



Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

Opracowanie zrealizowano w ramach projektu POIG 01.03.01-00-158/09

Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym

Zadanie badawcze nr 4. Chemoenzymatyczna synteza asymetrycznych fosfonianów.

Politechnika Wrocławska

Metoda otrzymywania aktywnych enzymatycznie ekstraktów bezkomórkowych grzybów.

Otrzymywanie aktywnych enzymatycznie ekstraktów bezkomórkowych grzybów pleśniowych z rodzaju *Penicillium*

Hodowla biomasy

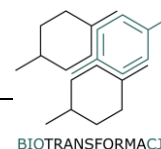
Kolby zawierające 100 ml płynnego podłoża maksymalnego do hodowli grzybów (np. PDB- Potato Dextrose Broth) zaszczyć zarodnikami pleśni. Hodowle prowadzić przez okres 3 dni w temperaturze 25°C na wytrząsarce (150 rpm). Po tym czasie biomasę grzyba oddzielić na drodze sączenia grawitacyjnego wykorzystując sączki papierowe o dużej szybkości sączenia. Uzyskaną biomasę dwukrotnie przepłukać wodą destylowaną lub buforem (0.05M bufor Tris o pH 7.5). Porcję mokrej biomasy (6.5g) umieścić w 15 ml schłodzonego buforu (0.05M bufor Tris o pH 7.5) i przystąpić do procedury dezintegracji.

Procedura dezintegracji

Do rozbicia komórek pleśni zastosować dezintegrator ultradźwiękowy o większej mocy (600W, 20kHz np. Torbeo Ultrasonic Procesor 36800-Series).

Porcję biomasy zawieszoną w buforze przenieść do naczynia do dezintegracji o odpowiedniej objętości, a następnie naczynie umieścić w lodzie. Proces dezintegracji komórek prowadzić w cyklu 30 s emisji ultradźwięków na 2 min chłodzenia w lodzie. Cykl powtarzać do momentu, gdy całkowity czas sonikacji wyniesie 5 min. Aby uzyskać ekstrakt bezkomórkowy pleśni *Penicillium*, mieszaninę po dezintegracji odwirować (6500 rpm, 15 min, 4°C). Uzyskany supernatant stanowi ekstrakt bezkomórkowy, który może być dalej wykorzystany do dalszych badań.

Skuteczność procesu dezintegracji komórek pleśni można potwierdzić mierząc stężenie białka w uzyskanym ekstrakcie bezkomórkowym oraz oznaczając





Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

aktywność specyficzną wybranych enzymów (np. dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu).

Otrzymywanie aktywnych enzymatycznie ekstraktów bezkomórkowych grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus*

Hodowla biomasy

Kolby zawierające 100 ml płynnego podłoża maksymalnego do hodowli grzybów (np. PDB- Potato Dextrose Broth) zaszczyć zarodnikami pleśni. Hodowle prowadzić przez okres 3 dni w temperaturze 25°C na wytrząsarce (150 rpm). Po tym czasie biomasę grzyba oddzielić na drodze sączenia grawitacyjnego wykorzystując sączki papierowe o dużej szybkości sączenia. Uzyskaną biomasę dwukrotnie przepłukać wodą destylowaną lub buforem (0.05M bufor Tris o pH 7.5). Porcję mokrej biomasy (6.5g) umieścić w 15 ml schłodzonego buforu (0.05M bufor Tris o pH 7.5) i przystąpić do procedury dezintegracji.

Procedura dezintegracji

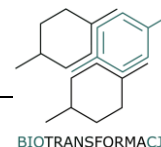
Do rozbicia komórek pleśni zastosować dezintegrator ultradźwiękowy o większej mocy (600W, 20kHz np. Torbeo Ultrasonic Procesor 36800-Series).

Porcję biomasy zawieszoną w buforze, przenieść do naczynia do dezintegracji o odpowiedniej objętości a następnie naczynie umieścić w lodzie. Proces dezintegracji komórek prowadzić w cyklu 11 s emisji ultradźwięków na 2 min chłodzenia w lodzie. Cykl powtarzać do momentu gdy całkowity czas sonikacji wyniesie 2 min. Aby uzyskać ekstrakt bezkomórkowy pleśni *Aspergillus*, mieszaninę po dezintegracji odwirować (6500 rpm, 15 min, 4°C). Uzyskany supernatant stanowi ekstrakt bezkomórkowy, który może być dalej wykorzystany do dalszych badań. Skuteczność procesu dezintegracji komórek pleśni można potwierdzić mierząc stężenie białka w uzyskanym ekstrakcie bezkomórkowym oraz oznaczając aktywność specyficzną wybranych enzymów (np. dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu)

Otrzymywanie aktywnych enzymatycznie ekstraktów bezkomórkowych drożdży z rodzaju *Rhodotorula*

Hodowla biomasy

Kolby zawierające 350 ml płynnego podłoża maksymalnego do hodowli drożdży (np. Malt Extract Peptone Broth) zaszczyć wykorzystując hodowlę drożdży na analogicznym podłożu stałym. Hodowle prowadzić przez okres 5 dni w temperaturze 25°C na wytrząsarce (150 rpm). Po tym czasie biomasę drożdży oddzielić na drodze wirowania (10 min, 4000 rpm, 4°C). Uzyskaną biomasę dwukrotnie przepłukać wodą destylowaną lub buforem (0.05M bufor Tris o pH 7.5). Porcję mokrej biomasy (6.5g) umieścić w niewielkiej ilości schłodzonego buforu (0.05M bufor Tris o pH 7.5) i przystąpić do procedury dezintegracji.





Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

Procedura dezintegracji

Do rozbicia komórek pleśni zastosować młynek kulkowy np. BioSpec BeadBeater (model 1107900).

Porcję biomasy zawieszoną w buforze przenieść do naczynia do dezintegracji i wymieszać, z odpowiednią dla urządzenia, ilością kulek cyrkonowych (średnica 0.7 mm). Kulki powinny zostać schłodzone w zamrażalniku przez co najmniej 12h przed zastosowaniem. W razie potrzeby zawartość naczynia uzupełnić buforem (0.05M bufor Tris o pH 7.5) do poziomu właściwego dla urządzenia. Naczynie zamontować w urządzeniu, stosując lód jako czynnik chłodzący.

Proces dezintegracji komórek prowadzić bez przerwy przez 3 min. Aby uzyskać ekstrakt bezkomórkowy drożdży, mieszaninę po dezintegracji odwirować (6500 rpm, 15 min, 4°C). Uzyskany supernatant stanowi ekstrakt bezkomórkowy, który może być dalej wykorzystany do dalszych badań. Skuteczność procesu dezintegracji komórek drożdży można potwierdzić mierząc stężenie białka w uzyskanym ekstrakcie bezkomórkowym oraz oznaczając aktywność specyficzną wybranych enzymów (np. dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu)

