



West Pomeranian
University of Technology
Szczecin



BIOIMMOBILIZACJA

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych Materiałów
Opakowaniowych**



ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin



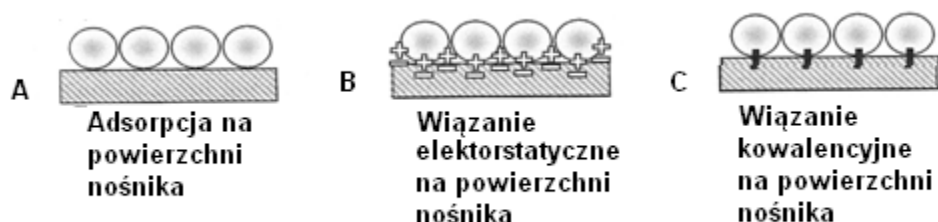
Ćwiczenie 5

**Immobilizacja mikroorganizmów na
nośniku stałym**

1. Immobilizacja na powierzchni nośnika

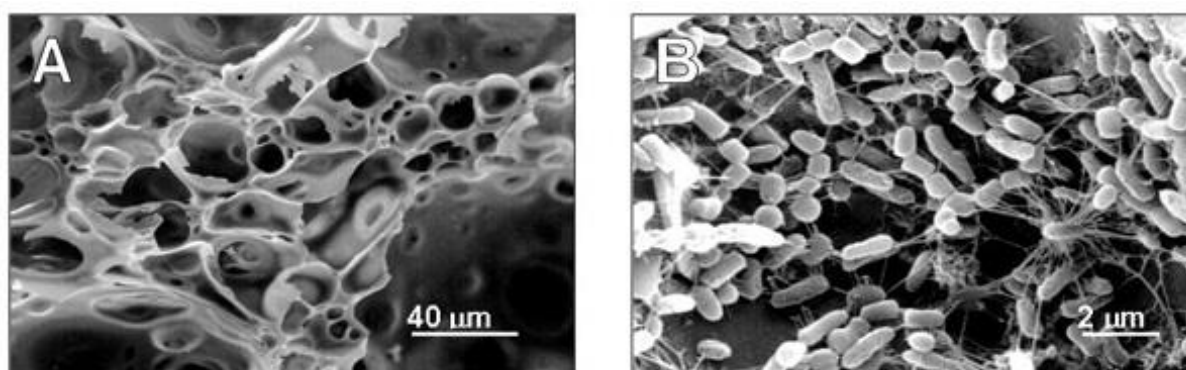
Immobilizacja komórek na powierzchni nośnika jest dość szybką oraz prostą metodą unieruchamiania, szeroko wykorzystywaną w licznych procesach przemysłowych. Metoda ta obejmuje pasywną/ naturalną immobilizację zachodzącą zwykle w bioreaktorach.

Głównymi zjawiskami zachodzącymi w obrębie metody immobilizacji na nośniku są adsorpcja (A), adhezja (B) oraz wiązanie kowalencyjne komórek (C). (Rys. 1)



Rys.1. Unieruchamianie komórek na powierzchni nośnika : (A) adsorpcja, (B) adhezja, (C) wiązanie kowalencyjne (Kourkoutas i wsp, 2004)

Unieruchamianie na powierzchni nośnika zachodzi wówczas, gdy komórki bakteryjne wykazują zdolność do osadzania się bądź przylegania do powierzchni. Podstawą tej metody jest wzajemne oddziaływanie pomiędzy nośnikiem, a komórką poprzez tworzenie wiązań wodorowych, hydrofobowych, jonowych czy oddziaływań siły van der Waalsa. Wydajność adsorpcji zależy od rodzaju zastosowanych mikroorganizmów, ich metabolizmu, wieku oraz cech środowiska.



Rys.2. Struktura pumeksu oraz rozwój biofilmu w mikroskopie elektronowym (A) przed kolonizacją, (B) adhezja bakterii po 6 miesiącach (Di Lorenzo i wsp., 2005)

Immobilizacja na powierzchni nośnika za pomocą wiązania kowalencyjnego należy do metod chemicznych mających na celu trwałe związanie komórki z nośnikiem. Najczęściej używanymi związkami wiążącymi są: aldehyd glutarowy, diizocyjaniany czy tetraazobenzzydina. Odmianą zaletą tej metody jest powstanie stabilnego układu komórka-nośnik, jednakże większość wiążących czynników oddziałuje toksycznie na komórki, w związku z czym proces dążący do otrzymania konkretnego produktu jest mało efektywny.

