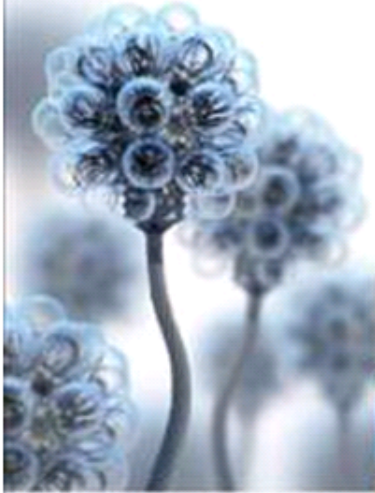




Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny



Podstawy inżynierii biotechnologicznej

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych
Materiałów Opakowaniowych**

ul. Klemensa Janickiego 35
71-270 Szczecin



Ćwiczenie 3 Metody rozdrabniania surowców – cz. 2

Przebieg ćwiczenia

Materialy:

- Jabłko
- Izotoniczny roztwór chlorku sodu (0,9% NaCl)
- Odczynniki do enzymatycznego oznaczania glukozy GOD-PAP (roztwór w próbówce typu FALCON)
- Standardowy roztwór glukozy o stężeniu 1 mg/ml
- 3 % roztwór SDS (siarczan dodecyłu)

Sprzet:

- Probówki 15ml oraz 50ml typu FALCON oraz statywy
- Pipety automatyczne 200 μ l, 1000 μ l, końcówki do pipet
- Tryskawka z wodą destylowaną
- 1x Zlewki 100ml, 1x zlewka 250-400 ml na NaCl
- 2x Cylinder miarowy o pojemności 100ml (na 0,9% NaCl oraz na 3 % roztwór SDS)
- Wyrząsarka laboratoryjna (vortex)
- Spektrofotometr, kuwety
- 2x Moździerz

Metoda z rozcieraniem w moździerzu:

Odważyć 4 g drobno pokrojonego jabłka i przenieść do moździerza, dodać pipetą automatyczną 4ml 0,9% roztworu NaCl. Rozcierać jabłko przez 15 min., następnie odmierzyć cylindrem miarowym i dodać 16ml 0,9% NaCl, wszystko dokładnie wymieszać. Przenieść zawiesinę do 50ml probówki typu FALCON. Przepłukać dokładnie moździerz 20ml 0,9% NaCl i przenieść do tej samej probówki (końcowa objętość zawiesiny komórkowej powinna wynosić 40 ml). Zawiesinę komórek odwirować przy 5000 rpm przez 10 min (program nr 9). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Metoda z rozcieraniem w moździerzu z dodatkiem SDS:

Odważyć 4 g drobno pokrojonego jabłka i przenieść do moździerza, dodać pipetą automatyczną 4ml 3 % roztworu SDS. Rozcierać jabłko przez 15 min., następnie odmierzyć cylindrem miarowym i dodać 16ml 3 % SDS, wszystko dokładnie wymieszać. Przenieść zawiesinę do 50ml probówki typu FALCON. Przepłukać dokładnie moździerz 20ml 3 % SDS i przenieść do tej samej probówki (końcowa objętość zawiesiny komórkowej powinna wynosić 40ml). Zawiesinę komórek odwirować przy 5000 rpm przez 10 min (program nr 9). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Metoda z użyciem homogenizatora:

Odważyć 4 g drobno pokrojonego jabłka i przenieść do zlewki o pojemności 100ml, następnie odmierzyć cylindrem miarowym i dodać 40ml 0,9% NaCl. Wstawić homogenizator do zlewki – prędkość obrotów 10000 (poprosić o pomoc prowadzącego). Proces homogenizacji prowadzić przez 15 min., a następnie przenieść zawiesinę do 50ml probówki typu FALCON (końcowa objętość zawiesiny komórkowej powinna wynosić 40ml). Zawiesinę komórek odwirować przy 5000 rpm przez 10 min (program nr 9). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Metoda z użyciem „młynka kulowego”:

Odważyć 4 g drobno pokrojonego jabłka i przenieść do FALCONU o pojemności 50ml. Odmierzyć cylindrem miarowym i dodać 20ml 0,9% NaCl, następnie wsypać kulki stalowe do FALCONU i energicznie mieszać przez 15 min. Po 15min. zawiesinę przenieść do nowego FALCONU (bez kulek stalowych), natomiast starą probówkę (z kulkami stalowymi) przepłukać 20ml 0,9% NaCl i przelać ponownie do nowej probówki, tak aby końcowa objętość zawiesiny komórkowej wynosiła 40ml. Zawiesinę komórek odwirować przy 5000 rpm przez 10 min (program nr 9). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Oznaczanie stężenia cukru przed dezintegracją:

UWAGA: przystąpić do tego etapu dopiero po homogenizacji poprzednich czterech próbek.

