

Biotechnologia Farmaceutyczna – Ćwiczenia

Ćwiczenie 1 – Immobilizacja drożdży – porównanie wydajności fermentacji alkoholowej komórek wolnych oraz immobilizowanych

Celem ćwiczenia jest immobilizacja drożdży piekarskich w alginianie wapnia metodą pułapkowania oraz porównanie wydajności fermentacji alkoholowej drożdży wolnych i immobilizowanych

Organizacja pracy: grupa odbywająca ćwiczenie zostaje podzielona na zespoły. Każdy zespół wykonuje immobilizację komórek drożdży i nastawia fermentację alkoholową.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji lub mieszanin chemicznych używanych w poniższym ćwiczeniu.

Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Względy bezpieczeństwa: chlorek wapnia działa drażniąco na oczy. W przypadku dostania się do oczu ostrożnie płukać wodą przez kilka minut.

Materiały:

- drożdże piekarnicze (*Saccharomyces cerevisiae*),
- jednorazowe końcówki do pipet,
- pipety automatyczne,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- wytrząsarka laboratoryjna,
- łaźnia wodna,
- mieszadło magnetyczne,
- strzykawki jałowe 5ml, 10ml lub 20 ml,
- szklane bagietki,
- rurki z tworzywa,
- kolby fermentacyjne.

Odczynniki:

- sacharoza,
- chlorek wapnia,
- chlorek sodu,
- alginian sodu,
- woda destylowana.

Wykonanie roztworów roboczych:

1. Przygotować 200 ml 2,5% roztworu chlorku wapnia w 500 ml kolbie: umieścić kolbę na wadze, wytarować masę; do kolby dodać 5,0 g chlorku wapnia, uzupełnić wodą destylowaną do masy 200g; mieszać do całkowitego rozpuszczenia.
2. Przygotować 450 ml 13% roztworu chlorku sodu w 500 ml kolbie: umieścić kolbę na wadze, wytarować masę; do kolby dodać 58,5 g chlorku sodu, uzupełnić wodą destylowaną do masy 450 g; mieszać do całkowitego rozpuszczenia.
3. Przygotować 200 ml 2% roztworu sacharozy: umieścić 200 ml kolbę na wadze, wytarować masę; do kolby dodać 4,0 g sacharozy, uzupełnić wodą destylowaną do masy 200g; mieszać do całkowitego rozpuszczenia.

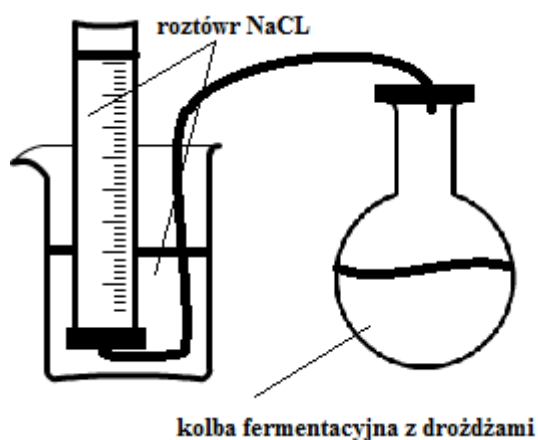
Immobilizacja drożdży:

1. Przygotować naważkę 0,8 g alginianu sodu.
2. Do zlewki o pojemności 100 ml dodać 40 ml wody destylowanej, dodać 10 g pokruszonych drożdży piekarskich i mieszać do uzyskania jednorodnej zawiesiny.
3. Do uzyskanego roztworu dodać (powoli!) 0,8 g alginianu sodu. Podczas dodawania alginianu należy użyć szklanej bagietki - mieszać do całkowitego rozpuszczenia.
4. Z uzyskanej zawiesiny drożdży pobrać 8 ml do strzykawki i wkraplać powoli do 2,5% roztworu chlorku wapnia. Należy uzyskać złoże w postaci kulek.
5. Immobilizowane drożdże należy mieszać w zlewkach z roztworem chlorku wapnia przez 15 minut (licząc od ostatniej utworzonej kulki). Po tym czasie odsączyć złoże kulkowe na lejku Büchnera i przemyć kilkakrotnie wodą destylowaną. Tak przygotowany preparat przechowywać chwilowo w wodzie destylowanej (np. szklanej zlewce).

Porównanie aktywności preparatu drożdży immobilizowanych i drożdży świeżych – reakcja z sacharozą

1. Do dwóch zlewek o pojemności 250ml wlać 200 ml 13% roztworu NaCl. Tym samym roztworem uzupełnić także dwa cylindry pomiarowe, posługując się strzykawką i rurką w korku cylindra.
2. Cylinder umieścić w każdej zlewce do góry dnem i unieruchomić. Wyskalować poziom roztworu do początku skali za pomocą rurki z tworzywa (delikatnie wdmuchiwać powietrze strzykawką).
3. Do dwóch kolb fermentacyjnych dodać po 100 ml 2% roztworu sacharozy.
4. Do pierwszej kolby dodać preparat drożdży immobilizowanych (przygotowany z 8 ml zawiesiny), a do drugiej wprowadzić 2 g świeżych, pokruszonych drożdży i dokładnie wstrząsnąć.
5. Kolbki fermentacyjne zamknąć korkiem ze szlifem, odprowadzenie gazu podłączyć do cylindra umieszczonego w nasyconym roztworze NaCl. Korek owinąć bardzo dokładnie parafilmem aby uszczelnić układ. Umieścić kolbki na mieszadle magnetycznym/łaźni wodnej, mieszać co jakiś czas przez cały proces fermentacji.

schemat podłączenia:



6. Postęp reakcji należy śledzić zapisując w odstępach 10 min objętość wydzielonego dwutlenku węgla. Po 1 h zakończyć reakcję.

