

Uwalnianie białka z komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Streszczenie

Przedstawiono wyniki doświadczeń dezintegracji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w klasycznym młynie perełkowym. Badano efekt niszczenia komórek w zależności od stężenia zawiesiny zmienianego w zakresie od 0,05 do 0,20 g suchej masy/cm³ i prędkości obrotowej mieszadła zmienianej w zakresie od 1000 do 3500 obr/min. Stopień dezintegracji określano dwoma metodami: na podstawie absorbancji mierzonej przy długości fali $\lambda = 260$ nm i na podstawie ilości uwolnionego białka określanego metodą Lowry'ego. Wykazano zwiększanie się stałej szybkości procesu wraz ze zwiększaniem koncentracji początkowej komórek w zawieszynie.

Słowa kluczowe: dezintegracja mikroorganizmów, uwalnianie białka, kinetyka procesu

Oznaczenia

- B –ilość uwolnionego białka, [mg/cm³]
 B_m –maksymalna możliwa do uwolnienia ilość białka, [mg/cm³]
 C –ilość kwasów nukleinowych wyznaczona na podstawie absorbancji mierzonej przy długości fali $\lambda=260$ nm
 C_m –maksymalna możliwa do uwolnienia ilość kwasów nukleinowych
 k_1 – stała szybkości uwalniania białka, [1/s]
 k_2 –stała szybkości wyznaczona na podstawie pomiarów absorbancji, [1/s]
 n –prędkość obrotowa mieszadła, [obr/min]
 S –stężenie zawiesiny mikroorganizmów, [g suchej masy/cm³]
 t –czas trwania procesu, [s]
 X –stopień dezintegracji, [%]

Wprowadzenie

Wyodrębnienie związków chemicznych zawartych we wnętrzu mikroorganizmów wymaga zniszczenia ciągłości ścian komórkowych i błon cytoplazmatycznych w stopniu umożliwiającym wypłynięcie chronionej przez nie zawartości. Na skalę półtechniczną i techniczną proces dezintegracji drobnoustrojów przeprowadzany jest między innymi w młynach perełkowych. Do opisu procesu powszechnie stosowane jest liniowe równanie różniczkowe pierwszego rzędu pomimo często wykazywanych zmian stałej szybkości ze zmianą stężenia zawiesiny [Marffy, Kula 1974; Limon-Lason i in. 1979; Heim, Solecki 1999]. Badania procesu dezintegracji drożdży oparte na pomiarach absorbancji przy długości fali $\lambda=260$ nm wykazały, że powyższe zmiany stałej szybkości mogą wynikać z nieliniowego przebiegu procesu [Heim, Solecki 2001].

W pracy przedstawiono wyniki badań procesu dezintegracji drobnoustrojów w klasycznym młynie perełkowym. Ich celem było określenie wpływu stężenia

zawiesiny mikroorganizmów na przebieg procesu uwalniania białka i porównanie uzyskanych rezultatów z otrzymanymi w oparciu o pomiary absorbancji przy długości fali $\lambda=260$ nm.

Zakres badań

Urządzenie badawcze stanowił poziomy młyn perłkowy z mieszadłem wielotarczowym o pojemności komory roboczej około 1 dm³. Średnica wewnętrzna zbiornika wynosiła 80 mm. Tarcze mieszadła o średnicy 66 mm rozstawione były co 30 mm. Przestrzeń roboczą w 80% wypełniały kulki o średnicy 1 mm wykonane ze szkła bezołowiowego. Młyn zaopatrzony był w płaszcz chłodzący połączony z termostatem.

Do badań użyto pochodzących z jednej partii handlowych drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* produkcji Śląskiej Fabryki Drożdży Polmos w Wołczynie. Fazę ciągłą zawiesiny stanowił wodny roztwór zawierający 0,15 M NaCl i 4 mM K₂HPO₄ o pH w granicach 6,0-6,5. Materiał biologiczny magazynowano w temperaturze około 4°C przez okres nie dłuższy niż 3 tygodnie od daty produkcji.

Eksperymenty przeprowadzono w warunkach pracy urządzenia ze stałym wsadem (praca okresowa). Stężenia zawiesiny drożdży zmieniano w zakresie od 0,05 do 0,20 g s.m./cm³. Badania wykonano dla prędkości mieszadła z zakresu od 1000 do 3500 obr/min.

Metodyka i opracowanie wyników

Rozkład wielkości cząstek w zawieszynie komórek drożdży sporządzono laserowym analizatorem ziaren (analysette22, Fritsch GmbH). Do opracowania wyników pomiarów zastosowano metodę Fraunhofera.

