

Agnieszka ROMBEL-BRYZEK¹, Olga ZHUK¹ i Adam LATAŁA¹

OPTIMALIZACJA PROCESU IMMOBILIZACJI KOMÓREK *Saccharomyces cerevisiae* W ŻELU ALGINIANOWYM

OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION OF *Saccharomyces cerevisiae* CELL IN THE ALGINATE GEL

Abstrakt: Celem prezentowanych badań była ocena wpływu dwuwartościowych kationów wapnia, magnezu i baru, na zdolność sieciowania żelu alginianowego, stosowanego do unieruchamiania komórek *Saccharomyces cerevisiae*, oraz oznaczenie aktywności enzymatycznej dehydrogenazy bursztynianowej w immobilizowanych komórkach. Do immobilizacji komórek *Saccharomyces cerevisiae* wykorzystywano zawiesinę komórek drożdży w alginianie sodu, który następnie żelowano roztworami chlorku wapnia (2, 5, 10 i 30%), chlorku baru (1, 2, 3, 4 i 5%) oraz chlorku magnezu (5%). Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej badano spektrofotometrycznie i mierzono za pomocą ilości zredukowanego błękitu metylenowego (sztuczny akceptor elektronów). Uzyskane wyniki ujawniły, że zarówno stężenie, jak i rodzaj stosowanych jonów mają istotny wpływ na stopień usieciowania żelu alginianowego i w konsekwencji na aktywność enzymatyczną SDH w unieruchomionych komórkach. Spośród zastosowanych kationów metali zdolne do sieciowania alginianu były jony wapnia i baru. Ponadto okazało się, że kationy baru charakteryzują się silniejszym powinowactwem do alginianu, dając silniej usieciowany żel alginianowy. Wykazano, że zbyt silne usieciowanie alginianu może ograniczać wymianę substancji między żelem alginianowym a roztworem mieszaniny reakcyjnej i, w konsekwencji, zaburzać przebieg reakcji enzymatycznej.

Słowa kluczowe: immobilizacja komórek, żel alginianowy

Wstęp

Mikroorganizmy są szeroko stosowane w biotechnologicznej produkcji wielu surowców, m.in. żywności, leków, szczepionek czy środków ochrony roślin. Coraz popularniejsze staje się wykorzystywanie w tych procesach komórek unieruchomionych. Unieruchamianie komórek (immobilizacja) to proces polegający na wiązaniu drobnoustrojów z nośnikiem w celu ograniczenia ich swobodnego ruchu przy jednoczesnym zapewnieniu im dostępu do składników odżywczych i odpływu produktów przemiany. Wykorzystanie komórek immobilizowanych ma wiele zalet w porównaniu z zastosowaniem w procesach komórek wolnych. Między innymi pozwala na prowadzenie procesu w sposób ciągły, łatwiejsze odzyskanie produktu z mieszaniny reakcyjnej, ograniczenie zakażeń mikrobiologicznych, a w konsekwencji zwiększenie wydajności procesu i ograniczenie jego kosztów [1]. Unieruchomione komórki znalazły zastosowanie w medycynie [2], w przemyśle spożywczym [3, 4] czy w ocenie skażenia środowiska [5].

Istnieje wiele metod immobilizacji. Najczęściej stosuje się [1]:

- unieruchomienie na powierzchni nośnika,
- unieruchomienie wewnątrz nośnika,
- unieruchomienie bez nośnika.

¹ Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 6a, 45-032 Opole, tel. 77 401 60 48, email: agarombel@uni.opole.pl

* Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole'15, Jarnołtówek, 14-16.10.2015

