

Marek SOLECKI

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

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

Wpływ stężenia zawiesiny na dezintegrację mikroorganizmów w młynie perełkowym

Wstęp

Związki pochodzące z wnętrza komórek mikroorganizmów znalazły komercyjne zastosowanie między innymi w medycynie, rolnictwie, przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym. W celu ich wyodrębnienia na ogół niezbędne jest zniszczenie ścian komórkowych i błon cytoplazmatycznych. W skali przemysłowej dezintegrację drobnoustrojów przeprowadza się między innymi w młynach perełkowych. Do opisu procesu często wykorzystywane jest liniowe równanie różniczkowe pierwszego rzędu [Currie i in., 1972; Marffy i Kula, 1974; Limon-Lason i in., 1979; Garrido i in., 1990; Melendres i in., 1991; Heim i Solecki, 2001].

Część autorów opublikowanych prac wskazuje jednak na występowanie zmian stałej szybkości procesu ze zwiększaniem stężenia zawiesiny mikroorganizmów [Currie i in., 1972; Marffy i Kula, 1974; Limon-Lason i in., 1979; Heim i Solecki, 2002]. Wynikają one z odchylenia przebiegu procesu od liniowości. Efekty te obserwowane są na ogół w zakresie dużych stężeń i dużych prędkości obrotowych mieszadła [Heim i Solecki, 2002; Heim i in. 2007]. Uzyskany na drodze teoretycznych rozważań matematyczny opis jego przebiegu dla przypadku braku wzajemnych oddziaływań pomiędzy obiektami materialnymi ma postać liniowego równania różniczkowego pierwszego rzędu [Solecki, 2011, 2012, 2013]. Odchylenia od liniowości są spowodowane wewnętrznymi zmianami warunków prowadzenia procesu zachodzące w wyniku jego przebiegu. Zwiększanie się chwilowych wartości stałej szybkości procesu, przy zastosowanym liniowym opisie, hipotetycznie wyjaśniono zwiększaniem objętości niszczenia komórek mikroorganizmów między kulistymi elementami wypełnienia w wyniku oddziaływania na nie sąsiednich komórek [Heim i in., 2007].

Zgodnie z ostatnio opublikowanymi rozważaniami teoretycznymi dotyczącymi procesu przekształcania, intensywność oddziaływania sąsiednich komórek podczas dezintegracji jest znacznie większa niż dotychczas sądzono [Solecki, 2011; Solecki, 2012]. Jest to spowodowane obecnością żywych mikroorganizmów tylko w obszarach dla nich bezpiecznych, a nie przestrzeni całej zawiesiny.

Celem prezentowanych doświadczeń było dokładne zbadanie odchylenia przebiegu procesu od liniowości wynikających ze znacznego zwiększenia początkowej liczby komórek w zawieszynie.

Materiał i metody

Aparatura doświadczalna

Proces dezintegracji mikroorganizmów przeprowadzono w młynie perełkowym własnej konstrukcji. Był on wyposażony w poziome mieszadło wielotarczowe. Pojemność komory roboczej wynosiła około 1 dm³. Szczegóły konstrukcyjne młyna wraz z jego parametrami geometrycznymi zostały podane we wcześniejszej pracy [Solecki, 2012]. Elementy komory roboczej i mieszadła były wykonane ze stali kwasoodpornej. Wnętrze młyna wypełniano w 80% kulkami o średnicy z zakresu od 0,8 do 1,0 mm. Były one wyprodukowane przez *Divisa Desenské Sklárný* z Desná ze szkła bezołowiowego o gęstości około 2500 kg/m³.

Materiał biologiczny

Badania dezintegracji komórek wykonano dla drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* wyprodukowanych w *Śląskiej Fabryce Drożdży Polmos* w Wołczynie. Materiał biologiczny pochodził z jednej fermentacji. Do laboratorium transportowano go po 36-godzinnym schładzaniu kończącym technologiczny proces produkcji. Materiał bio-

logiczny w postaci kostek o masie 10 g magazynowano w temperaturze 4°C. Wszystkie eksperymenty wykonano w ciągu 20 dni. W tym czasie badano jego morfologię [Heim i Solecki, 2001] oraz określano podatność komórek drożdży na dezintegrację w młynie perełkowym. Proces ten przeprowadzano w młynie przy prędkości mieszadła 1000 obr/min dla stężenia zawiesiny 0,05 g s.m./cm³.

