



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.01.03.01-00-158/09-06

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

Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym

Zad.3 . Funkcjonalne polimery z immobilizowanymi enzymami do prowadzenia biotransformacji w reaktorach okresowych i przepływowych

Politechnika Wroclawska

Dr hab. Jolanta Bryjak Prof. PWr.

Zarys technologii otrzymywania immobilizowanej lakazy i tyrozynazy o podwyższonej stabilności operacyjnej.,

Wstęp

Systematycznie rosnące zainteresowanie przemysłową biokatalizą wynika z dużej specyficzności substratowej, regio-, chemo-, i stereospecyficzności oraz wysokiej produktywności biokatalizatorów w łagodnej temperaturze i przy ciśnieniu atmosferycznym. Podstawowe zalety biotransformacji mikrobiologicznych i enzymatycznych nie zawsze są wystarczające, aby zastąpić istniejące już procesy chemiczne, jakkolwiek obserwuje się znaczący postęp. Wymiernym efektem badań nad ukierunkowaną ewolucją po dobór technik immobilizacji jest otrzymywanie bardziej aktywnych i stabilnych biokatalizatorów, mogących konkurować z tradycyjnymi technologiami.

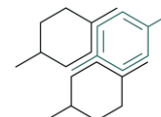
Przemysłowe wykorzystanie enzymów jest często związane z ich immobilizacją na/w nośniku, która ma na celu zwiększenie stabilności biokatalizatora i ułatwienie jego odzysku z mieszaniny poreakcyjnej. Alternatywą do stosowania nośników może być wykorzystanie membran półprzepuszczalnych, które są istotnym elementem reaktorów membranowych. Głównym celem opracowania jest prezentacja metod otrzymywania immobilizowanej lakazy i tyrozynazy z wykorzystaniem podstawowych technik immobilizacji na nośnikach nierozpuszczalnych w wodzie, których parametry fizykochemiczne zostały dostosowane do potrzeb obu enzymów.

Generalnie, siły wiążące enzym wahają się od słabych oddziaływań w adsorpcji fizycznej po wiązania kowalencyjne. Mimo że dobór metody immobilizacji do enzymu i potencjalnego procesu odbywa się metodą prób i błędów, przedstawiono szereg generalnych zasad odnośnie wiązania lakazy i tyrozynazy.

Dobór podstawowych metod immobilizacji

Enzymy stosowane w biotransformacjach w środowiskach wodnych oraz na potrzeby przemysłu farmaceutycznego zdecydowanie najczęściej są immobilizowane poprzez wytworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy grupami funkcyjnymi białka i nośnika. Ponieważ liczne opracowania książkowe i publikacje przeglądowe wyczerpująco omawiają zagadnienia związane z chemicznymi modyfikacjami nośników i reakcjami wiązania enzymów, tu ograniczono się do przedstawienia bardzo ogólnych wiadomości.

Immobilizacja kowalencyjna jest to metoda wymagająca znajomości podatności i dostępności grup funkcyjnych białka w wybranym sposobie wiązania, a także prawdopodobieństwa wystąpienia inaktywacji enzymu w warunkach jego tworzenia. Ponieważ prawdopodobieństwo





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.01.03.01-00-158/09-06

występowania poszczególnych aminokwasów na powierzchni białka, jak i ich reaktywność w danych warunkach wiązania (pH, temperatura, obecność rozpuszczalników organicznych), często nie są znane, wybór metody ma zwykle charakter przypadkowy. Teoretyczne wskazania są takie, żeby w wiązaniu kowalencyjnym wykorzystywać te grupy funkcyjne, które są podatne na modyfikację chemiczną i nie są zaangażowane w działalność katalityczną enzymu oraz nie biorą bezpośredniego udziału w stabilizacji struktury III- i IV-rzędowej białka. Rozpatrując około 20 aminokwasów białkowych, najczęściej w reakcjach wiązania kowalencyjnego wykorzystuje się ugrupowanie tiolowe cysteiny, fenolowe tyrozyny, imidazolowe histydyny i aminowe lizyny, ze szczególnym podkreśleniem ostatniego aminokwasu.