Najpopularniejszym naturalnym nośnikiem do unieruchamiania komórek są alginiany, polisacharydy otrzymywane ze ścian komórkowych morskich brunatnic, głównie z rodzaju *Macrocystis*, *Fucus*, *Laminaria*, *Eklonia*, *Ascophyllum* oraz *Pelvetia*, lub produkowane pozakomórkowo przez bakterie z rodzaju *Azotobacter* i *Pseudomonas* [6-8]. W biotechnologii i przemyśle wykorzystuje się głównie sól sodową alginianu [8]. Częsteczką alginianu jest liniowym kopolimerem, złożonym z reszt kwasu D-mannurowego (monomer M) i L-guluronowego (monomer G) połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Monomery w alginianie ułożone są w bloki zbudowane wyłącznie z reszt kwasu guluronowego (GGGGG) lub mannurowego (MMMMM) oraz mieszane (GMGMG) [9, 10]. Struktura alginianu, wynikająca z zawartości poszczególnych monomerów i długości bloków, zależy od gatunku, rodzaju tkanki i pochodzenia geograficznego glonów, i istotnie determinuje jego właściwości jako nośnika [8, 9]. Wzajemne oddziaływanie alginianu z dwu- lub wielowartościowymi kationami prowadzi do tworzenia żeli, przy czym w procesie uczestniczą jedynie homopolimerowe bloki G. Do żelowania (sieciovania) alginianu najczęściej stosuje się jony wapniowe (Ca^{2+}), jednak proces ten można również przeprowadzić przy użyciu innych jonów metali, takich jak: ołów, miedź, kadm, bar, kobalt, stront, cynk, nikiel, mangan, żelazo i glin [8, 10]. Główną zaletą pułapkowania komórek w alginianie wapnia jest prostota i niskie koszty procesu, a także nietoksyczność i wysoka stabilność mechaniczna żeli [11].

Dehydrogenaza bursztynianowa (SDH), znana również jako kompleks II lub oksydoreduktaza bursztynian-ubichinon, to enzym uczestniczący w produkcji, w warunkach tlenowych, energii w komórkach eukariotycznych oraz prokariotycznych. Jest jednym z enzymów biorących udział w cyklu kwasów trójkarboksylowych - katalizuje reakcję utleniania bursztynianu do fumaranu, z jednoczesną redukcją dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD). FAD stanowi grupę prostetyczną enzymu i jest z nim ściśle powiązany. Dwa elektrony pochodzące z kompleksu dehydrogenaza bursztynianowa - zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy (SDH - FADH_2) są następnie przenoszone na ubichinon. Dehydrogenaza bursztynianowa wyróżnia się spośród pozostałych enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych, gdyż jako jedyna jest integralnym składnikiem wewnętrznej błony mitochondrialnej [12, 13].

Dehydrogenaza bursztynianowa przenosi wodory nie tylko na fizjologiczny akceptor, którym jest FAD, lecz również na нефizjologiczne (sztuczne) akceptory, takie jak 2,6-dichlorofenoloindofenol (DCIP), sole tetrazoliowe czy błękit metylenowy [12, 14]. Fakt ten jest wykorzystywany w badaniach dotyczących aktywności enzymatycznej dehydrogenazy bursztynianowej. W niniejszej pracy miarą aktywności enzymatycznej SDH była zmiana zabarwienia błękitu metylenowego, który w postaci utlenionej jest niebieski, zaś w postaci zredukowanej (po przyłączeniu wodorów) jest bezbarwny (biel metylenowa).

Dehydrogenaza bursztynianowa jest stosowana jako marker enzymatyczny mitochondriów, pozwala określać poziom aktywności cyklu kwasów trójkarboksylowych i łańcucha oddechowego oraz daje możliwość wykrywania zaburzeń w przebiegu tych procesów [15, 16]. Badanie aktywności SDH jest wykorzystywane również w ocenie żywotności drożdży stosowanych w procesach biotechnologicznych [14].

Celem badań była ocena wpływu dwuwartościowych kationów wapnia, magnezu i baru na zdolność sieciovania żelu alginianowego stosowanego do unieruchamiania

komórek *Saccharomyces cerevisiae* oraz oznaczenie aktywności enzymatycznej dehydrogenazy bursztynianowej w immobilizowanych komórkach.

Materiały i metody badań

Unieruchamianie komórek Saccharomyces cerevisiae w żelu alginianowym

Do immobilizacji komórek *Saccharomyces cerevisiae* wykorzystywano 2% wodny roztwór alginianu sodu (Carl Roth), w którym zawieszano komórki *S. cerevisiae* w proporcji 1 g na 4 cm³ roztworu alginianu. Następnie za pomocą strzykawki pobierano 8 cm³ zawiesiny komórek w alginianie i wkraplano do zlewki zawierającej 50 cm³ roztworu soli sieciującej. Do żelowania alginianu (sieciowania) stosowano roztwory chlorku wapnia o stężeniach 2, 5, 10 i 30%, chlorku baru o stężeniach 1, 2, 3, 4 i 5% oraz chlorku magnezu o stężeniu 5%. Powstające kulki żelu alginianowego z unieruchomionymi komórkami kondycjonowano w roztworach soli przez 15 minut, a następnie odsączano na lejku Büchnera i przemywano trzykrotnie wodą demineralizowaną w celu usunięcia z powierzchni kulek niezwiązanych komórek [17 - zmodyfikowana]. Dla każdego stężenia soli przygotowywano kulki żelu alginianowego z unieruchomionymi komórkami w pięciu powtórzeniach.

