



Dean Madden

National Centre for Biotechnology Education, University of Reading
Science and Technology Centre, Reading RG6 6BZ UK | E-mail: D.R.Madden@reading.ac.uk

Immobilizowanie drożdży

Immobilizowanie komórek drożdży w kulkach alginianu wapnia

Cel

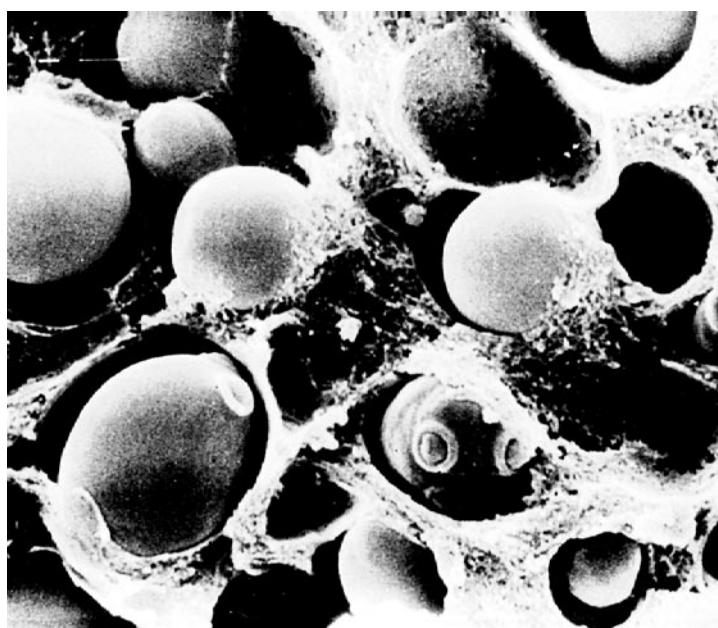
Wprowadzenie do technik immobilizacji komórek oraz ilościowego badania procesu fermentacji.

Wstęp

Najczęstszą techniką unieruchamiania komórek jest ich immobilizowanie w alginianie wapnia. Jest szczególnie odpowiednie w przypadku żywych komórek, ponieważ nie powoduje ich uszkodzenia. Ta uniwersalna metoda jest stosowana w bioreaktorach, unieruchamianiu komórek roślinnych i zarodków roślin przy tworzeniu tzw. „sztucznych nasion”, a także do mikrorozmnażania, immobilizowania komórek hybrydowych w produkcji przeciwciał monoklonalnych oraz unieruchamianiu enzymów i leków (patrz tabela).

Komórki lub enzymy podlegające unieruchomieniu mieszane są najpierw z płynnym roztworem alginianu sodu. Mieszaninę wkrapla się następnie do roztworu zawierającego kationy wielowartościowe, zazwyczaj Ca^{2+} . Kropelki przy wpadaniu do roztworu tworzą kuleczki, które wiążą komórki w trójwymiarowej siatce z alginianu, połączonej na krzyż jonami.

ZDJĘCIE DZIĘKI UPRZEŻMIŃSI CI DUNCAN CASSON



Mikrografia elektronowa komórek drożdży zimmobilizowanych w matrycy alginianu wapnia. Wybrzuszenia będące początkiem pączkowania są widoczne na niektórych komórkach drożdży.

Komórki	Produkty lub miejsce zastosowania	Komórki	Produkty lub miejsce zastosowania
Bakterie		Glony	
<i>Erwinia rhapontici</i>	Izomaltuloza	<i>Botryococcus braunii</i>	Węglowodany
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Oczyszczanie wody pitnej	Komórki roślinne	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Etanol	<i>Chatharanthus roseus</i>	Alkaloidy do terapii nowotworów
Sinice		Różne gatunki	Sztuczne nasiona
<i>Anabaena</i> sp.	Amoniak	Protoplasty komórek roślinnych	Manipulacje komórkami, mikroskopia
Grzyby		Komórki zwierzęce	
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	Hydroliza laktozy	Hybrydy	Przeciwciała monoklonalne
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol	Wyspy Langerhansa	Insulina/implantacja
<i>Saccharomyces bajanus</i>	Produkcja szampana	Fibroblasty lub komórki limfy	Interferony (α lub β)

Przykłady zastosowania immobilizowanych w alginianie komórek. Za Smidsrod i Skjak-Brek (1990).