Proces dezintegracji drożdży badano dwoma metodami pośrednimi. Supernatant otrzymywano po 15 minutowym wirowaniu próbek w wirówce (Sigma 3K30, B. Braun Biotech International GmbH) przy przyśpieszeniu odśrodkowym 20000g. W zależności od ilości uwolnionych związków wewnątrzkomórkowych stosowano 100, 200 i 400-krotne rozcieńczenia. Pierwsza metoda oparta była na pomiarach ilości uwalnianego w procesie białka. Do jego oznaczania wykorzystano metodę Lowry'ego [Lowry i in. 1951], stosując jako wzorzec wodny roztwór krystalicznej albuminy wołowej (Albumin A 9647, Sigma-Aldrich GmbH). Stopień dezintegracji komórek wyznaczano z zależności (1).

$$X_1 = \frac{B - B_0}{B_{\max} - B_0} \quad (1)$$

Zmiana stężenia białka w fazie ciągłej zawiesiny była często wykorzystywana do badania procesu dezintegracji. Metodę Lowry'ego [1951] stosowali [Marffy, Kula 1974] oraz [Limon-Lason i in. 1979] wykazując zależność stałej szybkości od stężenia zawiesiny. Z kolei Mogren i in. [1974] wykazali tą metodą brak wpływu koncentracji początkowej komórek na kinetykę uwalniania białka.

Proces dezintegracji badano również na podstawie spektrofotometrycznych pomiarów absorbancji światła o długości fali $\lambda = 260$ nm. Ze względu na niedogodność posługiwania się dwoma parametrami, korzystając z wyznaczonych przez Benthin i in. [1991] danych dla nukleotydów, absorbancję i krotność rozcieńczenia przeliczono na ilość czystego kwasu nukleinowego. Poczynione uproszczenie dla rozważanego zagadnienia nie ma negatywnych konsekwencji. Nie można jednak wyznaczonych ilości kwasów nukleinowych wykorzystywać do wyznaczania ich procentowego udziału w komórkach drożdży. Oparty na pomiarze absorbancji stopień dezintegracji komórek drożdży wyznaczano analogicznie jak dla metody pierwszej.

Czas trwania procesu planowano tak, aby dla około pięciu ostatnich z piętnastu pobranych w równych odstępach czasu próbek, występowały wahające się zmiany wyznaczanego parametru B lub C nie większe od błędu pomiarowego dopuszczalnego dla stosowanej metody. Na podstawie spełniających to kryterium danych wyznaczano wartości maksymalne B_{max} i C_{max} występujące po zdeintegrowaniu wszystkich komórek drożdży. W przypadku nie uzyskania w określonym eksperymencie wynikającej z ograniczonej czułości metody „stabilizacji procesu”, maksymalne wartości B_{max} i C_{max} wyznaczono z linii regresji pomiędzy wartościami zmiennych B_{max} i S oraz C_{max} i S uzyskanymi w pozostałych doświadczeniach. Poprawność uzyskanych rezultatów potwierdzano wynikami uzyskanymi dla procesu dezintegracji przeprowadzanego w czasie trzykrotnie dłuższym od stosowanego w typowych doświadczeniach.

Kinetykę procesu uwalniania białka opisano powszechnie stosowanym liniowym równaniem różniczkowym pierwszego rzędu w postaci (2).

$$\frac{dB}{dt} = k_1 \cdot (B_{max} - B) \quad (2)$$

Wartości stałej szybkości procesu k_1 uzyskano w wyniku przeprowadzenia liniowej regresji zgodnie ze wzorem (3) dla danych doświadczalnych uzyskanych przed „stabilizacją procesu”.

$$\ln D_1 = k_1 \cdot t \quad (3)$$

Zależności (3) otrzymywano odpowiednio z równania (2) po rozdzieleniu zmiennych, obustronnym scałkowaniu i przyjęciu oznaczenia (4).

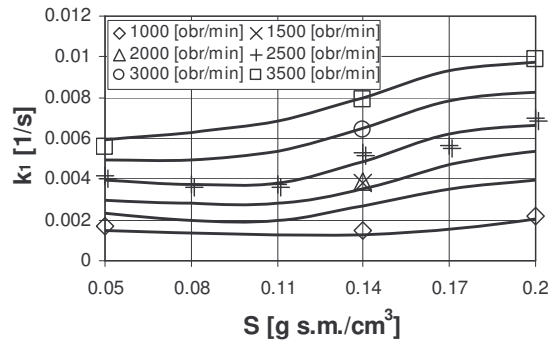
$$D_1 = \frac{B_{max}}{B_{max} - B} \quad (4)$$

Analogicznie wyznaczono stałą szybkości k_2 dla wyników otrzymanych metodą drugą.