Badanie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w unieruchomionych komórkach Saccharomyces cerevisiae

W celu zbadania aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w unieruchomionych komórkach *S. cerevisiae* sporządzono mieszaninę reakcyjną o składzie: 10 cm³ 0,1 M buforu fosforanowego o pH 6,0, 1 cm³ 50 mM bursztynianu sodu, 3 cm³ 0,16 mM błękitu metylenowego i 31 cm³ wody demineralizowanej. Dokonywano pomiaru absorbancji mieszaniny reakcyjnej przy długości fali $\lambda = 664$ nm (maksimum absorbancji błękitu metylenowego wyznaczone doświadczalnie) wobec wody w celu określenia początkowego stężenia błękitu metylenowego w mieszaninie (próba kontrolna). Następnie do kolbek zawierających mieszaninę reakcyjną wprowadzono kulki żelu alginianowego z unieruchomionymi komórkami *S. cerevisiae* i inkubowano w łaźni wodnej przez 120 min w temperaturze 37°C. Po tym czasie dokonywano ponownego pomiaru wartości absorbancji mieszaniny reakcyjnej przy długości fali $\lambda = 664$ nm w celu oznaczenia stężenia końcowego błękitu metylenowego w mieszaninie reakcyjnej. Stężenie początkowe i końcowe błękitu metylenowego w mieszaninie reakcyjnej oznaczano za pomocą równania krzywej standardowej, opisującej zależność wartości absorbancji od stężenia błękitu metylenowego (0-0,04 mM). Pomiar spektrofotometryczny wykonywano za pomocą spektrofotometru UV/VIS UV-2601 (RayLeigh).

Mikroskopowa ocena struktury złoża aglinianowego z unieruchomionymi komórkami Saccharomyces cerevisiae

Kulki żelu alginianowego po reakcji wyciągano z mieszaniny reakcyjnej i zamrażano w temperaturze -20°C, a następnie za pomocą mikrotomu mroźniowego (Leica, CM 1100) krojono na skrawki o grubości 20 μ m. Skrawki umieszczano na szkiełku podstawowym i obserwowano pod mikroskopem świetlnym (Olympus, BX 41).

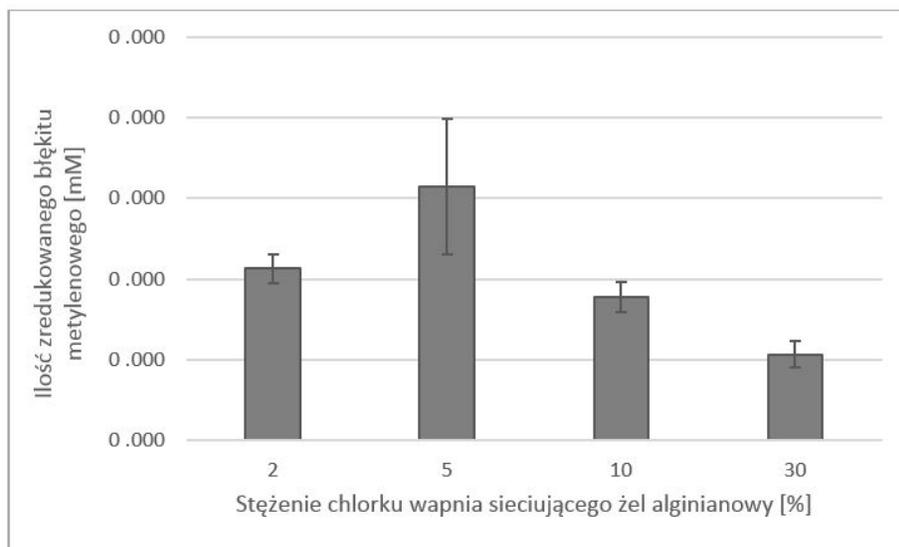
Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą testu t-Studenta oraz jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) przy użyciu programu Microsoft Excel, przyjmując wyniki za istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

