

Ilona TRAWCZYŃSKA, Marek WÓJCIK, Ireneusz GRUBECKI

e-mail: ilona.trawczynska@utp.edu.pl

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

Permeabilizacja komórek drożdży piekarskich - skuteczność procesu w warunkach ustalonych

Wstęp

Biokatalizatory w formie całych komórek drożdży są często stosowane w bioprosesach [Bialecka-Florjańczyk i Majewska, 2006]. W przeciwieństwie do roztworów enzymów możliwe jest ich wydzielenie ze środowiska reakcji, a następnie ponowne użycie. Proces permeabilizacji pozwala na poprawę aktywności tych biokatalizatorów. Polega on na wykorzystaniu różnych czynników powodujących zwiększenie przepuszczalności membran i ścian komórkowych mikroorganizmów [Sekhar i in., 1999; Chow i Palecek, 2004; Presecki i Vasić-Racki, 2005; Olczak i in., 2010].

Wcześniej badania wykazały, że zastosowanie etanolu, 1-propanolu lub 2-propanolu w permeabilizacji drożdży piekarskich pozwala na wzrost aktywności katalazy odpowiednio 47-, 40- i 60-krotnie [Trawczyńska i Wójcik, 2014; Trawczyńska i Wójcik, 2015]. Katalaza posiada zdolność do rozkładu nadtlenu wodoru do wody i tlenu. Dzięki temu biokatalizator w formie permeabilizowanych komórek drożdży o zwiększonej aktywności katalazy może być wykorzystywany w oczyszczaniu ścieków oraz unieszkodliwianiu odpadów przemysłowych.

W niniejszej pracy w oparciu o odpowiednie modele matematyczne przeprowadzono symulację skuteczności permeabilizacji komórek drożdży piekarskich dla ustalonych wartości temperatury procesu w celu umożliwienia łatwego prognozowania aktywności wewnątrzkomórkowej katalazy dla narzuconych temperatur.

Optymalne warunki permeabilizacji komórek drożdży piekarskich

Procesy permeabilizacji komórek drożdży piekarskich alkoholami podano optymalizacji. Wyznaczone wartości temperatur T , stężenia alkoholu S i czasy trwania t procesu odpowiadające najwyższym aktywnościom katalazy A_{opt} przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Warunki optymalne dla permeabilizacji drożdży piekarskich alkoholami

Zastosowany alkohol	Aktywność optymalna [U·g ⁻¹]	Temperatura [°C]	Stężenie alkoholu [%]	Czas trwania procesu [min]
Etanol	5070	14,9	52,6	48
1-Propanol	4310	10,3	24,2	41
2-Propanol	6310	15	55	40

Modele matematyczne

Modele matematyczne określające zależność aktywności katalazy od parametrów procesu permeabilizacji, mają postać równań kwadratowych z trzema zmiennymi (Tab. 2). Można je wykorzystać do symulacji procesu permeabilizacji w zakresie zbadanych parametrów T , S i t (Tab. 3).

Tab. 2. Modele matematyczne dla permeabilizacji drożdży piekarskich

Zastosowany alkohol	Model matematyczny
Etanol	$A_E = 4919 + 545 S_E + 464 t_E - 1574 T_E^2 - 1405 S_E^2 + - 570 t_E^2 - 512 T_E \cdot S_E$
1-Propanol	$A_{1P} = 4116 + 851 \cdot S_{1P} - 1032 T_{1P}^2 - 1059 \cdot S_{1P}^2 + - 386 \cdot t_{1P}^2 - 378 \cdot T_{1P} \cdot S_{1P} - 358 \cdot S_{1P} \cdot t_{1P}$
2-Propanol	$A_{2P} = 5784 + 477 T_{2P} + 1327 S_{2P} - 1343 T_{2P}^2 + - 960 S_{2P}^2 - 473 t_{2P}^2 - 675 T_{2P} S_{2P} - 484 S_{2P} t_{2P}$