Pod wpływem enzymów zawartych w drożdżach zachodzi hydroliza sacharozy do glukozy i fruktozy (*inwertaza*), a następnie fermentacja alkoholowa (*zymaza*) z wytworzeniem alkoholu etylowego i dwutlenku węgla według poniższego schematu:



W wyniku tego procesu powstaje również szereg produktów ubocznych, między innymi: gliceryna, kwas bursztynowy i kwas octowy

lp.	czas [min]	objętość CO ₂ [ml]	
		drożdże świeże	drożdże immobilizowane
1	10		
2	20		
3	30		
4	40		
5	50		
6	60		

Ćwiczenie 2 Oznaczenie ilości bakterii z rodzaju *Lactobacillus sp.* w produktach probiotycznych.

Celem ćwiczenia jest porównanie ilości bakterii probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus sp.* w preparatach farmaceutycznych dostępnych na rynku bez recepty.

Organizacja pracy: grupa odbywająca ćwiczenie zostaje podzielona na zespoły. Każdy zespół wykonuje posiew z jednego produktu probiotycznego.

Przed przystąpieniem do pracy eksperymentalnej student jest zobowiązany do samodzielnego zapoznania się z kartą charakterystyki substancji, lub mieszanin chemicznych, używanych w poniższym ćwiczeniu.

Szczególny nacisk należy zwrócić na sekcje: „Identyfikacja zagrożeń” i „Pierwsza pomoc”.

Materiały:

- dostępne komercyjnie preparaty farmaceutyczne zawierające szczepy bakterii probiotycznych,
- jednorazowe końcówki do pipet,
- rękawice ochronne,
- płyn do dezynfekcji przestrzeni roboczej,
- szalki Petriego,
- sterylna kolba 500 ml.

Odczynniki:

- PBS,
- podłoże mikrobiologiczne MRS,
- agar.

Sprzęt:

- pipety automatyczne,
- wytrząsarka laboratoryjna,

- autoklaw,
- komora laminarna,
- palnik spirytusowy.

1. Przygotowanie podłoża mikrobiologicznego (1 na wszystkie zespoły):

- do jałowej kolby odważyć 10,4 g bulionu MRS oraz 2 g agaru,
- uzupełnić kolbę do 200 ml wodą destylowaną,
- kolbę przykryć folią aluminiową i autoklawować w 121°C przez 15 minut.

2. Przygotowanie seryjnych rozcieńczeń

Rozcieńczenia dziesiętne wykonać w buforze PBS:

- przygotować 5 szklanych probówek, nalać do nich po 9 ml PBS,
- odważyć 0,5 g proszku przeznaczonego do analizy w 15 ml falconie,
- uzupełnić probówkę roztworem PBS do objętości 5 ml i wymieszać, roztwór ma rozcieńczenie rzędu 10^{-1} ,
- inkubować przez 15-20 minut w temperaturze 37°C,
- następnie 1 ml rozcieńczenia przenieść do probówki zawierające 9,0 ml PBS, całość przepipetować, roztwór ma rozcieńczenie rzędu 10^{-2} ,
- w dalszej kolejności postępowano analogicznie do uzyskania rozcieńczenia rzędu 10^{-6} (za każdym razem zmienić końcówkę w pipecie!).

3. Posiew wgłębnny

Do analizy wykorzystać dwa ostatnie rzędy rozcieńczeń (10^{-5} i 10^{-6}):

- nanieść 1 ml rozcieńczenia odpowiedniego rzędu na każdą z szalek Petriego,
- płytki z próbami zalać ok. 20 ml upłynnionym podłożem M.R.S Agar, ochłodzonego do temperatury 45°C,
- zawartość płytek wymieszać ruchami okrężnymi i pozostawić na 10 minut celem zestalenia się podłoża,
- po zestaleniu się podłoża, płytki odwrócić do góry dnem i przenieść do ciepłarki, inkubować je w temperaturze 37°C przez 48 godzin.

Wyniki

Wynik badania odczytać po 48-godzinnej inkubacji płytek w 37°C. Do odczytu i oceny wybrać jedynie płytki z wyrosłymi koloniami w liczbie 30 – 300.

	Rozcieńczenie	
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
produkt A		
produkt B		
produkt C		
produkt D		

Tab. Wynik oznaczania liczby *Lactobacillus sp* w produkcie w postaci liczby żywych komórek (CFU) w 1 g.

Interpretacja wyników

Liczba żywych komórek (CFU) w 1 g:

Liczba kolonii na płytce x współczynnik rozcieńczenia