Wpływ stężenia chlorku wapnia na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w immobilizowanych komórkach Saccharomyces cerevisiae

Pierwszym etapem pracy była ocena aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w immobilizowanych komórkach *Saccharomyces cerevisiae* w zależności od stężenia chlorku wapnia stosowanego do sieciowania żelu alginianowego. Aktywność enzymu wyrażano za pomocą ilości zredukowanego błękitu metylenowego w czasie 120 minut, obecnego w mieszaninie reakcyjnej. Najwyższą aktywność dehydrogenaza bursztynianowa wykazywała w komórkach *S. cerevisiae* immobilizowanych w żelu alginianowym sieciowanym za pomocą 5% roztworu chlorku wapnia. Niższą aktywność wykazywał enzym w komórkach unieruchomionych w żelu alginianowym za pomocą 2 i 10% roztworu chlorku wapnia, a najniższą - gdy do sieciowania zastosowano roztwór soli o stężeniu 30% (rys. 1).



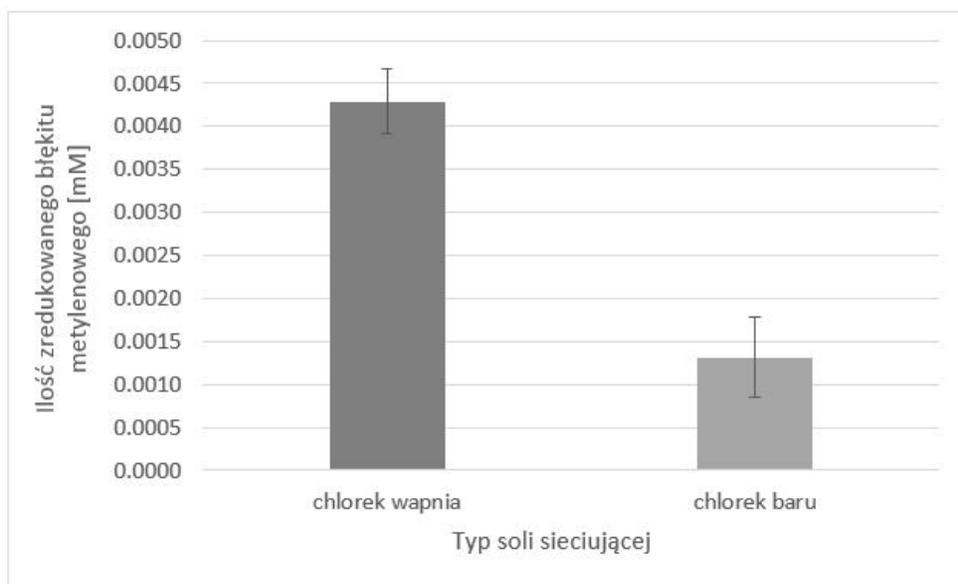
Rys. 1. Ilość zredukowanego błękitu metylenowego w czasie 120 minut przez dehydrogenazę bursztynianową w immobilizowanych komórkach *Saccharomyces cerevisiae* w zależności od stężenia chlorku wapnia stosowanego do sieciowania żelu alginianowego. Różnice istotne statystycznie na poziomie $p = 0,031$ (ANOVA)

Fig. 1. The reduced amount of methylene blue in 120 minutes by a succinate dehydrogenase in immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* depending on the concentration of calcium chloride used to crosslink the alginate gel. Statistically significant differences at the level of $p = 0.031$ (ANOVA)

Wpływ czynników sieciujących żel alginianowy na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w immobilizowanych komórkach Saccharomyces cerevisiae

Kolejnym etapem prezentowanych badań była ocena wpływu czynników sieciujących alginian na aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w immobilizowanych komórkach *Saccharomyces cerevisiae*. Do sieciowania alginianu zastosowano roztwory trzech soli: chlorku wapnia, chlorku magnezu i chlorku baru, wszystkie o stężeniu 5%, ponieważ takie stężenie chlorku wapnia okazało się optymalne dla aktywności SDH w immobilizowanych komórkach.