Enzymy są bardzo często immobilizowane na nośnikach stałych, co jest związane z właściwościami fizyczno-chemicznymi oraz oddziaływaniami w obrębie układu enzym-nośnik. W przypadku immobilizacji drobnoustrojów istotną funkcję podczas unieruchamiania komórki pełni dodatkowo:

- Obecność fimbrii

- Obecność adhezyn
- Zdolność do tworzenia biofilmu oraz samoistnej agregacji

Funkcje nośników w procesie immobilizacji na powierzchni pełnią substancje zarówno pochodzenia organicznego jak i nieorganicznego. Przy wyborze matrycy do immobilizacji pod uwagę bierze się:

- niską toksyczność w stosunku do immobilizowanych komórek,
- łatwość unieruchamiania,
- wysoka zdolność wiązania komórek,
- obojętność chemiczna,
- wysoka wytrzymałość mechaniczna,
- możliwość wielokrotnego użycia,
- duża zdolność dyfuzyjna w stosunku do produktu i substratu,
- niski koszt,
- możliwość zastosowania układu na skalę przemysłową.

W przypadku mikroorganizmów jedną z najważniejszych interakcji pomiędzy nośnikiem, a immobilizowaną komórką jest zdolność komórek bakteryjnych do prawidłowego wzrostu na takiej matrycy. Większość matryc stosowanych do unieruchamiania na powierzchni cechuje obecność porów, których wielkość zależy od rodzaju immobilizowanych komórek. Jako matryce najczęściej stosuje się nośniki takie jak: szkło porowate, piankę poliuretanową, skały pochodzenia wulkanicznego, ceramikę

Spieki szklane są materiałem porowatym, odpornym mechanicznie, obojętnym chemicznie. Rozmiary porów zależą od obróbki cieplnej szkła i końcowego przemywania roztworami NaOH lub KOH. Do immobilizacji najczęściej używa się porowatych kulek szklanych. Na uwagę zasługuje także białe szkło piankowe. Szkło piankowe jest materiałem otrzymanym z proszku szklanego z dodatkiem czynników spieniających.

Poliuretany (PU) przez wzgląd na mechaniczną wytrzymałość są dość powszechnie stosowanymi nośnikami do immobilizacji. Najczęściej wykorzystywanym nośnikiem jest pianka poliuretanowa (PUF). PUF jest materiałem obojętnym chemicznie charakteryzującym się dobrymi właściwościami mechanicznymi (wysoka wytrzymałość i elastyczność) oraz wysoką porowatością (około 97%), a co za tym idzie dużą powierzchnią adsorpcji.

Najbardziej znanym szkliwem wulkanicznym jest pumeks oraz perlit. Pumeks i perlit to porowate minerały krzemianowe (około 70% $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), które cechują się wysoką trwałością, niskim zasoleniem, obojętnością chemiczną, a także wysoką adsorpcją.

Nośniki ceramiczne to porowate związki, które charakteryzują się bardzo rozwiniętą powierzchnią wewnętrzną (kanaliki). Wielkość i kształt matrycy zależy od immobilizowanych komórek.

Prócz szkła porowatego, ceramiki, skał pochodzenia wulkanicznego i pianki poliuretanowej do immobilizacji na powierzchni nośnika stosuje się również wióry drewniane, żywice jonowymienne, włókna z bawełny.

Literatura:

1. Czaczyk K., Olejnik A., Mięzał P., Grajek W., 2005. Poszukiwanie prostych modeli do badania adhezji bakterii probiotycznych. *Zywn. Nauk. Technol. Ja.* 1 (42), 84 – 96.
2. De Ory I., Cabrera G., Ramirez M., Blandino A., 2006. Immobilization of cells on polyurethane foam. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and cells*, second edition, edited by Guisan J.M., Humana Press In., Totowa. NJ, 357-365.
3. Dulieu C., Poncelet D., Neufeld R.J., 1999. Encapsulation and immobilization techniques. *Cell encapsulation technology and therapeutics*, *Birkhauser*, Boston, 3-17.
4. Górecka E., Jastrzębska M. 2011, Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol. Food Sci.* 75 (1), 65-86.
5. Guisan J.M. 2006, Immobilization of enzymes and cells. In: *Methods in Biotechnology*, 2nd ed. Walker JM Eds.: Humana Press, Totowa, USA, 22.
6. Peinado P.A., Moreno J.J., Villaba J.M., Gonzalez-Reyes J.A., Ortega J.M., Mauricio J.C. 2006, A new immobilization method and their applications. *Enzyme Microb. Tech.* 40, 79-84.
7. Poncelet, D., Lencki R., Beaulieu C., Hallé J.P., Neufeld R.J., Fournier A. 1992. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation: I Methodology. *Appl. Microbiol. Biot.* 38, 39-45.
8. Tuszyński T., 2008. Immobilizacja drobnoustrojów. Możliwości ich przemysłowego wykorzystania. *Laboratorium* 10, 34 – 38.
9. Verstrepen K.J., Klis F.M. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in Yeasts. *Mol. Microbiol.* 60 (1), 5–15.
10. Woodward J. 1988. Methods of immobilization of microbial cells. *J. Microbiol. Meth.* 8 (1-2), 91-102.
11. Nag A., Han K., Singh H. 2011. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodiumcaseinate and gellan gum, *Int. Dairy J.* 21, 247-253.
12. Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, *J. Food Eng.* 104, 467–483.
13. Annan N.T., Borza A.D., Hansen L.T. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.* 41, 184–193.
14. Sohail A., Turner M.S., Coombes A., Bostrom T., Bhandari B. 2011. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 145, 162-168.
15. Sohail A., Turner M.S, Coombes A., Bhandari B. 2012. The Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM Following Double Encapsulation in Alginate and Maltodextrin. *Food Bioprocess Technol.* 6 (10), 2763-2769.
16. Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. 2013. Immobilization Technologies in Probiotic Food Production, *J. Nutr. Met.* 10, 1-15.