Procedury analityczne

Zawiesinę mikroorganizmów o temperaturze około 4°C sporządzano przed eksperymentami. Fazę ciągłą zawiesiny stanowił 0,1% roztwór wodny β-merkaptotolanu zawierający 0,01 M EDTA i 0,001 M PMSF [Heim i Solecki, 2001]. Odczyn pH 7 utrzymywany był za pomocą buforu fosforanowego (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄). Stężenie zawiesiny mikroorganizmów wyznaczano na podstawie spektrofotometrycznych pomiarów (spectrophotometer *Lambda 11*, *Perkin Elmer GmbH*). Korzystano z wyznaczonej w zakresie prawa *Lamberta-Beera* zależności pochłaniania światła o długości fali λ = 540 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. Oparto ją na zmianach absorbancji światła *A* w supernatancie powodowanych roztworzeniem w fazie ciągłej uwolnionych związków wewnątrzkomórkowych. Pomiary wykonywano przy długości fali λ = 260 nm [Heim i Solecki, 2001]. W pobliżu stosowanej długości fali charakterystyki spektralne kwasów nukleinowych RNA i DNA osiągają maksimum. W celu określenia stopnia zanieczyszczenia supernatantu mierzono również absorbancje *A*₂₅₀ i *A*₂₈₀ odpowiednio przy długościach fal λ = 250 nm i λ = 280 nm. Supernatant otrzymywano po odwirowaniu zawiesiny w wirówce 3K30 B (*Braun Biotech International GmbH*) przez 20 min przy przyśpieszeniu odśrodkowym 34000g. Podczas tej operacji wnętrze wirówki schładzano od 4°C. W zależności od stężenia uwolnionych składników wewnątrzkomórkowych pomiar absorbancji wykonywano po 100-, 200- lub 400-krotnym rozcieńczeniu supernatantu.

Zakres badań

Eksperymenty przeprowadzono w warunkach pracy okresowej (stały wsad) dla prędkości obrotowej mieszadła 2500 obr/min. Płaszcz chłodzący młyna zasilano 50% roztworem wodnym glikolu etylenowego schładzanego w termostacie do temperatury 2°C.

Wykonano kilkanaście serii doświadczeń dla zawiesiny komórek drożdży o stężeniach z zakresu od 0,05 do 0,20 g s.m./cm³. Seria składała się z dwóch eksperymentów wykonywanych dla tego samego stężenia zawiesiny mikroorganizmów w różnych zakresach stopnia dezintegracji mikroorganizmów.

Procedury doświadczeń

Dla danego stężenia zawiesiny wykonywano dwa eksperymenty. Podczas ich trwania badano proces dezintegracji w różnych fazach. W trakcie pierwszego doświadczenia pobierano z młyna 10 próbek zawiesiny w czasie od *t*₀ = 0 s do *t*_k. Przewidywany na podstawie wcześniejszych badań stopień dezintegracji mikroorganizmów dla czasu *t*_k wynosił 90%. Uzyskane wartości absorbancji przeliczano na ilość czystego kwasu nukleinowego RNA uwolnionego podczas procesu z wnętrza komórek. Obliczenia wykonano zgodnie z następującym wzorem, po przyjęciu wartości średnich dla nukleotydów wyznaczonych przez *Herberta i in.* [1971]:

$$C = M_k \frac{Ar - A_0 n_0}{\epsilon l} \quad (1)$$

gdzie:

- C – ilość uwolnionego w wyniku dezintegracji kwasu nukleinowego RNA [g],
- M_k – masa molowa kwasu nukleinowego RNA [$\text{g}\cdot\text{M}^{-1}$],
- A – absorbancja światła o długości fali $\lambda = 260$ nm w supernatancie po czasie t trwania procesu [-],
- A_0 – absorbancja światła o długości fali $\lambda = 260$ nm w supernatancie po czasie $t = 0$ s trwania procesu [-],
- r – krotność rozcieńczenia [-],
- ε – stała spektrofotometryczna [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$],
- l – szerokość kuwety spektrofotometrycznej [cm].