W wyniku sieciowania alginianu roztworem chlorku wapnia i roztworem chlorku baru otrzymywano żel alginianowy w formie kulek o podobnej wielkości. W przypadku roztworu chlorku magnezu uzyskiwano żel alginianowy w postaci dysków, które po krótkim czasie ulegały rozpadowi, co wskazuje, że zastosowanie tej soli nie powoduje sieciowania alginianu.



Rys. 2. Ilość zredukowanego błękitu metylenowego w czasie 120 minut przez dehydrogenazę bursztynianową w immobilizowanych komórkach *Saccharomyces cerevisiae* w zależności od rodzaju soli stosowanej do sieciowania żelu alginianowego. Stosowano roztwory soli o stężeniu 5%. Różnice istotne statystycznie na poziomie $p = 0,001$ (ANOVA)

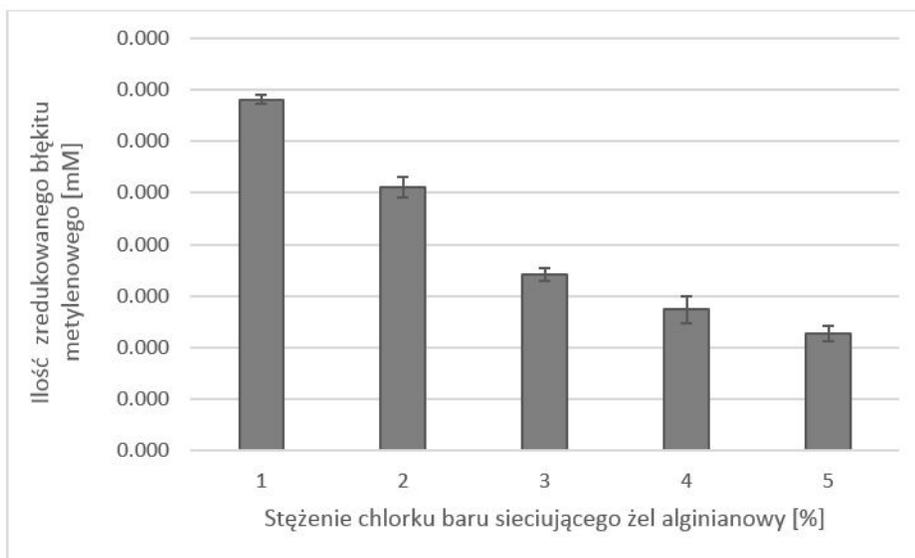
Fig. 2. The reduced amount of methylene blue in 120 minutes by succinate dehydrogenase in immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* depending on the type of the salt used for cross-linking of the alginate gel. Salt solutions were used at a concentration of 5%. Statistically significant differences at the level of $p = 0.001$ (ANOVA)

Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej, podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, wyrażano za pomocą ilości zredukowanego błękitu metylenowego w czasie 120 minut, składnika mieszaniny reakcyjnej. Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę

bursztynianową w komórkach *S. cerevisiae* immobilizowanych w żelu alginianowym sieciowanym za pomocą chlorku wapnia i chlorku baru, powodowała redukcję błękitu metylenowego do bezbarwnej bieli metylenowej. Jednakże zaobserwowano, że aktywność SDH w immobilizowanych komórkach w żelu alginianowym sieciowanym roztworem chlorku wapnia była niemal trzykrotnie większa w porównaniu z aktywnością enzymu w komórkach unieruchomionych w żelu alginianowym sieciowanym roztworem chlorku baru (rys. 2). Można zatem wysunąć przypuszczenie, że jony baru wykazują większe powinowactwo do alginianu niż jony wapnia, mocniej sieciują alginian, co w konsekwencji ogranicza dostęp enzymu do substratu i „sztucznego” akceptora.

Wpływ stężenia chlorku baru na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w immobilizowanych komórkach Saccharomyces cerevisiae

Otrzymane wyniki dotyczące aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach *S. cerevisiae* unieruchomionych w żelu alginianowym sieciowanym 5% chlorkiem baru skłoniły do zbadania aktywności enzymu w komórkach unieruchomionych w żelu sieciowanym roztworami tej soli o niższych stężeniach. W tym celu do sieciowania alginianu zastosowano roztwory chlorku baru o stężeniach 1, 2, 3, 4 i 5%.