Przebieg ćwiczenia nr 5

Odczynniki:

- mieszanina polioliowa A
- mieszanina poliizocyjanianów B
- 0,9% oraz 0,3%, jałowy chlorek sodu
- podłoże MRS
-

Przygotowanie 200 ml pożywki:

- do kolby o pojemności 300 ml nalać 200 ml wody destylowanej
- pożywkę naważyć zgodnie z protokołem firmy (przepis na opakowaniu, przeliczyć ilość podłoża tak by uzyskać 200 ml pożywki), następnie wprowadzić do 200 ml wody destylowanej
- pożywkę sterylizować w autoklawie
- po sterylizacji rozlać podłoże i poczekać do jego zestalenia

PIANKI:

Czyste pianki poliuretanowe przygotowuje się na bazie dwóch składników otrzymanych od firmy PCC Prodex. Składnikiem A jest mieszanina polioliowa w postaci oleistej białej cieczy o gęstości $1,02 \text{ g/cm}^3$ i lepkości 2800 mPas, składnikiem B jest mieszanina aromatycznych poliizocyjanianów głównie 4,4'-metylenodifenylo diizocyjanian o barwie miodowo-brunatnej, gęstości $1,21 \text{ g/cm}^3$ i lepkości 150 mPas.

Instrukcja firmy PCC Prodex podaje, że czas startu do momentu wzrostu mieszaniny wynosi $15 \pm 3 \text{ s}$ (do momentu wzrostu mieszaniny), czas żelowania $60 \pm 5 \text{ s}$ (trwa do momentu wyciągnięcia zżelowanych włókien z pianki), czas suchego lica $80 \pm 8 \text{ s}$ (do momentu, gdy powierzchnia pianki nie klei się przy dotknięciu), czas sezonowania 24 h.

Wykonanie pianek:

1. Pianki PUR wykonać w formie falkonu o mniejszej pojemności docelowej wynoszącej 15 ml. Odważyć 1,98 g składnika A, po czym dodać 1,2 g składnika B i przez ok. 15 s intensywnie mieszać bagietką powstałą mieszaninę.
2. Otrzymane walce o średnicy zastępczej wynoszącej 14 mm i wysokości średnio 95 mm pociąć na krążki (dyski) o wysokości 5 mm. Preparacje pianek wykonać w trzech powtórzeniach. Krążki przeznaczone są do immobilizacji materiału biologicznego.

Immobilizacja drobnoustrojów na powierzchni nośnika

Do przygotowanej zawiesiny *L. rhamnosus* wprowadzić 1 walec pianki. Po 30 minutach w sposób aseptyczny wyjąć walec, przepłukać sterylnym roztworem 0,3% NaCl. Następnie przenieść piankę do probówki typu falcon z 0,9% NaCl, ugniatać ją przez 1 minutę sterylną bagietką szklaną. W kolejnym etapie probówkę z pianką wytrząsać na wirówce typu vortex przez 4 minuty, po czym wykonać rozcieńczenia dziesiętne i wysiać je na szalki Petriego z pożywką MRS agar (w trzech powtórzeniach). Wykonać również posiewy z zawiesiny bakteryjnej, w której znajdowała się pianka. Szalki inkubować przez 48h w temp. 37°C , a następnie zliczyć pojedyncze kolonie. Wyniki zestawić w tabeli. Porównać ilość mikroorganizmów znajdujących się na piance oraz w zawieszynie.

Aby immobilizacja była skuteczna na nośniku powinno być co najmniej o 1 logarytmiczny rząd więcej niż w zawieszynie, w której dokonywano adhezji. Dlatego pianki powinny być niej inkubowane 24 h.

KARTA PRACY ĆWICZENIE NR 5

Grupa

Imię i nazwisko:

1.
2.
3.
4.

Opracowanie wyników

Po zliczeniu pojedynczych kolonii z trzech powtórzeń policzyć średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe. Porównać liczebność komórek bakteryjnych w zawiesiny z liczebnością mikroorganizmów znajdujących się na piance (po adhezji). Napisać czy doszło do immobilizacji (adhezji drobnoustrojów)

	Liczebność <i>L. rhamnosus</i>					
	[jtk/ml]					
	PIANKA			Zawiesina bakteryjna w 0,9% NaCl		
Powtórzenia						
średnia						
Odchylenie standardowe						

Wnioski: