

Ilona OLCZAK, Ireneusz GRUBECKI, Marek WÓJCIK

e-mail: igrubeck@utp.edu.pl

Katedra Inżynierii Chemicznej i Bioprosesowej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz

## Optymalizacja procesu permeabilizacji komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metanolem

### Wstęp

Współczesna biotechnologia umożliwia wytwarzanie wielu produktów w procesach biotransformacji z udziałem mikroorganizmów. Stosowanie biokatalizatorów w formie całych komórek jest często efektywniejsze od wyizolowanych enzymów. Występowanie oporów dyfuzji substratów i produktów przez błonę komórkową może jednak ograniczać aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych. W takim przypadku najlepszym rozwiązaniem jest przeprowadzenie procesu permeabilizacji, który zwiększa przepuszczalność błony komórkowej.

Permeabilizację komórek drożdży prowadzi się często metodami chemicznymi. Najczęściej stosuje się w tym celu detergenty [1–3] i rozpuszczalniki organiczne [4–6]. W niniejszej pracy badano efektywność metanolu jako czynnika zwiększającego przepuszczalność błony komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zawierających znaczne ilości katalazy. Enzym ten katalizuje rozkład nadtlenu wodoru na tlen i wodę. Wykorzystywany jest w formie natywnej do usuwania pozostałości  $H_2O_2$  w wielu procesach produkcyjnych. Istnieje także możliwość użycia do tego celu immobilizowanych komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [5,7].

Badania nad permeabilizacją komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* prowadzono dotychczas zwykle metodą tradycyjną, która polega na zmianie jednego, niezależnego czynnika przy niezmiennych wartościach pozostałych. Wykonanie typowej optymalizacji jednego parametru nie pozwala jednak na określenie jego korelacji z innymi. Procedura ta jest zazwyczaj czasochłonna i kosztowna. Wymaga dużej liczby doświadczeń i może prowadzić do błędnych wniosków. Na proces permeabilizacji chemicznej wpływa rodzaj czynnika permeabilizującego, czas jego działania oraz temperatura. Z drugiej strony wszystkie te czynniki mogą oddziaływać na aktywność enzymu wewnątrzkomórkowego i powodować interakcje między nimi. W związku z tym w prezentowanej pracy zastosowano metodę odpowiedzi powierzchniowej do optymalizacji procesu permeabilizacji komórek drożdży metanolem.

### Materiały i metody

W badaniach stosowano drożdże piekarskie (*Saccharomyces cerevisiae*), które zostały wyprodukowane przez *Lasaffre bio-corporation S.A.* w Wołczynie. Permeabilizacja komórek została przeprowadzona przy zastosowaniu metanolu. Drożdże piekarskie o masie 1 g rozprowadzano w 20 ml roztworu alkoholu o różnych stężeniach. Permeabilizację prowadzono we wstrząsarce przy 150 obr/min, utrzymując przy tym odpowiednią temperaturę. W określonych odstępach czasu pobierano pipetą automatyczną próbki zawiesiny komórek drożdży o objętości 0,5 ml i oznaczano w nich aktywność katalazy przez pomiar szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru. W tym celu w zlewce o pojemności 250  $cm^3$  przygotowano 100  $cm^3$   $H_2O_2$  o stężeniu 0,015 mol/ $dm^3$  z kilkoma kroplami buforu fosforanowego o pH = 7. Tak przygotowaną mieszaninę umieszczano na mieszadle magnetycznym i do niej wprowadzano 0,5  $cm^3$  zawiesiny komórek drożdży po permeabilizacji. Czterokrotnie w odstępach co 5 minut, pobierano 10  $cm^3$  roztworu reakcyjnego i oznaczano w nim stężenie nadtlenu wodoru metodą manganometryczną. Szybkość rozkładu nadtlenu wodoru opisuje w tych warunkach równanie kinetyczne pierwszego rzędu. Stałą szybkości reakcji  $k$  obliczano metodą całkową.

W celu określenia optymalnych wartości trzech parametrów, a mianowicie stężenia metanolu, temperatury i czasu trwania procesu wykorzystano planowanie kompozycyjne *Boxa* i *Wilsona* [8,9].