Tab. 3. Zakresy pomiarowe dla permeabilizacji komórek drożdży za pomocą alkoholu

Zakresy pomiarowe	Zastosowany alkohol								
	Etanol			1-Propanol			2-Propanol		
	T [°C]	S [%]	t [min]	T [°C]	S [%]	t [min]	T [°C]	S [%]	t [min]
min.	6,6	24,8	7	1,5	3,2	7	6,6	6,4	7
maks.	23,4	75,2	73	18,5	36,8	73	23,4	73,6	73

Rozwiązania analityczne

Przedstawione modele można wykorzystać, gdy istnieje potrzeba prowadzenia permeabilizacji w narzuconej temperaturze T , aby uzyskać możliwie największą skuteczność procesu, tj. maksymalną aktywność katalazy A^T .

Przy założeniu $T = \text{const}$ liczba niewiadomych w modelach matematycznych maleje do dwóch, dlatego też można obliczyć metodami analitycznymi wartości S i t odpowiadające A^T .

W pierwszym etapie wyznaczono zatem pochodne cząstkowe pierwszego rzędu względem S i t dla przedstawionych modeli matematycznych (Tab. 4).

Tab. 4. Pochodne cząstkowe pierwszego rzędu dla modeli matematycznych ($T = \text{const}$)

Zastosowany alkohol	Pochodne cząstkowe pierwszego rzędu
Etanol	$\frac{dA_E}{dS_E} = 545 - 512 T_E - 2810 S_E$
	$\frac{dA_E}{dt_E} = 464 - 1140 t_E$
1-Propanol	$\frac{dA_{1P}}{dS_{1P}} = 851 - 378 T_{1P} - 2118 S_{1P} - 358 t_{1P}$
	$\frac{dA_{1P}}{dt_{1P}} = - 358 S_{1P} - 772 t_{1P}$
2-Propanol	$\frac{dA_{2P}}{dS_{2P}} = 1327 - 675 T_{2P} - 1920 S_{2P} - 484 t_{2P}$
	$\frac{dA_{2P}}{dt_{2P}} = - 484 S_{2P} - 946 t_{2P}$

Następnie wyznaczone pochodne przyrównano do zera tworząc odpowiednie układy równań. Ich rozwiązaniem są punkty stacjonarne o współrzędnych (S , t) podejrzane o ekstremum. Końcowe wzory do obliczenia wartości stężenia roztworu alkoholu i czasu trwania procesu permeabilizacji prowadzonego w ustalonej temperaturze podano w tab. 5.

Tab. 5. Wzory do obliczania wartości S oraz t dla procesu permeabilizacji prowadzonego w ustalonej temperaturze

Zastosowany alkohol	Wzory do obliczania S oraz t
Etanol	$S_E = 0,1939 - 0,1822 T_E$ $t_E = 0,407$
1-Propanol	$S_{1P} = 0,4359 - 0,1936 T_{1P}$ $t_{1P} = - 0,2021 + 0,0898 T_{1P}$
2-Propanol	$S_{2P} = - 0,7929 - 0,4033 T_{2P}$ $t_{2P} = - 0,4051 + 0,2060 T_{2P}$

Z kolei obliczono pochodne drugiego rzędu i utworzono odpowiednie wyznaczniki zgodnie z równaniem:

$$W = \begin{vmatrix} \frac{d^2 A}{dS^2} & \frac{d^2 A}{dSdt} \\ \frac{d^2 A}{dSdt} & \frac{d^2 A}{dt^2} \end{vmatrix} \quad (1)$$

Obliczono wyznaczniki dla punktów stacjonarnych i na ich podstawie sprawdzono, czy w punktach istnieje ekstremum ($W > 0$). Następnie w oparciu o wartości pochodnych drugiego rzędu w punktach stacjonarnych określono rodzaj ekstremum.