Rozpatrując grupy funkcyjne nośników, produkowanych w skali przemysłowej i laboratoryjnej, do wytworzenia wiązania kowalencyjnego z białkiem przede wszystkim stosuje się aminy aromatyczne i I-rzędowe, grupy hydroksylowe i karboksylowe oraz oksiranowe. Obecność grup funkcyjnych na/w nośniku wynika albo z jego składu (np.: nośniki organiczne z polimerów naturalnych), albo jest wynikiem wprowadzenia na etapie jego syntezy. W pozostałych przypadkach nośnik musi być poddany funkcjonalizacji najczęściej metodami chemicznymi. O efekcie końcowym immobilizacji często decyduje ilość, jakość i dystrybucja grup funkcyjnych na/w nośniku. Z kolei grupy funkcyjne nośnika muszą być aktywowane, z wykluczeniem takiej konieczności w przypadku występowania grup oksiranowych. W Tabeli 1 zestawiono zwykle stosowane metody aktywacji grup funkcyjnych nośników.

Tabela 1. Najczęściej aktywowane grupy funkcyjne nośników, odpowiednie do grup funkcyjnych aktywatory oraz wartości pH, w których wiązaniu z nośnikiem ulegają określone ugrupowania funkcyjne białka

Grupa funkcyjna nośnika	Grupa funkcyjna białka	Czynnik wiążący/aktywujący	Wartość pH wiązania białka
-COOH	-NH ₂	karbodiimid	3,5 – 4,5
	-COOH	izocyjanki	4,0 – 8,0
	-NH ₂ , -SH, -OH	metoda azydkowa	8,0 – 9,0
-NH ₂	-NH ₂	aldehyd glutarowy	6,0 – 8,0
	-NH ₂	kwask askorbinowy	6,0 – 7,0
	-COOH	karbodiimid	3,5 – 4,5
	-COOH	izocyjanki	4,0 – 8,0
	-NH ₂	triazol	7,5 – 9,5
-OH	-NH ₂	diwinylosulfon	8,0 – 10,0
	-SH		9,0 – 11,0
	-OH		11,0 – 13,0
	-NH ₂	nadjodan sodu i aminacja redukcyjna	7,0 – 11,0
	-NH ₂	bromocyjan	8,0 – 10,0
	-NH ₂	hydrazyna	7,0 – 9,0
	-NH ₂	benzochinon	7,0 – 9,0
	-NH ₂	nadjodan sodu	7,5 – 8,5
	-NH ₂	trichloro-s-triazyna	7,05 – 9,0
	-OH		
	-NH ₂	karbodiimid	8,0 – 9,5
	-NH ₂	chlorek tresylu	7,5 – 10,5
	-OH	sole diazoniowe	6,0 – 8,0
-NH ₂	mrówczan p-nitrofenylu	8,5 – 9,5	



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.01.03.01-00-158/09-06

Ogólnie, celem wytworzenia wiązania kowalencyjnego pomiędzy enzymem a nośnikiem, jeden z tych elementów musi być poddany aktywacji. Ponieważ część procedur wywołuje denaturację enzymu, a usunięcie nadmiaru aktywatora z roztworu białka stanowi dodatkowe utrudnienie, najczęściej aktywacji poddawane są grupy funkcyjne nośnika. W Tabeli 1 zamieszczono również wartości pH, w których dochodzi do statystycznie częstszego wiązania białka poprzez wymienioną grupę funkcyjną biokatalizatora. Wielość dostępnych procedur aktywacji nośników i wiązania białka można znacząco obniżyć, eliminując metody wykorzystujące odczynniki silnie toksyczne (np. bromocyan), czy metody wieloetapowe lub z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych (większość w tabeli). Z kolei uwzględniając fakt, że grupy aminowe lizyny rzadko są zaangażowane w budowę centrum aktywnego i statystycznie częściej znajdują się na powierzchni białka, liczbę metod immobilizacji kowalencyjnej z nośnikiem można racjonalnie zredukować do trzech podstawowych, zaznaczonych kolorem żółtym w Tabeli 1:

- a. wiązanie grup aminowych nośnika z grupami aminowymi białka poprzez aldehyd glutarowy;
- b. wiązanie grup hydroksylowych nośnika z grupami aminowymi białka poprzez diwinylosulfon;
- c. wiązanie grup karboksylowych nośnika z grupami aminowymi białka poprzez wytworzenie wiązania amidowego, katalizowanego z udziałem karbodiimidu.