Zależność pomiędzy kodowanym a rzeczywistym wymiarem parametrów wpływających na proces wygląda następująco:

$$Zmienna\ kodowana = x_i = 2(X_i - Y_i)/R_i \quad (1)$$

gdzie  $X_i$  jest wartością naturalną  $i$ -tego parametru,  $Y_i$  to średnia wartość z przyjętego zakresu pomiarowego, natomiast  $R_i$  jest to zakres pomiędzy maksymalną a minimalną wartością. Poziomy dla parametrów eksperymentu zamieszczono w tabeli 1 uwzględniając także tzw. ramię gwiazdne.

Tab. 1. Wartości niezależnych zmiennych dla różnych poziomów planu rotatabilnego II rzędu

Wartości zależne	Symbole	Poziomy				
		-1,682	-1	0	1	1,682
temperatura [°C]	$x_1$	11,6	15	20	25	28
stężenie [%]	$x_2$	31,59	35	40	45	48,41
czas [min]	$x_3$	93	100	110	120	126

W prezentowanej pracy badania przeprowadzono zgodnie z planem rotatabilnym drugiego rzędu, przedstawionym w tabeli 2.

Tab. 2. Plan eksperymentu

N	Temperatura $x_1$ , [°C]	Stężenie $x_2$ , [%]	Czas $x_3$ , [min]	$k$ , [1/min]
1	-1	15	-1	0,0240
2	-1	15	1	0,0270
3	-1	15	-1	0,0208
4	-1	15	1	0,0763
5	1	25	-1	0,0616
6	1	25	1	0,0116
7	1	25	-1	0,0581
8	1	25	1	0,0092
9	1,682	28	0	0,0307
10	-1,682	11	0	0,0252
11	0	20	1,682	0,0274
12	0	20	-1,682	0,0123
13	0	20	0	0,0728
14	0	20	0	0,0560
15	0	20	0	0,0836
16	0	20	0	0,0831
17	0	20	0	0,0843
18	0	20	0	0,0823
19	0	20	0	0,0836
20	0	20	0	0,0825

Dla procesu z trzema zmiennymi niezależnymi model ma postać:

$$k = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i x_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \alpha_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

gdzie  $k$  to zależna zmienna wyjściowa (stała szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru) charakteryzowana przez kodowane, niezależne zmienne wejściowe ( $x_1$ : temperatura,  $x_2$ : stężenie metanolu,  $x_3$ : czas trwania procesu). Model pozwala na oszacowanie członu liniowego, kwadratowego i wzajemnego oddziaływania dla parametrów procesu. Statystyczne znaczenie współczynników regresji zostało zbadane za pomocą testu *t-Studenta*, natomiast równanie modelu poprzez test *Fischera*. Odpowiedź powierzchniową utworzono dla różnych wzajemnych oddziaływań pomiędzy każdymi niezależnymi dwoma parametrami przyjmując wartość trzeciego parametru jako stałą. Taka trójwymiarowa płaszczyzna pozwala na celne geometryczne odwzorowanie i dostar-

cza przydatnych informacji o zachowaniu się układu w granicach planu eksperymentu. Optymalny wymiar dla wybranych wartości otrzymano po rozwiązaniu równania regresji. Metodę odpowiedzi powierzchniowej zastosowano dla danych eksperymentalnych przy użyciu programów *Statistica* i *Mathcad 2001 Professional*.

## Wyniki i dyskusja

Przeprowadzono optymalizację procesu permeabilizacji w celu określenia optymalnych wartości niezależnych parametrów (stężenia metanolu, temperatury i czasu trwania procesu), dla których stała szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru osiągnie maksymalny wymiar. Na podstawie przedstawionego zestawienia wyników pomiarów dla doświadczeń w punktach wynikających z planu rotatabilnego drugiego rzędu (Tab. 2) wyznaczono współczynniki modelu matematycznego. Współczynniki te są skorelowane między sobą jak i z wyrazem wolnym równania  $\alpha_0$ . W celu określenia dopasowania modelu matematycznego wykorzystano analizę wariancji, która określiła znaczący wpływ członów liniowych, kwadratowych i interakcji na wartość stałej  $k$  przy poziomie istotności 5%.