Otrzymane wartości stężeń kwasów nukleinowych są tylko orientacyjne ze względu na zanieczyszczenie supernatantu innymi związkami wewnątrzkomórkowymi.

Do opisu procesu wykorzystano model dezintegracji mikroorganizmów opracowany na podstawie teorii przekształcania materii rozproszonej [Solecki, 2011; 2012; 2013]. Fenomenologię oparto na cyrkulacji i wymianie masy pomiędzy rodzajami przestrzeni różniącymi się właściwościami. W obszarze V_{ai} zachodzi intensywne mieszanie i panują warunki bezpieczne dla i -tej komórki. Zgodnie z przyjętym założeniem, niszczenie komórek następuje po ich przemieszczeniu z obszaru V_{ai} do V_{yi} . W modelu procesu dezintegracji przeprowadzanej w młynie perelfkowym założono możliwości pożądanego przekształcania materii w wyniku działania czynników fizycznych. Obszary V_{yi} wytwarzane są przez kulki wypełniające młyn. Z ich występowaniem może być związane pojawienie się objętości $V_{\beta i}$, w których niemożliwe jest istnienie żywych mikroorganizmów. Po uwzględnieniu metody analizy stanu dezintegrowanych mikroorganizmów matematyczny opis procesu ma postać równania

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

gdzie:

- C_m – maksymalna ilość kwasów nukleinowych możliwą do uwolniona z rozproszonych komórek mikroorganizmów w zawieszynie o określonym stężeniu [$\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$],
 - k – stała szybkości procesu [s^{-1}],
 - t – czas trwania procesu [s].
- Stałą szybkości procesu określa zależność

$$k = \frac{F}{\int V_{ai}} u \quad (3)$$

gdzie:

- F – pole powierzchni, przez które przemieszczane są mikroorganizmy z obszaru V_{ai} do obszaru V_{yi} [m^2],
- V_{ai} – objętość komory roboczej młyna bezpieczna dla i -tej komórki [m^3],
- u – średnia prędkość przemieszczania komórek mikroorganizmów z obszaru V_{ai} do obszaru V_{yi} [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$].

Wartości stałej szybkości procesu k_1 wyznaczono w wyniku poszukiwania takiej wartości C_{m1} , dla której współczynnik korelacji między zmiennymi $\ln[C_{m1}/(C_{m1} - C)]$ oraz t był maksymalny. Metoda ta jest często wykorzystywana do opisu procesu dezintegracji mikroorganizmów [Currie i in., 1974; van Gaver i Huyghebaert, 1990; Heim i Solecki, 2001; Solecki, 2012]. Linie regresji w postaci

$$\ln \frac{C_{m1}}{C_{m1} - C} = k_1 t \quad (4)$$

otrzymano w wyniku obustronnego scałkowania równ. (2), poprzedzonego rozdzielaniem zmiennych.

Stopień dezintegracji komórek mikroorganizmów X_1 określono ze wzoru

$$X_1 = \frac{C}{C_{m1}} \cdot 100\% \quad (5)$$

Z uzyskanego w oparciu o C_{m1} opisu procesu zależnością (4) wyznaczono przedział czasu Δt_s , w którym stopień dezintegracji zmienia się w zakresie od 98,0 do 99,2%. W trakcie drugiego eksperymentu pierwszą próbkę pobierano dla $t_0 = 0$ s, a pozostałych dziewięć w przedziale czasu Δt_s .

Maksymalną wartość stężenia kwasów nukleinowych C_{m2} , możliwych do uzyskania dla danego stężenia mikroorganizmów, wyznaczano z zależności

$$C_{m2} = \sum_{i=1}^9 \frac{C_i}{X_i} \cdot 100\% \quad (6)$$

Wartość C_{m2} wraz z danymi uzyskanymi w pierwszym doświadczeniu wykorzystano do ponownego opisu procesu linią regresji określoną zależnością

$$\ln \frac{C_{m2}}{C_{m2} - C} = k_2 t \quad (7)$$

Stopień dezintegracji komórek mikroorganizmów X_2 wyznaczony w oparciu o C_{m2} obliczano ze wzoru