Zgodnie z zaprezentowanym algorytmem wykonano obliczenia dla ustalonych temperatur prowadzenia procesów permeabilizacji za pomocą etanolu, 1-propanolu i 2-propanolu. We wszystkich przypadkach został spełniony warunek istnienia maksimum (wartość wyznacznika wyższa od zera i wartość pochodnych drugiego rzędu niższa od zera).

Następnie obliczono A^T przez podstawienie wyznaczonych wartości S i t do proponowanych modeli matematycznych.

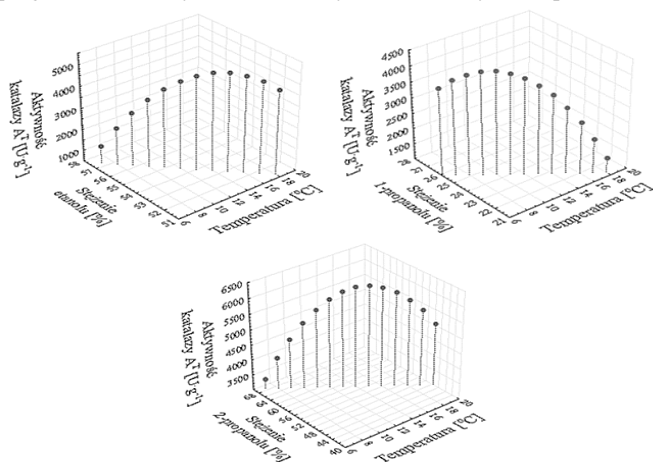
Skuteczność procesu

Bezpośrednie porównanie skuteczności wszystkich trzech alkoholi zastosowanych oddzielnie w permeabilizacji jest trudne ze względu na różnice w analizowanych zakresach temperatury prowadzenia procesu. Z tego powodu wyniki obliczeń pokazano (Rys. 1) na trójwymiarowych wykresach dla wspólnego zakresu temperatur od 7°C do 18°C.

Z wykresów tych wynika, że osiągnięcie maksymalnych aktywności enzymu A^T dla każdej temperatury z zakresu 7÷18°C wymaga użycia roztworów alkoholi ze zróżnicowanych zakresów stężeń. Dla permeabilizacji za pomocą etanolu i 1-propanolu obliczenia z wykorzystaniem modeli matematycznych wskazały na stosunkowo małe zmiany w optymalnych stężeniach roztworów alkoholi (odpowiadających A^T). Wartości S dla temperatur z krańców przedziału różnią się zaledwie o 7%. Natomiast w przypadku 2-propanolu, przedział stężeń roztworów odpowiadających maksymalnej aktywności jest znacznie szerszy, rozpoczyna się od 50%, a kończy się w 70%.

Rezultaty obliczeń optymalnych czasów trwania permeabilizacji za pomocą etanolu, w zależności od ustalonej temperatury wskazują na jego stałą wartość w całym zakresie temperatur. W przypadku dwóch pozostałych alkoholi czasy trwania procesu dla temperatur z krańców zakresu (7÷18°C) różnią się w przypadku 1-propanolu o 10%, a w przypadku 2-propanolu o 26%.

Przeprowadzona symulacja skuteczności procesów permeabilizacji komórek drożdży piekarskich za pomocą alkoholi umożliwiła łatwe prognozowanie aktywności katalazy dla narzuconych temperatur.



Rys. 1. Maksymalne aktywności katalazy A^T i odpowiadające im stężenia roztworów a) etanolu, b) 1-propanolu i c) 2-propanolu dla permeabilizacji w ustalonych temperaturach

Ze względu na koszty związane z etapem chłodzenia, często wymagane jest prowadzenie procesów w temperaturze zbliżonej do temperatury otoczenia. Na podstawie wzorów z tab. 4 i modeli ma-

tematycznych zawartych w tab. 2 obliczono A^T dla permeabilizacji za pomocą etanolu i 2-propanolu w zakresie temperatur 20÷23°C.