Rys. 3. Średnia ilość zredukowanego błękitu metylenowego w czasie 120 minut przez dehydrogenazę bursztynianową w immobilizowanych komórkach *Saccharomyces cerevisiae* w zależności od stężenia chlorku baru stosowanego do sieciowania żelu alginianowego. Różnice istotne statystycznie na poziomie $p < 0,001$ (ANOVA)

Fig. 3. The average reduced amount of methylene blue for 120 minutes by a succinate dehydrogenase in immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* depending on the concentration of barium chloride used to crosslink the alginate gel. Statistically significant differences at the level of $p < 0,001$ (ANOVA)

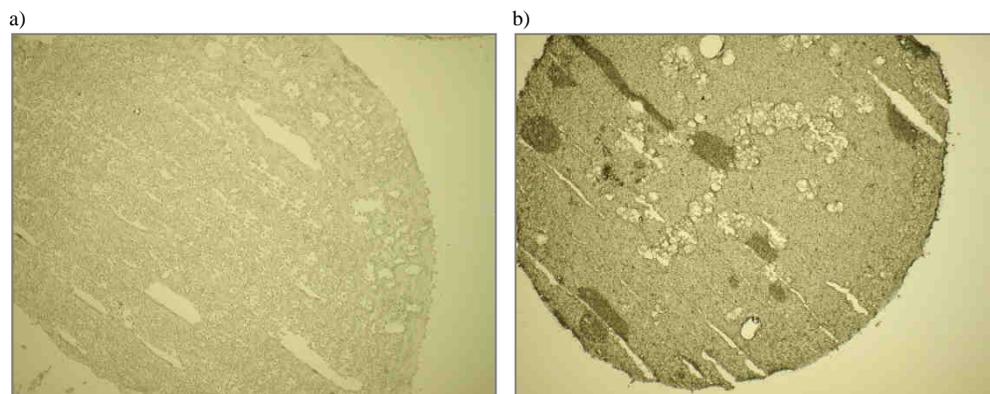
Zaobserwowano, że aktywność SDH, wyrażona stopniem redukcji błękitu metylenowego obecnego w mieszaninie reakcyjnej, była największa w komórkach immobilizowanych w żelu alginianowym sieciowanym 1% roztworem chlorku baru i stopniowo spadała wraz ze wzrostem stężenia roztworu soli (rys. 3). Uzyskany wynik pozwala przypuszczać, że wraz ze wzrostem stężenia roztworów soli następuje silniejsze usieciowanie żelu alginianowego i w konsekwencji mniejszy dostęp enzymu do substratów.

Mikroskopowa ocena struktury żelu alginianowego z unieruchomionymi komórkami Saccharomyces cerevisiae

W celu zweryfikowania hipotezy o silniejszym powinowactwie jonów baru do alginianu w porównaniu do jonów wapnia dokonywano obserwacji mikroskopowej skrawków mrożeniowych kulek żelu alginianowego (rys. 4).

Na obrazach mikroskopowych wyraźnie widać różnicę w strukturze kulki żelu alginianowego z unieruchomionymi komórkami *S. cerevisiae* w zależności od użytej soli. Sieciowanie alginianu sodu przy użyciu 5% roztworu chlorku baru spowodowało gęstsze usieciowanie polimeru i otrzymanie zwartej struktury o mniejszej licznie porów wypełnionych roztworem i komórkami.

Różnice w strukturze mikroskopowej żelu alginianowego wskazują na przyczynę trzykrotnie mniejszej aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach drożdży immobilizowanych w żelu alginianowym sieciowanym przy użyciu 5% roztworu chlorku baru w porównaniu do aktywności enzymu w komórkach unieruchomionych w żelu sieciowanym 5% roztworem chlorku wapnia. Gęstsze usieciowane alginianu z pewnością ogranicza wymianę substancji między żelem alginianowym a roztworem mieszaniny reakcyjnej i w konsekwencji będzie miało wpływ na przebieg reakcji enzymatycznej.