Istotność poszczególnych współczynników zmiennych procesowych w równaniu kwadratowym określono za pomocą testu *t-Studenta* oraz poziomu istotności  $p$  (Tab. 3).

Tab. 3. Wyniki estymacji współczynników równania wraz ze statystyczną ich oceną, przy poziomie ufności 95%

	Estymowane współczynniki	$S$	$t$	$p$
$\alpha_0$	0,083173	0,003318	25,0672	0,000000
$\alpha_1$	0,000110	0,002201	0,0499	0,961205
$\alpha_2$	-0,001092	0,002201	-0,4961	0,630556
$\alpha_3$	0,005016	0,002201	2,2784	0,045908
$\alpha_{11}$	-0,019226	0,002143	-8,9732	0,000004
$\alpha_{22}$	-0,022090	0,002143	-10,309	0,000001
$\alpha_{33}$	-0,006349	0,002143	-2,9631	0,014213
$\alpha_{12}$	-0,019680	0,002876	-6,8420	0,000045
$\alpha_{013}$	-0,006497	0,002876	-2,2590	0,047451
$\alpha_{23}$	0,006728	0,002876	2,3391	0,041405

Im większy zakres wartości bezwzględnej  $t$  i mniejsza wartość  $p$ , tym większa istotność danego współczynnika równania.

Podsumowanie regresji wskazuje wpływ parametrów procesu na poziomie istotności 5% ( $p < 0,05$ ) dla wszystkich członów kwadratowych i interakcji oraz linowego składnika równania opisującego czas trwania procesu.

Równanie uzyskało wymiar współczynnika determinacji  $R^2 = 0,979$  (wartość  $R^2 > 0,75$  określa trafność modelu opisującego proces). Wartość ta zapewnia zadowalające dopasowanie modelu kwadratowego z interakcją dla danych eksperymentalnych i wskazuje, że 97,9% zmienności w odpowiedzi może być wyjaśnione za pomocą modelu.

Równanie dopasowanego modelu po usunięciu współczynników nieistotnych ma postać:

$$k = 0,083173 + 0,005016x_3 - 0,019226x_1^2 - 0,022090x_2^2 - 0,006349x_3^2 - 0,19680x_1x_2 - 0,006497x_1x_3 + 0,006728x_2x_3 \quad (3)$$

gdzie:  $k$  – stała szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru,  $x_1$  – temperatura,  $x_2$  – stężenie,  $x_3$  – czas.

Wykres obrazujący odpowiedź powierzchniową dla stałej szybkości rozkładu nadtlenu wodoru jako funkcji temperatury i stężenia (przy stałym czasie 110 min – punkt centralny) wskazuje na stopniowy wzrost stałej szybkości rozkładu, aż do stężenia metanolu – 40% i temperatury 20°C (Rys. 1). Spadek wartości  $k$  widoczny jest przy dalszym wzroście obu parametrów. Można to tłumaczyć tym, iż stężenia metanolu i temperatura procesu wzrasta do pewnej wartości krytycznej, gdzie możemy zaobserwować maksymalną wartość stałej szybkości rozkładu nadtlenu wodoru. Po przekroczeniu punktu centralnego obserwujemy zależność, że im wyższe stężenie rozpuszczalnika tym niższa wartość stałej  $k$ , co może być spowodowane dezaktywacją katalazy przy wysokich stężeniach alkoholu. W zakresie niskich stężeń, występuje niski sto-

pień permeabilizacji, który można tłumaczyć niedostateczną ilością rozpuszczalnika.

Zależność stałej  $k$  od temperatury i czasu trwania procesu przy stałym stężeniu metanolu wynoszącym 40% przedstawia rys. 2. Z wykresu możemy odczytać, iż rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę drożdżową wzrasta wraz ze wzrostem temperatury w jakiej prowadzono proces permeabilizacji komórek drożdży. Po przekroczeniu temperatury 20°C i po 110 minutach płaszczyzna odpowiedzi załamuje się i opada co może być spowodowane dezaktywacją enzymu w wyższych temperaturach i przy dłuższym czasie permeabilizacji. Podobnie rys. 3 przedstawia wpływ stężenia metanolu i czasu permeabilizacji (w temperaturze 20°C) na stałą szybkości rozkładu nadtlenu wodoru.