$$X_2 = \frac{C}{C_{m2}} \cdot 100\% \quad (8)$$

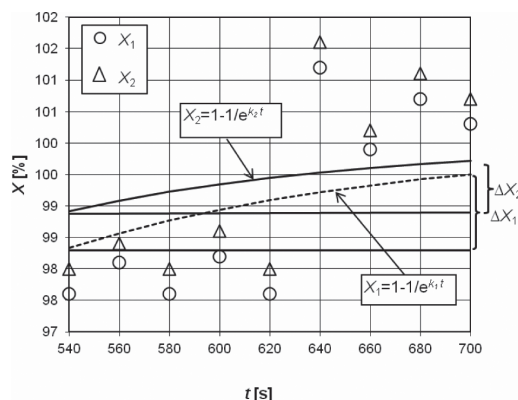
Wyniki i dyskusja

Na podstawie badań morfologicznych stwierdzono, że materiał biologiczny charakteryzuje występowanie pojedynczych komórek o kształcie zbliżonym do kulistego. Wielkość ich średnicy zawierała się w przedziale od około 2 do 8,5 μm . Występowały nieliczne komórki pączkujące (około 1 na 100 pojedynczych) i nieliczne komórki zabarwione błękitem metylenowym. Ogólna liczba komórek zawartych w jednostce masy określona za pomocą komory Thoma wynosiła $1,52 \cdot 10^{10}$. Zanieczyszczenia bakteriami nie przekraczały liczbowo 3%, a drożdżami dzikimi 2,3%.

Wyniki statystycznych analiz kinetyki procesu otrzymane tak pierwszą, jak i drugą metodą potwierdzają poprawność opisu przebiegu procesu liniowym równaniem różniczkowym pierwszego rzędu. Uzyskane współczynniki R^2 dla wyników poszczególnych doświadczeń opracowanych metodą pierwszą były nie mniejsze od 0,9930. Rezultaty otrzymane dla regresji liniowej między zmiennymi zależnościami (4) zamieszczono w tab. 1. Na ich podstawie można stwierdzić, że szybkość procesu zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia początkowego zawiesiny drożdży. Stała szybkości k_1 dla najwyższego stężenia zawiesiny jest wyższa o ponad 60% od uzyskanej dla najniższego stężenia. Odchylenia standardowe stałych szybkości procesu wyznaczonych metodą 1 zawierały się w przedziale od 0,61 do 1,51%. Na ogół wyższe wartości odchylenia standardowego uzyskiwano przy wyższych stężeniach zawiesiny.

Tab. 1. Wyniki badań modeli regresyjnych uzyskane dla wybranych serii przeprowadzonych doświadczeń

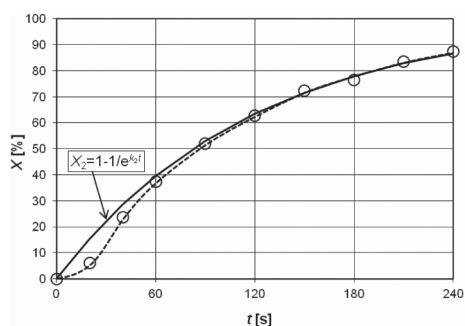
S	C_{m1}	k_1	R^2	C_{m2}	k_2	R^2
g s.m./cm ³	mg/cm ³	1/s	-	mg/cm ³	1/s	-
0,0491	2,422	0,004656	0,9930	2,374	0,004999	0,9914
0,0800	3,945	0,005274	0,9991	3,710	0,006480	0,9910
0,1111	5,671	0,005740	0,9985	5,086	0,007556	0,9868
0,1102	5,366	0,004847	0,9980	4,570	0,005661	0,9962
0,1431	7,380	0,005443	0,9977	6,715	0,006636	0,9933
0,1645	8,705	0,006342	0,9947	7,798	0,008406	0,9781
0,1974	8,808	0,007580	0,9960	8,450	0,008388	0,9946



Rys. 1. Zmiany stopnia dezintegracji komórek drożdży podczas drugiego doświadczenia serii wykonanej dla stężenia zawiesiny 0,1974 g s.m./cm³

Wartości stałych szybkości uzyskane drugą metodą również zwiększają się wraz ze zwiększaniem początkowej koncentracji komórek drożdży (Tab. 1). Są one od 7 do 39% wyższe od tych, które uzyskano w oparciu o zależność (4). Współczynniki R^2 otrzymane dla opisu procesu wzorem (7) są mniejsze od uzyskanych metodą pierwszą i mieszczą się w zakresie od 0,9781 do 0,9946 (Tab. 1). Mniej korzystne są również odchylenia standardowe stałej szybkości procesu k_2 zmieniające się w zakresie od 0,72 do 2,87%.