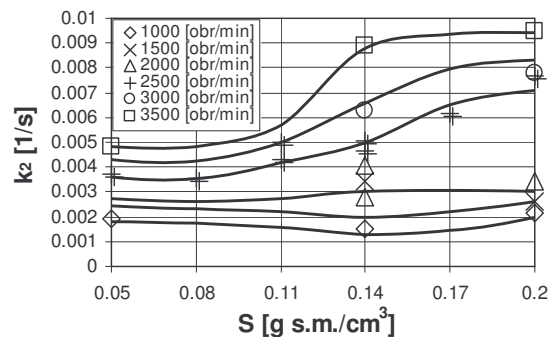
Rezultaty i dyskusja

Uzyskane obydwoema metodami wyniki doświadczeń potwierdziły istnienie zależności między efektem dezintegracji a stężeniem zawiesiny mikroorganizmów. Zarówno zmiany stałej szybkości k_1 (rys. 1), jak i zmiany stałej szybkości k_2 (rys. 2) są zbieżne z rezultatami uzyskanymi we wcześniejszych badaniach [Heim, Solecki 2001]. Dla procesu przeprowadzanego przy prędkościach obrotowych mieszadła większych od 2000 obr/min, efekt dezintegracji zwiększa się wraz ze zwiększaniem

początkowej koncentracji mikroorganizmów. Dla stężenia zawiesiny 0,20 g s.m./cm³ wartości stałej szybkości są około 50% większe od uzyskanych dla stężenia 0,05 g s.m./cm³. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach wykazano również, że przy prędkości mieszadła 1000 obr/min następuje zmniejszanie efektu dezintegracji ze zwiększaniem stężenia zawiesiny do 0,14 g s.m./cm³. Powyżej tej wartości szybkość procesu zwiększa się.



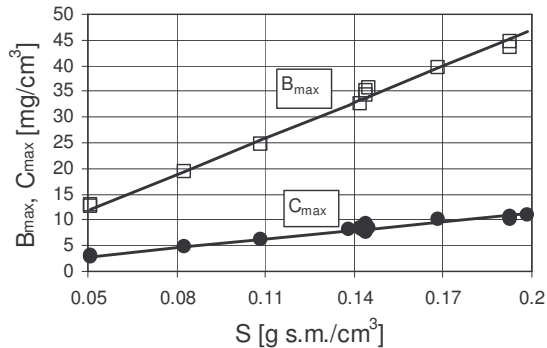
Rys. 1. Wpływ stężenia zawiesiny na stałą szybkości uwalniania białka
 Fig. 1. Influence of the suspension condensation on the constant rate of releasing the proteins



Rys. 2. Wpływ stężenia zawiesiny na stałą szybkości procesu wyznaczoną na podstawie pomiarów absorbancji o długości fali 260 nm
 Fig. 2. Influence of the suspension condensation on the constant rate of the process determined on the basis of the absorbance measurements with a 260-nm wavelength

Uzyskane współczynniki korelacji dla pierwszej metody zawierały się w przedziale 0,9315 – 0,9957 a dla drugiej metody w przedziale 0,9373 – 0,9994. W wszystkich przypadkach zakres zmian odchylenia standardowego stałych szybkości procesu, odpowiednio dla poszczególnych metod, określały przedziały: od 2,59 do 6,72% i od 0,72 do 7,19%. Znacznie korzystniejsze rezultaty uzyskano w wyniku statystycznego poszukiwania maksymalnej ilość białka B_{max} oraz maksymalnej ilość kwasów nukleinowych C_{max} według metodyki stosowanej między innymi przez van Gover i in. [1990]. Polega ona na wyznaczeniu takich wartości B_{max} i C_{max} , dla których wartości współczynników korelacji pomiędzy zmiennymi linii regresji są maksymalne. Ich zakres w przypadku metody pierwszej zawierał się w przedziale 0,9669 - 0,99780 a w przypadku metody drugiej 0,9800 - 0,9998. W przeprowadzonej