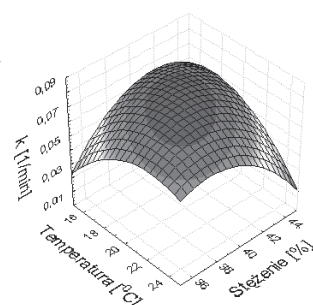
Optymalizacja warunków procesu permeabilizacji, przy zastosowaniu technik numerycznych pozwoliła na określenie odpowiednich wielkości parametrów przy których wartość stałej szybkości rozkładu nadtlenu wodoru jest najwyższa. Maksymalna wartość  $k_{max}$  wynosi 0,08445 1/min dla temperatury 19,2°C, stężenia metanolu 40,6% i po upływie 115 minut. Podczas wykonywania eksperymentu zaobserwowano, że stężenie metanolu i temperatura procesu są czynnikami krytycznymi (znamionowymi) dla procesu permeabilizacji komórek drożdży.

## Podsumowanie

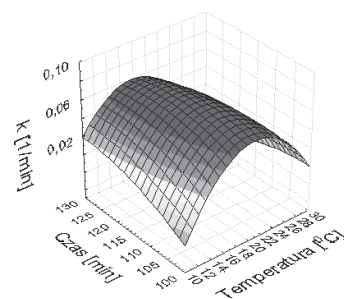
Dobór metody odpowiedzi powierzchniowej do optymalizacji procesu permeabilizacji okazał się trafny i pozwolił na wyznaczenie współoddziaływania pomiędzy parametrami procesu. Optymalnymi warunkami dla przeprowadzonego eksperymentu okazały się: stężenie metanolu 40,6%, temperatura 19,2°C i czas 115 min, dla których stała szybkości reakcji rozkładu nadtlenu wodoru  $k_{max} = 0,08445$  1/min. Wyznaczona niezależnie stała  $k$  dla niepoddanych permeabilizacji komórek drożdży miała wartość ponad dziewięciokrotnie mniejszą. Metanol jako czynnik permeabilizujący dał zatem lepszy rezultat niż toluen, który doprowadził jedynie do sześciokrotnego wzrostu aktywności katalazy w komórkach drożdży [5].

## LITERATURA

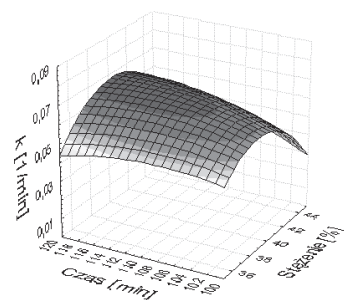
- [1] J. Abraham, S.G. Bhat: *Microbiol. Biotechnol.* **35**, 799 (2008).
- [2] A.V. Presecki, B. Zelic, D. Vasic-Racki: *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 605 (2007).
- [3] G. Kaur, P.S. Panesar, M.B. Bera, H. Kumar: *Bioprocess Biosyst. Eng.* **32**, 63 (2009).
- [4] P.S. Panesar: *Biochem. Eng. J.* **39**, 91 (2008).
- [5] B.S. Kubal, S.F. D'Souza: *J. Biochem. Biophys. Methods* **59**, 61 (2004).
- [6] J.A. Moreno, C.A. Ruiz, J. Catalan, M.A. Galan: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 321 (2004).
- [7] I. Safarik, Z. Sabatkova, M. Safarikova: *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7925 (2008).
- [8] G.E.P. Box, N.R. Draper: *Empirical Model – Building and Response Surfaces*. Wiley, New York 1987.
- [9] D.C. Montgomery: *Design and Analysis of Experiments*. Wiley, New York 2001.



Rys. 1. Wpływ stężenia metanolu i temperatury na stałą szybkości reakcji rozkładu  $k$



Rys. 2. Wpływ temperatury i czasu trwania permeabilizacji na stałą szybkości reakcji rozkładu  $k$



Rys. 3. Wpływ stężenia metanolu i czasu trwania permeabilizacji na stałą szybkości reakcji rozkładu  $k$