Typowa procedura immobilizacji poprzez wytworzenie wiązań kowalencyjnych rozpoczyna się od podania warunków i czasu aktywacji, odmycia nadmiaru aktywatora oraz warunków i czasu niezbędnego do wytworzenia wiązania kowalencyjnego białko-nośnik. Przeciętnie czas tworzenia tego wiązania jest znacznie dłuższy niż 2 h (czas niezbędny w procesie adsorpcji, poprzedzającej etap tworzenia wiązania kowalencyjnego) i decyduje o prawdopodobieństwie utworzenia wiązań pojedynczych lub wielokrotnych. Po tym etapie następuje odmywanie niezwiązanego białka (zwykle 50-90 % całości danej do immobilizacji) i blokowanie nadmiaru grup reaktywnych nośnika. Cała procedura trwa od 2 do 3 dni. O efekcie końcowym immobilizacji (ilość i aktywność związanego białka) głównie decydują: powierzchnia nośnika dostępna dla białka; ilość zaktywowanych grup funkcyjnych nośnika; rodzaj czynnika wiążącego enzym z nośnikiem; dostępność grup funkcyjnych białka w danym pH; odległość związanego enzymu od powierzchni nośnika oraz orientacja przestrzenna centrum aktywnego; mono- lub wielopunktowe wiązanie enzymu z nośnikiem; powinowactwo chemiczne enzymu do materiału nośnika.

Celem nadrzędnym immobilizacji kowalencyjnej jest trwałe wiązanie enzymu z nośnikiem, jednak obok dodatkowych korzyści, jak zwiększenie odporności biokatalizatora na denaturanty czy podwyższoną temperaturę przez usztywnienie konformacji białka, mogą pojawić się zjawiska niekorzystne, obniżające aktywność preparatu. Przede wszystkim część białka ulega nieodwracalnej denaturacji na skutek modyfikacji chemicznej lub utworzeniu wiązania z aminokwasem z centrum aktywnego. Wiązanie chemiczne może również indukować rozfałdowanie struktury III-rzędowej białka, a centrum aktywne może być niekorzystnie zorientowane względem powierzchni nośnika. Z kolei wiązanie wielopunktowe, zwiększając stabilność enzymu, zwiększa też prawdopodobieństwo jego uszkodzenia. Natomiast nadmiar związanego białka często wywołuje przeszkody steryczne w dotarciu substratu do enzymu. Należy zatem tak projektować doświadczenia, aby przy minimalnej ilości nośników o zróżnicowanych ugrupowaniach funkcyjnych i metodach ich aktywacji, można było wyselekcjonować preferowaną przez enzym metodę immobilizacji, przy jednoczesnej zwiększonej stabilności.



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.01.03.01-00-158/09-06

Dobór podstawowych nośników do immobilizacji enzymów

Nośniki stosowane do immobilizacji enzymów można podzielić wielorako. Uwzględniając ich kształt, najczęściej wykorzystuje się różne formy granulatów (kulki, elipsoidy obrotowe, proszki, nieregularne ziarna) oraz, rzadziej, filmy, membrany mikro- i ultrafiltracyjne, powierzchnie płaskie i włókna. Nośniki można także podzielić na nieporowate i porowate (o kontrolowanych rozmiarach porów, o zróżnicowanych porach, o strukturze żelowej) lub ze względu na materiał, z którego nośnik został wykonany. Ostatni typ podziału jest najbardziej popularny i zgodnie z nim wyróżnia się:

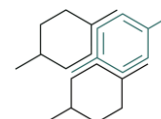
1. nośniki nieorganiczne a w tym otrzymane z minerałów surowych (np.: bentonit, piasek, pumeks) lub przetworzonych (metale i tlenki metali, szkło nieporowate lub o kontrolowanych porach), zeolity;
2. nośniki organiczne pochodzenia naturalnego (np.: celuloza, dekstran, jedwab, karaginy, chityna, aktywowany węgiel) lub z polimerów syntetycznych (np.: polistyreny, poliakrylany, polimetakrylany glicydyłu, polimery winylowe, poliamidy);
3. nośniki hybrydowe nieorganiczno-organiczne (np.: kompozyty z alkoholami metali typu żel lub będące mieszaniną polimerów naturalnych i syntetycznych).