Sprzęt i materiały

Dla każdej osoby lub zespołu

Sprzęt

- Strzykawka plastikowa o pojemności 10 ml
- 2 małe zlewki lub plastikowe kubeczki
- Kolba stożkowa o pojemności 250 ml
- Korek do kolby z przewierconym otworem
- Rurka fermentacyjna
- Małe sitko
- Szklana bagietka

Materiały

- 4% roztwór alginianu sodu, 250 ml
- 1,5% roztwór chlorku wapnia, 100 ml
- suche drożdże piekarnicze, 2,5 g
- 8% roztwór sacharozy, 150 ml
- Uniwersalny wskaźnik pH, rozcieńczony w 1 ml wody destylowanej

Uwaga

Wszystkie roztwory muszą być przygotowane w wodzie destylowanej. Alginian sodu trudno się rozpuszcza. Proces przebiega szybciej w cieplej wodzie.

Do pomiaru ilości wydzielanego dwutlenku węgla (opcjonalnie)

Sprzęt

- Kolba stożkowa o pojemności 250 ml
- Korek pasujący do kolby, przebitý i połączony z naczyniem odbierającym
- Cylinder miarowy na 100 ml
- Zlewka na 500 ml

Materiały

- 13% roztwór chlorku sodu, około 1 litr (doskonale nadaje się roztwór zwykłej soli kuchennej)

Przebieg doświadczenia

- 1 W małej zlewce zmieszaj drożdże z 25 ml wody destylowanej. Przykryj i pozostaw przez 10 min w temperaturze pokojowej do rozpuszczenia.
- 2 Dodaj 25 ml roztworu alginianu sodu do rozpuszczonych drożdży. Dobrze zamieszaj.
- 3 Nabierz mieszaninę drożdży i alginianu do strzykawki. Dodawaj po kropelce do roztworu chlorku wapnia.

Fig. 1

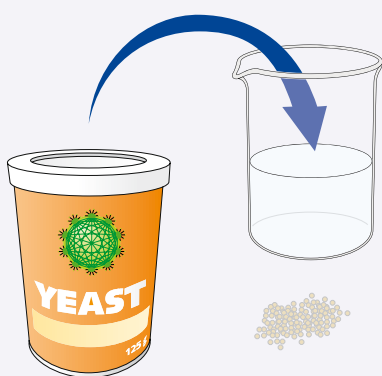


Fig. 2

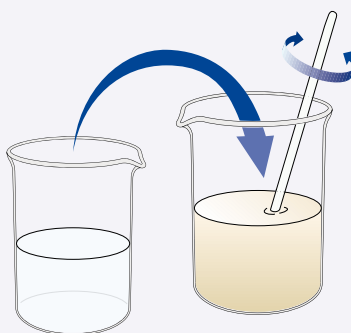
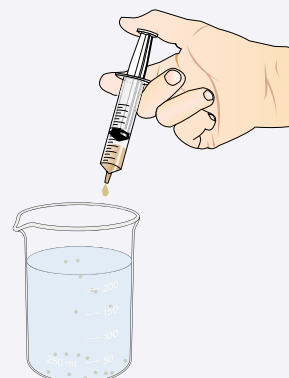


Fig. 3



- 4 Kulki zimmobilizowanych w ten sposób drożdży pozostaw do stwardnienia przez 5 - 10 minut. *Cząsteczki alginianu zostaną związane przez jony wapnia z roztworu.*
- 5 Oddziel kulki od roztworu filtrując przez sitko.
- 6 Umieść kulki w kolbie stożkowej wraz z roztworem sacharozy. Zatkaj kolbę korkiem z rurką fermentacyjną. *Jeśli do rurki doleje się odrobinę uniwersalnego wskaźnika pH, wskaźnik zmieni kolor pod wpływem wydzielanego dwutlenku węgla.*

Fig. 4

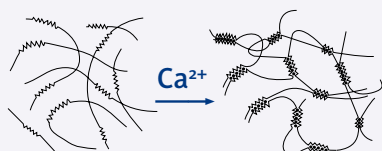


Fig. 5

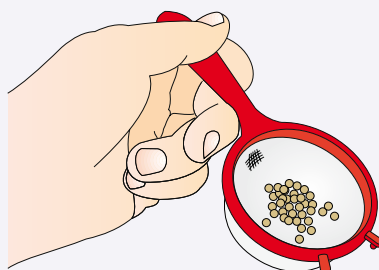
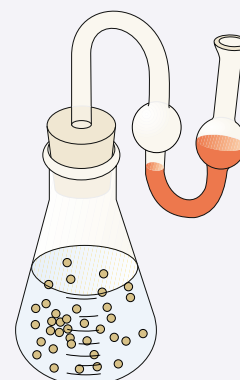