W celu określenia, o ile zmniejszy się aktywność katalazy, gdy zrezygnuje się z temperatur optymalnych, wykorzystano wzór na skuteczność procesu permeabilizacji:

$$\eta = \frac{A^T}{A_{opt}} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

A^T – aktywność katalazy dla permeabilizacji w określonej temperaturze, [$U \cdot g^{-1}$],

A_{opt} – aktywność katalazy dla permeabilizacji w warunkach optymalnych, [$U \cdot g^{-1}$].

Obliczono η dla ustalonych temperatur, a wyniki zebrano w tab. 6. Ze względu na bardzo niską skuteczność 1-propanolu w permeabilizacji prowadzonej w temperaturach powyżej 18,5°C, nie ujęto tego alkoholu w tabeli.

Tab. 6 Zestawienie wartości A^T i η dla permeabilizacji komórek drożdży za pomocą etanolu i 2-propanolu dla narzuconych temperatur prowadzenia procesu

Temperatura, [°C]	Etanol		2-Propanol	
	A^T , [$U \cdot g^{-1}$]	η , [%]	A^T , [$U \cdot g^{-1}$]	η , [%]
20	3440	68	5050	81
21	2750	54	4500	72
22	1930	38	3865	62
23	1000	18	3130	50

Wybranie procesu permeabilizacji za pomocą etanolu i 2-propanolu w temperaturze otoczenia (np. 20°C) z zastosowaniem optymalnych dla tej temperatury stężeń roztworów alkoholi (50% dla etanolu i 48% dla 2-propanolu), umożliwia otrzymanie komórek drożdży piekarskich o aktywnościach odpowiednio o 32% i 19% mniejszych od aktywności optymalnych A_{opt} .

Wnioski

Na podstawie analizy uzyskanych wyników (Rys. 1, Tab. 6), można stwierdzić dużą czułość procesu na zmianę temperatury dla permeabilizacji za pomocą etanolu. Oszacowane aktywności maksymalne A^T tworzą szeroki przedział wartości, w którym najniższa (1000 $U \cdot g^{-1}$) jest pięć razy mniejsza od A_{opt} .

Dla porównania permeabilizacja za pomocą 2-propanolu w temperaturze 23°C skutkuje najniższą aktywnością katalazy $A^T = 3130 U \cdot g^{-1}$, która jest tylko dwa razy mniejsza od A_{opt} .

LITERATURA

- Białecka-Florjańczyk E., Majewska E., 2006. Biotransformacje z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol.*, **3** 113-133
- Chow C.K., Palecek S.P., 2004. Enzyme encapsulation in permeabilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Prog.*, **20**, 449-56. DOI: 10.1021/bp034216r
- Olczak I., Grubecki I., Wójcik M., 2010. Optymalizacja procesu permeabilizacji komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metanolem. *Inż. Ap. Chem.*, **49**, nr 1, 89-90
- Presecki A.V., Vasić-Racki D., 2005. Production of L-malic acid by permeabilized cells of commercial *Saccharomyces Sp. Strains*. *Biotechnol. Lett.*, **27**, 1835-1839. DOI: 10.1007/s10529-005-3890-3
- Sekhar S., Bhat N., Bhat S.G., 1999. Preparation of detergent permeabilized Bakers' yeast whole cell catalase. *Proc. Biochem.*, **34**, 349-354. DOI: 10.1016/0141-0229(91)90172-7. 12
- Trawczyńska I., Wójcik M., 2014. Application of response surface methodology for optimization of permeabilization process of baker's yeast. *Pol. J. Chem. Technol.*, **16**, 31-35. DOI: 10.2478/pjct-2014-0026
- Trawczyńska I., Wójcik M., 2015. Optimization of permeabilization process of yeast cells for catalase activity using response surface methodology *Biotechnol. Biotech. Eq.*, **29**, 72-77. DOI: 10.1080/13102818.2014.934986