Rys. 4. Obraz mikroskopowy skrawka mrożeniowego żelu alginianowego sieciowanego 5% roztworem chlorku wapnia (A) i 5% roztworem chlorku baru (B), pow. 4x

Fig. 4. Microscope image of freezing slide of alginate gel cross-linked by 5% solution of calcium chloride (A) and 5% solution by barium chloride (B), magn. 4x

Podsumowanie i wnioski

W prezentowanych badaniach oceniano wpływ dwuwartościowych kationów wapnia, magnezu i baru na stopień usieciowania żelu alginianowego, stosowanego do unieruchamiania komórek *Saccharomyces cerevisiae*, oraz oznaczano aktywność enzymatyczną dehydrogenazy bursztynianowej w immobilizowanych komórkach. Uzyskane wyniki ujawniły, że zarówno stężenie, jak i rodzaj stosowanych jonów mają istotny wpływ na stopień usieciowania żelu alginianowego i w konsekwencji na aktywność enzymatyczną SDH w unieruchomionych komórkach.

Spośród zastosowanych kationów metali zdolne do sieciowania alginianu były jony wapnia i baru, podczas gdy takich właściwości nie wykazywały jony magnezu. Ponadto okazało się, że kationy wapnia i baru charakteryzują się odmiennym powinowactwem do alginianu. Jony baru dają żel bardziej usieciowany w porównaniu do żelu otrzymanego podczas sieciowania jonami wapnia. Potwierdziła to znacząco niższa aktywność SDH w komórkach *S. cerevisiae* immobilizowanych w żelu sieciowanym jonami baru w porównaniu do aktywności oznaczonej w komórkach unieruchomionych w żelu alginianowym za pomocą chlorku wapnia. Wynika to prawdopodobnie z ograniczonego w tych warunkach dostępu enzymu do substratów, co wyjaśniła obserwowana zwarta struktura żelu widoczna w obrazach mikroskopowych skrawków mrożeniowych badanych żeli. Dodatkowo badania ujawniły, że spośród stężeń chlorku wapnia stosowanego do sieciowania alginianu (2, 5, 10, 30%) optymalne dla aktywności SDH okazało się sieciowanie alginianu za pomocą 5% roztworu soli. Zastosowanie do sieciowania alginianu 10 i 30% roztworów chlorku wapnia wyraźnie powodowało spadek aktywności SDH w unieruchomionych komórkach. Podobną tendencję stwierdzano, badając aktywność SDH w komórkach *S. cerevisiae* unieruchomionych w żelu sieciowanym chlorkiem baru, im wyższe stężenie zastosowanego roztworu soli, tym niższa aktywność enzymu. Pozwala to na sformułowanie wniosku, że zbyt silne usieciowanie alginianu ogranicza wymianę substancji między żelem alginianowym a roztworem mieszaniny reakcyjnej i w konsekwencji zaburza przebieg reakcji enzymatycznej.

Podziękowania

Składamy serdecznie podziękowania Pani Iwonie Kluczny i Panu Patrykowi Zajączowi za pomoc w części doświadczalnej pracy.

Literatura

- [1] Bonin S. Mikroorganizmy immobilizowane. *Agro Przem.* 2008;6:20-23. http://www.trusz-zdybek.pl/zalaczniki/zalacznik_121.pdf.
- [2] Bakula Z, Stachowiak R, Wiśniewski J, Granicka L, Bielecki J. Immobilizacja komórek - znaczenie biomedyczne. *Postępy Mikrobiol.* 2013;52:233-245. www.pm.microbiology.pl/web/archiwum/vol5232013233.pdf.
- [3] Bonin S. Zastosowanie mikroorganizmów immobilizowanych w winiarstwie. *Żywn Nauka Technol Jakość.* 2008;3:5-15. http://yadda.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-d25757a9-70a5-408d-9854-813460103b14/c/01_Bonin.pdf.
- [4] Champagne CP, Lacroix C, Sodini-Gallot I. Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Crit Rev Biotechnol.* 1994;14:109-134. DOI: 10.3109/07388559409086964.
- [5] Kossakowska A, Król D. Immobilizowane komórki glonów w ocenie toksyczności miedzi. *Rocz Ochr Środ.* 2009;11:105-1117. http://ros.edu.pl/images/roczniki/archive/pp_2009_082.pdf.