Fig. 6



OPCJONALNIE: Pomiar ilości wydzielanego dwutlenku węgla

- 1 Zatkaj kolbę korkiem podłączonym rurką z naczyniem odbierającym.
- 2 Trzymaj kolbę w temperaturze 21 - 25 °C. Zbieraj wydzielany gaz nad 13% roztworem chlorku sodu. *Dwutlenek węgla nie będzie się rozpuszczał w tym roztworze.*
- 3 Zapisuj objętość wydzielanego gazu w stałych odstępach czasu. Sporządź wykres przedstawiający objętość gazu w zależności od czasu.

Fig. 7

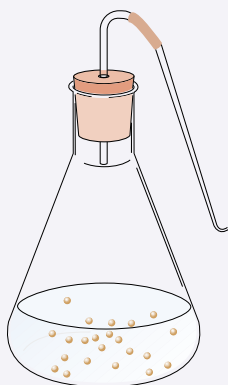


Fig. 8

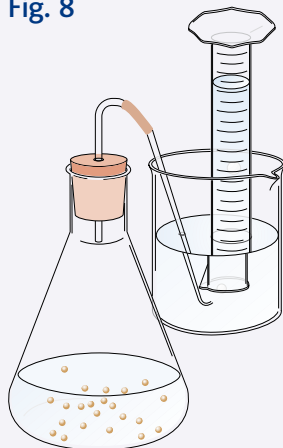
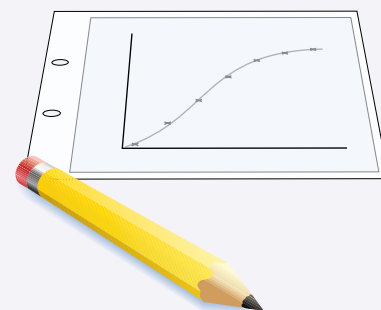


Fig. 9

**Pomysły na dodatkowe doświadczenia**

Zwykłe drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae* nie potrafią fermentować laktozy. Enzym beta-galaktozydaza katalizuje rozpad laktozy do glukozy i galaktozy. Komórki drożdży immobilizowane wspólnie z enzymem są w stanie rosnąć w pożywce zawierającej wyłącznie laktozę. Spośród dwóch cukrów powstałych z rozpadu laktozy, drożdże najpierw zużywają glukozę. Po wyczerpaniu glukozy z pożywki, drożdże zmieniają swój metabolizm rozpoczynając fermentację drugiego cukru - galaktozy. Aktywność drożdży można łatwo śledzić dokonując pomiaru objętości gazu (dwutlenku węgla) wydzielanego podczas prowadzonych fermentacji.

Porównanie zużycia innych cukrów przez komórki drożdży, wpływ temperatury lub typu drożdży np. winiarskich i piekarniczych na tempo fermentacji.

Dodatkowe źródła informacji

Literatura

Smidsrod, O. and Skjak-Brek, G. (1990) Alginate as an immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology* **8** (3) 71–78.

Practical fermentation: A guide for schools and colleges by John Schollar and Bene Watmore (1999) Society for General Microbiology, Reading. ISBN: 0 9536 8380 <http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/PROTOCOLS/fermentation.html>

Immobilized biocatalysts: An introduction by Winnifred Hartmayer (1988) Springer-Verlag, Heidelberg. ISBN: 0387 188088..

Immobilised enzymes and cells: a practical approach by Jonathan Woodward [Ed] (1985) Oxford University Press, Oxford. ISBN: 0 947946 21 7.

Internet:

EIBE Unit 1: Microbes and molecules

<http://www.eibe.info>

Podziękowania



Adaptacja z protokołu autorstwa Deana Maddena opublikowanego po raz pierwszy w EIBE *Unit 1: Microbes and molecules* została wykonana w ramach projektu VOLVOX, finansowanego przez Komisję Europejską w 6. Programie Ramowym.

Tłumaczenie na język polski wykonała Joanna Lilpop.