

Rychlost dezintegrace kvasinek v závislosti na podmínkách kultivace

663.13
582.282.232

Ing. FRANTIŠEK MACHEK, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Při izolaci nebo uvolnění obsahu buňky je třeba rozrušit buněčnou blánu. Způsobů jak rozrušit obal buňky je několik. V laboratorním měřítku se nejvíce uplatňuje dezintegrace ultrazvukem, protlačování zmrazené suspenze buněk úzkou šterbinou, popřípadě drcení v balotinovém mlýnku. Pokud jde o zpracování většího množství suspenze mikroorganismů lze použít tlakový dezintegrátor (pracující na principu náhlé změny tlaku), nebo balotinový mlýn. Všeobecně jde o působení kavitace, střižného a smykového napětí, nárazu tělísek a náhlé změny tlaku.

Jednotlivé způsoby drcení se od sebe liší využitím vložené energie a ovlivněním uvolněného buněčného obsahu. Záleželo-li na jeho nezměněné biologické aktivitě, pak je vhodnější použít dezintegrace ve zmrazeném stavu či ultrazvukem. Pro průmyslové použití je však důležitější i využití energie a proto se používá dezintegrátorů pracujících na principu redukce tlaku nebo balotinových mlýnů.

V MBÚ provádíme výzkum drcení buněk jako rozhodující operaci při izolaci kvasničného proteinu [1]. Tato jednotková operace je v celém světě intenzivně studována, bohužel však pouze z hlediska rozdílných principů dezintegrátorů, jejich uspořádání nebo působení fyzikálních a fyzikálně chemických vlivů (teplota, pH). Samozřejmě, že pro konstrukci drtiče jsou poznatky tohoto typu rozhodující. Pro další intenzifikaci procesu při použití neměnného uspořádání drtiče, je však třeba znát vliv vlastností buněčné suspenze (fyziologického stavu buněk) na průběh dezintegrace.

Fyziologický stav buněk jsme charakterizovali růstovou rychlostí, dobou skladování bez dodávání živin a druhem limitu (C-limit a N-limit) při kontinuální kultivaci v chemostatu. Rychlost dezintegrace byla měřena množstvím uvolněné bílkoviny. Pro snadnější matematickou interpretaci byl vypočten poměr mezi maximálním množstvím uvolnitelné bílkoviny a zbytkovou hodnotou. Tento poměr exponenciálně závisí na čase. Rychlost drcení je charakterizována hodnotami konstant A, B v obecné rovnici 1.

$$\frac{R_m}{R_m - R} = A \exp. Bt \quad (1)$$

R_m je maximální množství uvolnitelné bílkoviny,
 R — skutečně uvolněná bílkovina v čase t .

1. Závislost rychlosti drcení na růstové rychlosti

Buňky *C. utilis* byly pěstovány na etanolu jako zdroji energie v chemostatu. Odebírali jsme vzorky při různých zředovacích rychlostech. Po separaci buněk a rozmíchání ve fosfátovém pufru jsme vychlazenou suspenzi drtili v laboratorním drtiči.

Konstanty A a B charakterizující rychlost drcení při různé růstové rychlosti jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Závislost rychlosti drcení na růstové rychlosti

růstová rychlost (h^{-1})	A	B
0,06	1,0484	0,20
0,1	1,1900	0,25
0,2	1,3170	0,13
0,3	1,4274	0,11