Wyższe wartości stałej k_2 od k_1 są spowodowane tym, że wyznaczone wartości C_{m2} są niższe od C_{m1} (Tab. 1). Stężenie kwasów nukleinowych C_{m2} w zawieszynie o stopniu dezintegracji komórek $X = 100\%$ wyznaczono w oparciu o wyniki doświadczenia zaplanowanego na podstawie stałej szybkości k_1 . Wartości C_{m1} i C_{m2} nie różnią się znacznie, ale nie wykazują typowego statystycznego rozproszenia wokół wartości rzeczywistej C_m . Współczynnik korelacji dla regresji liniowej między zmiennymi C_{m1} i S wyniósł 0,9873, a między C_{m2} i S wyniósł 0,9949. Wyższe wartości stałej szybkości k_2 od k_1 powodują, że przyrost komórek zdeintegrowanych ΔX_2 w przedziale czasu Δt jest mniejszy od przyrostu ΔX_1 (Rys. 2). Na podstawie analizy statystycznej rozproszenia punktów pomiarowych uzyskanych dla absorbancji A , A_{250} i A_{280} w drugim doświadczeniu poszczególnych serii stwierdzono, że tylko w 10 przypadkach stała szybkości k_1 korzystniej opisuje przebieg procesu. W pozostałej większości przypadków (32) mniejsze odchylenie standardowe, a zatem korzystniejszy opis procesu uzyskiwano dla stałej szybkości k_2 . Z powyższych rozważań wynika, że dla $X = 100\%$ wartości C_{m2} powinny być bliżej rzeczywistych wartości C_m .

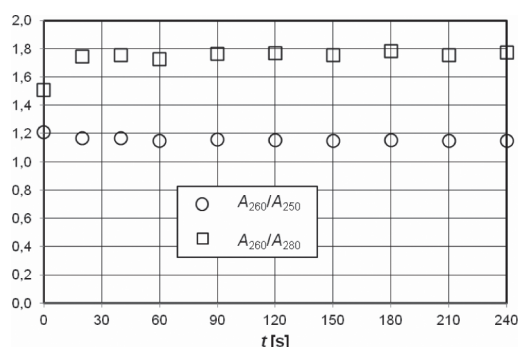


Rys. 2. Przebieg dezintegracji komórek drożdży podczas pierwszego doświadczenia serii wykonanej dla stężenia zawiesiny 0,1974 g s.m./cm³

Przebieg procesu dla stężeń zawiesiny bliskich 0,05 g s.m./cm³ bardzo dobrze opisują zależności zarówno (4), jak i (7).

Dla większych koncentracji początkowych komórek drożdży przebieg procesu wykazuje odchylenia od liniowości pomimo uzyskania wysokich wartości współczynnika R^2 . Wynikają one z korzystnego położenia końcowych punktów pomiarowych (dla $X > 50\%$).

Przy opisie procesu zależnością (7) niewielkie błędy pomiarowe wartości C dla X bliskich 100% powodują znaczne pogorszenie współczynników R^2 . Otrzymane wyniki wykazały dużą dokładność zastosowanej metodyki pomiarowej. Odchylenia przebiegu procesu od liniowości są tym większe im wyższe są stężenia zawiesiny. Najmniej korzystny opis dezintegracji zależnością (7) uzyskano dla największego stężenia



Rys. 3. Wpływ uwolnionych związków wewnątrzkomórkowych na absorbancję światła o długości fali $\lambda = 260$ nm w supernatancie otrzymanym w wyniku dezintegracji komórek drożdży w pierwszym doświadczeniu serii wykonanej dla stężenia zawiesiny 0,1974 g s.m./cm³

zawiesiny (Rys. 2). Rozważania dotyczące przestrzennego upakowania komórek potwierdzają intensyfikację ich wzajemnego oddziaływania spowodowanego zwiększaniem koncentracji mikroorganizmów dla stężeń większych od 0,08 g s.m./cm³ [Heim i Solecki, 2007; Solecki, 2011; 2012]. Analiza wartości zmian stosunków A/A_{250} i A/A_{280} w trakcie trwania procesu (Rys. 3) wyklucza zniekształcenie pomiarów spowodowane uwalnianiem związków wewnątrzkomórkowych mających maksima pochłaniania światła w pobliżu długości fali $\lambda = 260$ nm.