Odważyć 4 g drobno pokrojonego jabłka i przenieść do 50ml probówki typu FALCON i dodać 40ml 0,9% NaCl. Dokładnie wymieszać, a następnie odwirować 5000 rpm przez 10 min (program nr 9). Klarowny supernatant zachować do oznaczenia stężenia białka.

Przygotowanie krzywej wzorcowej i pomiar stężenia uwolnionej glukozy w procesie dezintegracji:

Przygotować w probówkach o pojemności 15ml roztwory do wyznaczenia krzywej wzorcowej dla standardu glukozy (końcowa objętość 3ml) o następujących **stężeniach**:

Nr próby	1	2	3	4
Stężenie glukozy [mg/ml]	0	0,33	0,66	1
Ilość glukozy w μ l	0	10	20	30
Ilość 0,9% NaCl w μ l	30	20	10	0
Ilość odczynnika GOD-PAP	2970	2970	2970	2970

UWAGA: najpierw przygotować w probówkach odczynnik GOD-PAP

Całość wymieszać na wytrząsarce przez 10s i pozostawić na 20 min. w temp. pokojowej (zabarwienie jest trwałe przez 15-20 min.). Stężenie glukozy oznaczać przy długości fali 500 nm.

Spektrofotometr wykalibrować wobec próby nr 1 nie zawierającej glukozy (po włożeniu kuwety do spektrofotometru kliknąć „zero”), do analizy dalszych prób kliknąć „measure”. Wykreślić krzywą wzorcową zależności absorbancji od stężenie glukozy: $A = f(c)$.

Z otrzymanych supernatantów w poprzednich etapach pobrać 30 μ l supernatantu i mieszać z 2970 μ l odczynnika GOD-PAP (wcześniej przygotować w probówkach o pojemności 15ml). Całość wymieszać na wytrząsarce przez 10s i pozostawić na 20 min. w temp. pokojowej (zabarwienie jest trwałe przez 15-20 min.). Stężenie glukozy oznaczać przy długości fali 500 nm., na podstawie krzywej wzorcowej obliczyć stężenie glukozy w poszczególnych supernatantach. Wynik podać w μ g/ml (należy uwzględnić 10-krotne rozcieńczenie preparatu jabłka).

Uwaga!

- **Przed przygotowaniem krzywej wzorcowej wymieszać przez 5s standardowy roztwór glukozy znajdujący się w eppendorfce.**
- **Po pomiarze absorbancji przepłukać kuwety wodą destylowaną z tryskawki.**
- **Do wycierania kuwet stosować papierową chusteczkę.**
- **Po zakończeniu pomiarów na spektrofotometrze przepłukać kuwety 96% etanolem, natomiast próbówki o pojemności 15ml denaturatem znajdującym się w spryskiwaczu.**

Sprawozdanie

- Narysować wykres stężenia standardu glukozy) $A = f(c\text{Glukozy})$ i obliczyć stężenie glukozy w poszczególnych supernatantach (obliczenia dokonać na podstawie równania prostej). Na wykresie utworzyć linię trendu – typ liniowy, równanie prostej oraz wartość R-kwadrat.
- Przedstawić wyniki w postaci histogramu przedstawiając wzrost stężenia glukozy w supernatancie po procesie rozbijania w stosunku do preparatu jabłka nie poddanym dezintegracji.
- Przedstawić w postaci histogramu wydajność procesu rozbijania komórek poszczególnymi metodami względem próby zerowe (oznaczenie glukozy przed dezintegracją – 0%).
- Opisać, jaka z używanych metod jest najbardziej odpowiednia do rozbijania miąższu jabłka.
- We wstępie teoretycznym, proszę podać jaki jest cel stosowania dezintegracji komórek oraz proszę dokładnie opisać tylko jedną metodę dezintegracji komórek – inną niż w ćw. 2 (proszę podać literaturę, z której się korzystało podczas opisywania metody)