Nejlépe drtitelné jsou buňky rostoucí rychlostí $0,1 h^{-1}$. Buňky s vyšší i nižší růstovou rychlostí se drtí nejen hůře, ale průběh křivky popsaný rovnicí [1] s konstantami A a B neodpovídá v bodu 0 minut skutečnosti. Počáteční koncentrace proteinu v nedrceném materiálu je nižší než je dána konstantou A. Extrém (maximum) v závislosti drcení na růstové rychlosti v bodě $\mu = 0,1$, lze vysvětlit buď na základě změn chemického složení buněčné stěny, nebo na základě morfologických změn. Změny chemického složení buněčné stěny v závislosti na růstové rychlosti popsal u *Saccharomyces McMurrugh* a *Rose* [2]. Je zajímavé, že právě při rychlosti růstu $0,1 h^{-1}$ vzniká u kultury limitované glukózou extrémní rozložení glukánu v buněčných stěnách. Také aktivita β -fructofuranosidasy vykazuje značné maximum při $\mu = 0,1 h^{-1}$. I když ve složení buněčné stěny u *Saccharomyces* a *Candida* je jistý rozdíl, lze s určitou nepřesností očekávat i analogické změny ve složení buněčné stěny u *Candida utilis*. Také morfologické změny, zvláště velikost buněk, mohou do jisté míry ovlivnit rychlost drcení. Pro buňky různé velikosti je optimální různá velikost mlecích tělísek. Tento vztah vykazuje přímo úměrnou závislost. Protože velikost buněk se vzrůstající růstovou rychlostí stoupá [3] a velikost balotin je konstantní, je možné, že se vytvoří maximum při některé růstové rychlosti (= velikosti buněk). Porovnáme-li však rozdíly v hodnotě konstanty B při jednotlivých růstových rychlostech, potom závislost rychlosti drcení na velikosti balotin by musela být značná. Podle našich pozorování však poměr mezi velikostí kuliček a velikostí buněk nemá tak veliký význam, jak by vyplývalo z představy závislosti rychlosti drcení na velikosti buněk.

Všimneme-li si konstanty A, která více méně charakterizuje vliv počátečních podmínek a jejíž vzrůst je úměrný růstové rychlosti, je zřejmé, že zvláště při drcení buněk s vyšší růstovou rychlostí se v prvních okamžicích (interval 0—1 minut) uvolní určité množství proteinu rychleji, než odpovídá rychlost drcení v dalším průběhu procesu.

V bodu 0 minut jsou totiž kvasinky promyté a v supernatantu po centrifugaci lze prokázat jen nepatrný obsah bílkovin. Množství bílkoviny tedy neodpovídá hodnotě, kterou vykazuje křivka s konstantou A větší než 1. Vysvětlení je třeba hledat ve složení buněčné suspenze. Jediná frakce buněk, jejíž procento se vzrůstající rychlostí stoupá, je frakce pučících buněk. Lze předpokládat, že pučící buňky jsou v místě spojení náchylnější na destrukci. I kdyby tomu tak nebylo, stále ještě zůstává skutečností, že rozrušením kterékoliv buňky z dvojice, před vytvořením přepážky, se uvolní buněčný obsah obou jedinců. Tím by bylo možno vysvětlit prudké stoupnutí množství uvolněné bílkoviny na počátku dezintegrace, zatímco pozdější průběh odpovídá reakci 1. řádu.

2. Závislost rychlosti drcení na době skladování

Při průmyslové výrobě je důležité znát vliv doby skladování na fyziologický stav kvasinek. U *Saccharomyces cerevisiae* [6] po 7denním skladování slabě klesá drtitelnost a lze předpokládat, že průběh nebude jiný ani u *C. utilis*. Kvasinky pro naše pokusy byly odebírány při růstové rychlosti $0,2 h^{-1}$, odseparovány od média a resuspendovány do 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,1. Su-

šina skladované suspenze byla upravena na 4 % hm. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Závislost rychlosti drčení na době skladování

Dny skladování	A	B
0	1,317	0,1300
3*	1,300	0,0812
7	1,074	0,0256
14	1,056	0,0188

* doba hromadění dostatečného množství biomasy z kontinuální kultivace

Pokles rychlosti drčení je u *C. utilis* s prodlužující se dobou skladování značný. Tyto výsledky odpovídají pozorovaným skutečnostem při pokusech v poloprovozních zařízeních, kde při použití déle skladovaného kvasničného mléka je drčení kvasinek nedokonalé a tím se snižuje i výtěžnost. Změny rychlosti drčení jsou pravděpodobně způsobeny změnami struktury buněčné stěny.

3. Závislost rychlosti drčení na limitu fermentace

Složení buněčného obsahu není závislé pouze na růstové rychlosti, ale také na druhu limitu při kultivaci v chemostatu. Pokud tedy rychlost drčení je závislá na složení buněčné stěny a celé buňky vůbec, měl by se projevit rozdíl při jednotlivých růstových rychlostech dosažených za podmínek C-limitu a N-limitu.

Předcházející kapitoly pojednávaly o buňkách limitovaných zdrojem uhlíku. Pro objasnění vlivu chemického složení půdy byly konány pokusy s kulturou limitovanou zdrojem dusíku. Při kontinuální kultivaci v přebytku etanolu se zvyšuje tvorba kyseliny octové a etylacetátu. Také nárůst biomasy a růstová rychlost jsou nižší než odpovídá teorii. Snižování je pravděpodobně způsobeno inhibičním vlivem kyseliny octové. Zvyšuje se také množství lipidů.

Zvýšené množství lipidů a možná některé metabolity netypické pro buňky rostoucí v C-limitu měly za následek snížení celkového množství uvolnitelné bílkoviny na hodnotu 28–31 % hm. z celkového množství bílkoviny. Hodnota je závislá na růstové rychlosti. Také průběh drčení neodpovídá rovnici (1). Hodnota korelačního koeficientu se pro tuto funkci pohybuje v rozmezí 0,4 až 0,8 oproti 0,98–1,0 u buněk limitovaných zdrojem uhlíku. Protože konstanty A a B za těchto podmínek nebyly reprodukovatelné, bylo upuštěno od srovnání C- a N-limitů. Kultivace *C. utilis* za podmínek limitace dusíkem snad odpovídá kultivaci *C. lipolytica* na uhlovodících, jak ji popisuje Whitworth [5].

4. Závěr

Je jisté, že fermentační technologie nebude upravena tak, aby poskytla kvasinky s optimálním fyziologickým stavem pro izolaci bílkovin. Ekonomická kritéria fermentace jsou důležitější.

Sledování rychlosti drčení, jako funkce růstové rychlosti je zajímavé hlavně z hlediska mechanismu drčení a jeho využití pro další intenzifikaci procesu. Se stoupající růstovou rychlostí se stále více uplatňuje vliv konstanty A, jejíž hodnota stoupá. V bodě 0 minut, který je stejný pro všechny pokusy [jedná se o promytou suspenzi], se tedy zvětšuje odchylka od skutečnosti. Tento fakt je možno si vysvětlit tím, že průběh drčení mezi body $t = 0$ až 1 není popsán rovnicí (1) s příslušnými konstantami A a B, ale skutečná rychlost drčení je větší. Další průběh drčení odpovídá rovnici (1). Na základě těchto faktů předpokládáme tento průběh drčení.

V prvních okamžicích dezintegrace se uvolní protein z pučících buněk, jejichž tvar vytváří předpoklady pro

snadnější atakovatelnost komplexu dceřinná — mateřská buňka (odlomení pupenu a také fakt, že destrukcí jedné buňky se uvolní množství bílkoviny, které odpovídá více než jedné buňce). Na rychlost uvolňování bílkoviny v dalším průběhu drčení může mít vliv poměr mezi velikostí balotín a buněk nebo také změny ve složení buněčné stěny. Popřípadě kombinace obou faktorů.

Literatura

- [1] MACHEK F., FENCL Z., BERAN K., BĚHALOVÁ B., ŠILLINGER V. a KEJMAN J.: Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 4, 1974, p. 977
- [2] McMURROUGH J. a ROSE A. H.: Biochem. J. **105**, 1965, s. 189
- [3] VRANÁ D., LIEBLOVÁ J. a BERAN K.: Proc. 3rd Int. Spec. Symp. on Yeasts, Otaniemi/Helsinki, 1973, Part 2, 285
- [4] STEELE S. D. a MILLER J. J.: Canad. J. Microbiol. **20**, 1974, s. 1615
- [5] WHITWORTH D. A.: Biotechnol. Bioeng. **16**, 1974, s. 1399
- [6] HETHERINGTON P. J., FOLLOWS MAGGIE, DUNNILL P. a LILLY M. D.: Trans. Instn. Chem. Engrs **49**, 1971, s. 142

Machek, F.: Rychlost dezintegrace kvasinek v závislosti na podmínkách kultivace. Kvas. prům. **23**, 1977, č. 5, s. 105–107.

V práci je studován vliv růstové rychlosti, druhu limitu při kultivaci kvasinek v chemostatu a doby skladování promytých buněk na rychlost dezintegrace. Nejlépe jsou držitelné buňky rostoucí specifickou růstovou rychlostí $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$. S prodlužující se dobou skladování se snižuje rychlost dezintegrace. Přejedem z uhlíkatého limitu (limitováno zdrojem energie) na limit dusíkatý, nastává tvorba energeticky náročných produktů a rychlost drčení není lineární v čase. Tyto dva druhy limitů je obtížně vzájemně porovnat.

Махек, Ф.: Влияние условий разведения дрожжей на скорость их дезинтеграции. Квас. прум. **23**, 1977, № 5, стр. 105–107

Автор изучал влияние интенсивности роста и вида лимитирующего средства на темпы дезинтеграции клеток дрожжей разведенных в специальных аппаратах, т. е. химостатах. Одновременно изучалось также влияние продолжительности складирования промытых клеток. Было установлено, что быстрее всего измельчаются клетки, имеющие удельную скорость роста $\mu = 0,1 \text{ час}^{-1}$. Чем продолжительнее складирование, тем ниже скорость измельчения. Переход от углеродистых лимитирующих средств (органичивающим фактором является источник энергии) на азотистые вызывает образование энергоемких продуктов и зависимость между скоростью измельчения и временем теряет линейный характер. Поэтому весьма трудно сравнивать два приведенных вида лимитирующих средств.

Machek, F.: Effects of Cultivation Conditions Upon the Disintegration Rate of Yeast. Kvas. prům., Vol. **23**, 1977, No. 5, pp. 105–107.

The article deals with the effects of growth rate, sort of growth limiting substance and storing period of washed cells upon the disintegration of yeast cultivated in special propagators under controlled and stable conditions. Very easily can be disintegrated cells with specific growth rate $\mu = 0,1 \text{ hr}^{-1}$. The longer is the storing period the lower is the disintegration rate. The change over from carbonaceous growth limiting substance (the limiting factor being here the energy source) to nitrogenous one is accompanied by formation of energy consuming products and the disintegration rate — time relationship is therefore not linear. The two mentioned growth limiting substances cannot be therefore compared.

Machek, F.: Geschwindigkeit der Desintegration der Hefen in Abhängigkeit von den Kultivationsbedingungen.
Kvas. prům. **23**, 1977, No. 5, S. 105—107.

Der Artikel berichtet über das Studium des Einflusses der Wachstumsgeschwindigkeit, der Art des Limits bei der Kultivation der Hefen im Chemostat und der Lagerungszeit der ausgewaschenen Zellen auf die Geschwindigkeit der Desintegration. Am besten zerquetsch-

bar sind die Zellen, die die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ aufweisen. Mit der Verlängerung der Lagerungsdauer sinkt die Desintegrationsgeschwindigkeit ab. Mit dem Übergang von dem Kohlenstofflimit (begrenzt durch die Energiequelle) zu dem Stickstofflimit erfolgt die Bildung energetisch anspruchsvoller Produkte u. die Geschwindigkeit der Zerquetschung ist nicht linear in der Zeit. Es ist schwierig, die zwei Limitarten untereinander zu vergleichen.