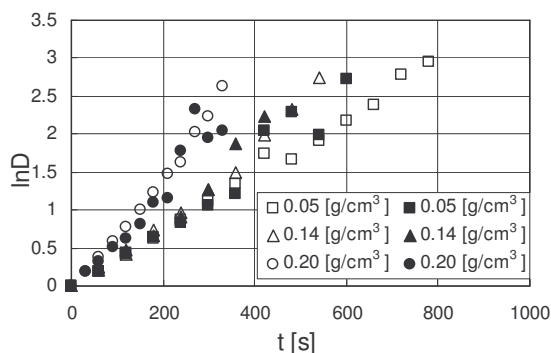
analizie uwzględniono dane pomiarowe uzyskane przed „stabilizacją procesu”. Zakres uzyskanych wartości odchylenia standardowego stałych szybkości procesu odpowiednio dla stosowanych metod określały przedziały 1,14 – 3,75% i 0,72 – 2,89%. W przypadku nieliniowego przebiegu procesu wartości B_{max} i C_{max} nie są jednak zgodne z wartościami rzeczywistymi [Heim, Solecki 2001]. Wartości B_{max} i C_{max} wyznaczone statystycznie dla przeprowadzonych doświadczeń są wyższe od około 2 do ponad 30% od wartości B_{max} i C_{max} . Badania korelacji prostoliniowej pomiędzy tymi parametrami a stężeniem zawiesiny potwierdziły istnienie znacznie silniejszego związku dla danych wyznaczonych doświadczalnie (rys. 3). Otrzymane dla nich współczynniki determinacji przy stosowaniu metody Lowry’ego [1951] wynosi 0,9959, a przy stosowaniu metody opartej na pomiarze absorbancji - 0,9516. Współczynniki korelacji uzyskane w wyniku badania zależności liniowej pomiędzy zmiennymi B_{max} i S oraz C_{max} i S wynosiły odpowiednio 0,9196 i 0,9321. Wyznaczone dla procesu długotrwałego dezintegrowania ilości kwasów nukleinowych i białka mieściły się w 95% przedziale ufności dla liniowej regresji pomiędzy B_{max} i C_{max} a S .



Rys. 3. Wpływ stężenia zawiesiny na wartości B_{max} i C_{max}

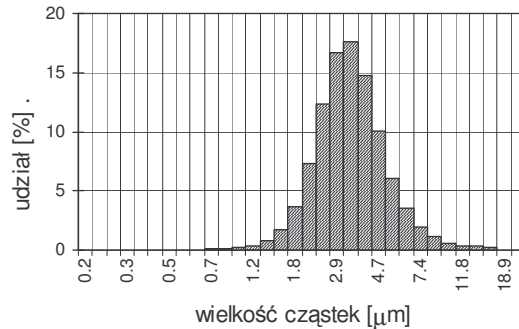
Fig. 3. Influence of the suspension condensation on the values B_{max} and C_{max}

Tak w przypadku badań analizowanych na podstawie pomiaru absorbancji jak i na podstawie ilości uwalnianego białka, dla części przeprowadzonych doświadczeń, uzyskano nieliniowy przebieg procesu (rys. 4). Dla najmniejszego stężenia zawiesiny kinetykę procesu bardzo dobrze opisuje liniowe równanie różniczkowe. Przy większej koncentracji mikroorganizmów występują odchylenia przebiegu procesu od liniowości. W początkowej jego fazie dane doświadczalne położone są znacznie poniżej linii teoretycznej wyznaczonej na podstawie regresji, a w końcowej fazie - powyżej. Rezultat ten jest tym wyraźniejszy, im większe jest stężenie zawiesiny. Zmniejszanie szybkości dezintegracji ze zwiększaniem początkowej koncentracji drobnoustrojów w zakresie od 0,05 do 0,11 g s.m./cm³ może być spowodowane zwiększaniem oporów wprowadzania komórek do objętości niszczenia wytwarzanej podczas rozcierania i walcowania [Heim, Solecki 2002]. Zwiększanie szybkości rozrywania ścian komórkowych w początkowym etapie procesu dla stężenia zawiesiny większego od 0,11 g s.m./cm³ może wynikać z blokowania mikroorganizmów w objętościach niszczących wytwarzanych podczas zderzeń kulek [Heim, Solecki 1999].



Rys. 4. Przebieg procesu dezintegracji ($n=2500$ obr/min, znaczniki zaczernione – uwolnione białko, znaczniki puste – pomiar absorbancji)
 Fig. 4. Course of the disintegration process ($n=2500$ rpm, black marks – released proteins, empty marks – measurement of absorption)

Średnia liczba komórek wyznaczona na podstawie liczby kolonii wyhodowanych na płytkach Petriego dla zawiesiny o stężeniu $0,05 \text{ g s.m./cm}^3$ wynosiła $17,1 \cdot 10^8$, a wyznaczona za pomocą komory Thoma dla zawiesiny o stężeniu $0,14 \text{ g s.m./cm}^3$ $7,06 \cdot 10^9$. Obydwie wartości potwierdzają opublikowaną teoretyczną zależność pomiędzy odległością geometrycznych środków sąsiednich drobnoustrojów a stężeniem zawiesiny drożdży i liczbą komórek [Heim, Solecki 1999]. Na podstawie rozkładu wielkości komórek drożdży (rys. 5) i liczby komórek zawartych w jednostkowej objętości potwierdzono, że wraz ze zwiększaniem stężenia zwiększa się intensywność wzajemnego oddziaływania mikroorganizmów [Heim, Solecki 1999]. Zwiększanie początkowej liczby drobnoustrojów w zawieszynie w zakresie małych stężeń ($0,05 - 0,11 \text{ g s.m./cm}^3$) powoduje gwałtowne zmniejszenie się odległości między geometrycznymi środkami sąsiednich drożdży. Dla zawiesiny o zawartości suchej masy $0,14 \text{ g s.m./cm}^3$ są one porównywalne ze średnicą największych komórek drożdży (rys. 1). Dla $0,20 \text{ g s.m./cm}^3$ liczba komórek o średnicy większej od obliczonej teoretycznej odległości między ich środkami, stanowi około 30% populacji. W rozważaniach przyjęto równomierne rozmieszczenie mikroorganizmów w węzłach sieci heksagonalnej zwartej. Podczas procesu dezintegracji nie występuje jednak zmniejszanie się stałej szybkości procesu wraz ze zmniejszaniem liczby komórek (rys. 5). Ponadto w przypadku dezintegrowania mikroorganizmów w zawieszynie o stężeniu $0,20 \text{ g s.m./cm}^3$ współczynniki regresji liniowej punktów pomiarowych pozostałych po odrzuceniu uzyskanych w początkowym okresie procesu, w którym osiągnięte zostaje 40% zmniejszenie populacji drożdży, są nieco większe od współczynnika uzyskanego dla wszystkich punktów pomiarowych. W przypadku udziału drożdży w niszczeniu sąsiednich komórek wartości stałych szybkości powinny być zbliżone do uzyskiwanych dla stężenia $0,05 \text{ g s.m./cm}^3$. Zwiększanie stałej szybkości w dalszym etapie procesu, wykazywane ze zwiększaniem stopnia dezintegracji komórek przy dużych stężeniach zawiesiny, może być spowodowane zmianą własności reologicznych zawiesiny. Są one następstwem między innymi uwalnianiem związków wewnątrzkomórkowych i mikromielenia drobnych fragmentów ścian komórkowych powodującego wzrost lepkości pozornej zawiesiny.



Rys. 5. Rozkład wielkości cząstek zawartych w zawiesinie drożdży
 Fig. 5. Distribution of molecule sizes contained in yeast suspension

Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2003-2006 jako projekt badawczy 4 T09C 050 24.

Bibliografia

Benthin S., Nielsen J., Villadssen J. 1991. A Simple and Reliable Method for the Determination of Cellular RNA Content, *Biotech. Tech.*, 5, 1, 39-42

Heim A., Solecki M. 1999. Disintegration of Microorganisms in Bead Mill with a Multi-Disc Impeller, *Powder Technology*, 105, 390-396

Heim A., Solecki M. 2001. Effect of the Concentration of Microorganism Suspension on Cell Disintegration in a Bead Mill, 6th World Congress of Chemical Engineering, Melbourne Australia

Heim A., Solecki M. 2002. Yeast Disintegration in a Bead Mill with Stable Baffles, 10th European Symposium on Comminution, ISBN 3-931384-40-3, Heidelberg Niemcy

Marffy F., Kula M.R. 1974. Enzyme Yields from Cells of Brewer's Yeast Disrupted by Treatment in a Horizontal Disintegrator, *Biotechnology and Bioengineering*, 16, 623-634

Mogren H., Lindblom M., Hedenskog G. 1974. Mechanical Disintegration of Microorganisms in an Industrial Homogenizer, *Biotechnology and Bioengineering*, 16, 261-274

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, *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 745-774

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275

van Gaver D., Huyghebaert A. 1990. Optimization of Yeast Cell Disruption with a Newly Designed Bead Mill, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 665-671

Releasing the proteins from yeast cells
Saccharomyces cerevisiae

Summary:

Results of disintegration of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the classical bead mill are presented. The disintegration effect was investigated depending on the concentration of cell suspension ranging from 0.05 to 0.20 g d.m./cm³ and rotational speed of the impeller ranging from 1000 to 3500 rpm. The disintegration was determined by two methods: on the basis of the measurement of absorbance ($\lambda = 260$ nm) of supernatant samples of the processed suspension, and on the basis of the quantity of released protein determined by the Lowry method. The process rate constant was shown to increase with the increase of the initial concentration of cells.

Key words: disintegration of microorganisms, releasing the proteins, kinetics of the process