przyjąć, że stała szybkości procesu zwiększa się wraz ze zwiększaniem koncentracji komórek drożdży w zawieszynie. Wartości uzyskane dla skrajnych wartości stężenia różnią się ponad dwukrotnie.

Zmiany stałej szybkości dezintegracji następujące wraz ze zmianami stężenia zawiesiny komórek mikroorganizmów S opisano wzorem

$$k = 0,121S^2 + 0,0061 \quad (3)$$

zgodnym z zależnością prezentowaną we wcześniejszej pracy [9]. W opisie tym pominięto dane uzyskane podczas doświadczenia przeprowadzanego dla zawiesiny o najmniejszej koncentracji mikroorganizmów

Z porównania dokonanego na rys. 2 wynika, że otrzymane dla stężenia 0,0005 g s.m./ml rezultaty są około 30% mniejsze od przewidywanych na podstawie zależności (3).



Rys. 2. Zmiany stałej szybkości procesu dezintegracji komórek drożdży w zależności od stężenia zawiesiny (najmniejsza wartość stężenia $S = 0,000514$ g s.m./ml)

Wydaje się, że zmniejszanie szybkości procesu w trakcie trwania dezintegracji może być spowodowane zróżnicowanymi warunkami rozrywania komórek drożdży. Pomijając defekty i różnice w grubościach ścian komórkowych mogą one wynikać chociażby ze zróżnicowanej wielkości komórek drożdży. Na podstawie rozkładu wielkości cząstek w zawieszynie, sporządzonego za pomocą laserowego analizatora cząstek, można stwierdzić, że największe komórki są ponad czterokrotnie większe od komórek najmniejszych.

Z modelu zjawiskowego opartego na wymianie masy wynika zależność objętości $V_{\beta i}$ od wielkości mikroorganizmów [3]. Zależność pomiędzy objętością niedostępną dla danej komórki a objętością zawieszyny w młynie ujmują następujące wzory:

$$V = V_{\alpha} + V_{\beta} \quad (4)$$

$$V_{\beta} = \sum V_{\beta i} \quad (5)$$

Szybkość dezintegracji zależy od średnicy komórek i zwiększa się wraz z ich wielkością. Stała szybkości dezintegracji drożdży opisana jest poniższą zależnością [3]

$$k = \frac{uF}{V_{\alpha}} \quad (6)$$

Efektom dezintegrowania mikroorganizmów o znacznie różnicowanej wytrzymałości komórek może być nieliniowość przebiegu procesu. Efekt ten może być widoczny dla małych stężeń ze względu na brak zmian warunków prowadzenia procesu wynikających z dezintegracji mikroorganizmów. Badania procesu przeprowadzonego w homogenizatorze wysokociśnieniowym dla zawiesiny sporządzonej z mieszaniny komórek *Candida lipolytica* o odmiennych postaciach morfologicznych wykazały nieliniowość przebiegu dezintegracji [10].

Wnioski

1. Początkowa liczba mikroorganizmów w zawieszynie i ich stopień dezintegracji są parametrami wpływającymi na przebieg uwalniania związków z komórek.
2. Dla małych stężeń proces dezintegracji bardzo dobrze opisuje model liniowy.
3. W zakresie dużych stężeń szybkość dezintegracji zwiększa się wraz ze zwiększaniem stopnia dezintegracji, a proces ma przebieg nieliniowy.
4. Dla bardzo małych stężeń zawiesiny szybkość dezintegracji komórek mikroorganizmów jest znacznie wolniejsza od szybkości uzyskanych dla małych stężeń zawiesiny. Dla bardzo małych stężeń zawiesiny mikroorganizmów przebieg kinetyki procesu nie jest liniowy.

Oznaczenia

- A – absorbancja światła mierzona przy długości fali 260 nm
 F – pole powierzchni przemieszczenia zawiesiny z objętości V_{α} do objętości V_{β} , [m³]
 k – stała szybkości procesu, [1/s]
 n – prędkość obrotowa mieszańca, [obr/min]
 C – stężenie uwolnionego białka, [mg/ml]
 C_m – maksymalne stężenie uwolnionego białka, [mg/ml]
 S – stężenie zawiesiny mikroorganizmów, [g suchej masy/ml]
 t – czas trwania procesu, [s]
 u – średnia prędkość przemieszczania zawiesiny z objętości V_{α} do V_{β} , [m·s⁻¹]
 V – objętość młyna zajmowana przez zawieszynę, [m³]
 V_{α} – objętość młyna o warunkach bezpiecznych dla żywych komórek mikroorganizmów, [m³]
 $V_{\beta i}$ – pojedyncza, niedostępna dla żywych komórek mikroorganizmów objętość wytwarzana przez element wypełnienia młyna, [m³]
 X – stopień dezintegracji komórek, [%]

LITERATURA

- [1] J. A. Currie, P. Dunnill, M.D. Lilly: Biotechnol. Bioeng. **14**, 725 (1972).
- [2] F. Marffy, M. R. Kula: Biotechnol. Bioeng. **16**, 623 (1974).
- [3] A. Heim, M. Solecki: World Congress on Particle Technology 3, Brighton, p. 10, 1998.
- [4] Melendres, A. V., H. Honda, N. Shiragami, H. Unno: Bioseparation, 2, 231 (1991).
- [5] A. Heim, M. Solecki: Powder Technology, 105, 390 (1999).
- [6] A. Heim, U. Kamionowska, M. Solecki: J. Food Eng., **83**, 121 (2007).
- [7] M. Solecki, A. Heim, P. Owczarż, G. Kilbey, M.-L. Delia and C. Frances: Int. J. Appl. Mech. Eng., 10, 137 (2005).
- [8] A. Heim, M. Solecki: The 6th World Congress of Chemical Engineering, Melbourne 2001.
- [9] M. Solecki: The 5th International Conference for Conveying and Handlings of Particulate Solids, Sorrento, p. 6, 2006.
- [10] D. A. Whitworth: Biotech. Bioeng. **16**, 1399 (1974).

Praca wykonana w ramach projektu bad. W-10/12/2010/Dz. St.