- [6] Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization; an overview on techniques and support materials. 3 Biotech. 2013;3:1-9. DOI: 10.1007/s13205-012-0071-7.
- [7] Dembczyński R, Jankowski T. Unieruchamianie komórek drobnoustrojów metodą kapsułkowania - stan obecny i możliwości rozwoju tej metody. Żywn Nauk Technol Jakość. 2004;4:5-17. http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-f22637f7-45a1-4955-a1ce-b02c477b6f47/c/01_Dembczynski.pdf.
- [8] Grassi M, Sandolo C, Perin D, Coviello T, Lapasin R, Grassi G. Structural characterization of calcium alginate matrices by means of mechanical and release tests. Molecules. 2009;14:3003-3017. DOI: 10.3390/molecules14083003.
- [9] Wrzeszcz K, Marycz K, Zimoch A, Jarmoluk A. Sיעiowanie alginianu sodu dla hydrożeli dla inżynierii tkankowej. Przem Chem. 2013;92:1018-1022. <http://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element.baztech-e84e2397-76f2-4346-b7ac-1eb92cccaad9>.
- [10] Wyrębska Ł, Szuster L, Stawska H. Synteza i aplikacja nowych pochodnych wybranych polisacharydów. Część I: Przegląd literatury. Technologia i Jakość Wyrobów 2014;59:3-16. http://www.ips.lodz.pl/sites/default/files/synteza_i_aplikacja_nowych_pochodnych_wybranych_polisacharydow.pdf.
- [11] Flores-Maltos A, Rodríguez-Durán L, Renorato J, Contreras JC, Rodríguez R, Aguilar CN. Catalytical properties of free and immobilized *Aspergillus niger* tannase. Enzyme Res. 2011. DOI: 10.4061/2011/768183.
- [12] Kregiel D. Succinate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* - the unique enzyme of TCA cycle - current knowledge and new perspectives. W: Canuto RA, redaktor. Dehydrogenases. InTech; 2012;211-216. DOI: 10.5772/48413.
- [13] Oyedotun K.S., Lemire B.D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking and molecular dynamics simulation studies. J Biol Chem. 2004;279:9424-9431. <http://www.jbc.org/content/279/10/9424.full.pdf>.
- [14] Cammack R. Assay of the enzymes with insoluble or unknown substrates: the membrane-bound quinone reductases as an example. <http://www.beilstein-institut.de/escec2006/proceedings/Cammack/Cammack.pdf>.
- [15] Shaw CB, Chronister TL, Pech JD. Optimal conditions for kinetic study of succinate dehydrogenase in rat liver. Proc Ark Acad Sci. 1986;40:62-66. <https://libinfo.uark.edu/aas/issues/1986v40/v40a19.pdf>.
- [16] Lemire BD, Oyedotun KS. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate: ubiquinone oxidoreductase. Biochim Biophys Acta. 2002;1553:102-116. DOI: 10.1016/S0005-2728(01)00229-8.
- [17] Duarte JC, Rodrigues JAR, Moran PJS, Valença GP, Nunhez JR. Effect of immobilized cell in calcium alginate beads in alcoholic fermentation. AMB Express. 2013;3:31. DOI: 10.1186/2191-0855-3-31.

OPTIMIZATION OF IMMOBILIZATION OF *Saccharomyces cerevisiae* CELL IN THE ALGINATE GEL

Chair of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of divalent cations, calcium, magnesium and barium, for the ability to crosslink the alginate gel. The alginate gel was used to immobilize cells of *Saccharomyces cerevisiae*. The enzymatic activity of succinate dehydrogenase in the immobilized cells was determined. A suspension of yeast cells in sodium alginate, was gelation by solutions of calcium chloride (2, 5, 10 and 30%), barium chloride (1, 2, 3, 4, and 5%) and magnesium chloride (5%). Succinate dehydrogenase activity was tested spectrophotometrically and measured using a reduced amount of methylene blue (an artificial electron acceptor). The results revealed that both the concentration and type of ions employed are important to the degree of cross-linking of the alginate gel and consequently on the enzymatic activity of the SDH immobilized cells. Among the used metal cations capable of crosslinking the alginate are calcium and barium. It was also shown that the barium cations have a stronger affinity for the alginate, to give highly crosslinked alginate gel. It has been shown that too strong cross-linked alginate may limit the exchange of substances between the alginate gel and the solution of the reaction mixture, and consequently interfere with the course of the enzymatic reaction.

Keywords: cell immobilization, alginate gel