Wnioski

Przebieg procesu przy małych stężeniach zawiesiny drożdży, gdy intensywność wzajemnego oddziaływania między sąsiednimi komórkami jest pomijalnie mała, bardzo dobrze opisuje w całym zakresie liniowe równanie różniczkowe pierwszego rzędu.

Ze zwiększaniem stężenia zawiesiny następuje zwiększenie intensywności oddziaływania pomiędzy sąsiednimi komórkami prowadzące do odchylenia przebiegu procesu od liniowości.

Dokładność wyznaczenia maksymalnej wartości absorbancji ma duży wpływ na poprawność wyznaczenia przebiegu procesu.

Odchylenia od liniowości przebiegu procesu badanego na podstawie pomiarów absorbancji światła o długości fali 260 nm nie są spowodowane zniekształceniem pomiaru przez uwolnione wewnątrzkomórkowe związki posiadające maksima pochłaniania światła w pobliżu tej długości fali.

LITERATURA

- Currie J. A., Dunnill P., Lilly M.D., 1972. Release of protein from bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial agitator mill. *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 723-736. DOI: 10.1002/bit.260140504
- Garrido F., Banerjee U.C., Chisti Y., Moo-Young M., 1994. Disruption of recombinant yeast for the release of β -galactosidase. *Bioseparation*, **4**, 319-328
- Heim A., Kamionowska U., Solecki M., 2007. The effect of microorganism concentration on yeast cell disruption in a bead mill. *Journal of Food Engineering* **83**, 121-128. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2007.02.047
- Heim A., Solecki M., 2002. *Yeast disintegration in a bead mill with stable baffles*. 10th European Symposium on Comminution, Heidelberg, Germany, 2-5 September 2002, C5.3, 1-22
- Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E., 1971. Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiol.* **5B**, 209-344. DOI: 10.1016/S0580-9517(08)70641-X
- Limon-Lason J., Hoare M., Orsborn C.B., Doyle D.J., Dunnill P., 1979. Reactor properties of a high-speed bead mill for microbial cell rupture. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 745-774. DOI: 10.1002/bit.260210503
- Marffy F., Kula M.R., 1974. Enzyme yields from cells of brewer's yeast disrupted by treatment in a horizontal disintegrator. *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 623-634. DOI: 10.1002/bit.260160506
- Melendres A.V., Honda H., Shiragam N., Unno H., 1991. A kinetic analysis of cell disruption by bead mill. *Bioseparation*, **2**, 231-236
- Middelberg A.P.J., O'Neill B.K., Bogle I.D.L., Snoswell M.A., 1991. A novel technique for the measurement of disruption in high-pressure homogenization: Studies on *E. coli* containing recombinant inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.* **38**, nr 4, 363-370. DOI: 10.1002/bit.260380406
- Solecki M., 2011. *The release of compounds from microbial cells* [w:] Nakajima H. (Ed.), Mass Transfer - Advanced Aspects. InTech, Rijeka, (ISBN 978-953-307-636-2), 26, 595-618. (03.2013): <http://www.intechopen.com/articles/show/title/the-release-of-compounds-from-microbial-cells>.
- Solecki M., 2012. Mechaniczna dezintegracja komórek mikroorganizmów. *Zesz. Nauk. Politechniki Łódzkiej*, 1114, nr 421, 1-95
- Solecki M., 2013. *The theory of random transformation of dispersed matter*, [w:] Nakajima H. (Ed.), Mass Transfer, InTech, Rijeka, ISBN 980-953-307-531-5 (w druku).
- van Gaver D., Huyghebaert A., 1990. Optimization of yeast cell disruption-with a newly designed bead mill. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 665-671. DOI: 10.1016/0141-0229(91)90082-L

Praca została wykonana w ramach działalności statutowej W-10/1/2013/Dz.St.