Teoretycznie, nośniki nieorganiczne posiadają najwięcej potencjalnych zalet w zastosowaniach przemysłowych: inertne dla środowiska, odporne fizycznie, chemicznie i biologicznie, duży wybór preparatów handlowych, większość może być regenerowana przez pirolizę. W porównaniu z nośnikami syntetycznymi, nośniki nieorganiczne rzadko negatywnie wpływają na strukturę białka, za to wiążą go w niewielkich ilościach ze względu na niewielką liczbę grup aktywnych chemicznie.

Wśród nośników organicznych, pochodzenia naturalnego, dominują matryce bazujące na polisacharydach. Biodegradowalność, duża powierzchnia właściwa tych nośników oraz duża ilość grup aktywnych chemicznie wraz z łatwością ich modyfikacji towarzyszy zwykle znaczącej pojemności sorpcyjnej, przy zadawalających właściwościach mechanicznych.

Najliczniejszą grupą nośników są nośniki z polimerów syntetycznych. Duża ilość rodzajów polimerów i różnorodność ich pochodnych, doprowadziła do zdominowania rynku nośników do immobilizacji. Odporność na warunki fizykochemiczne oraz działalność mikroorganizmów i enzymów stawia je pomiędzy nośnikami nieorganicznymi i z materiałów naturalnych. Nośniki z syntetycznych polimerów mogą być porowate i nieporowate, o dowolnych kształtach, a struktura może być od elastycznej po sztywną. Ich charakter hydrofobowy, działający niekorzystnie na większość enzymów, może być zmieniony modyfikacją chemiczną gotowych nośników lub doбором odpowiednich komonomerów. Do cech ujemnych zalicza się obciążające środowisko warunki syntezy, sorpcję hydrofobową, niską biodegradowalność i ograniczoną możliwość regeneracji.

Wybór przedstawicieli grup nośników do immobilizacji kowalencyjnej konkretnych enzymów ma zwykle charakter intuicyjny. Komercyjnie dostępne nośniki to głównie ziarniste wymiennicze jonowe, stosowane w chromatografii jonowymiennej, posiadające typowe ugrupowania funkcyjne, nie zawsze dostosowane do potrzeb immobilizacji. Ich zaletą jest relatywnie niski koszt, natomiast wadą średni wymiar ziaren około 100 μm , co ogranicza stosowanie tradycyjnych sit stalowych, używanych w przemyśle do oddzielenia biokatalizatora od mieszaniny reakcyjnej. Natomiast liczba nośników dostosowanych do immobilizacji białek nie jest duża i są one drogie. Większość takich nośników posiada pozorną zaletę w postaci obecności aldehydowych lub oksiranowych grup funkcyjnych na powierzchni. W efekcie omija się wymagany etap aktywacji złoza, jednak ogranicza skutecznie różnorodność matryc polimerowych oraz grup funkcyjnych w doborze nośnika odpowiedniego dla konkretnego enzymu.





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.01.03.01-00-158/09-06

Zaletą nośników syntezowanych do potrzeb immobilizacji białek jest możliwość dostosowania parametrów fizykochemicznych matrycy lub/oraz metody funkcjonalizacji matrycy do potrzeb konkretnego enzymu. Zwykle grupy badawcze specjalizują się w otrzymywaniu jednego typu matryc, co ponownie ogranicza wybór nośników. Rozwiązaniem problemu jest współpraca z kilkoma ośrodkami wytwarzającymi nośniki na zasadzie sprzężenia zwrotnego; wstępna selekcja typów funkcjonalizacji danego rodzaju nośnika powinna być oparta o wyniki immobilizacji w warunkach uznanych za standardowe, i poprzedzać dalsze syntezy, pozwalające dobrać parametry fizykochemiczne 1-2 rodzajów matryc z wyselekcjonowanymi grupami funkcyjnymi. Kolejne immobilizacje mają za zadanie zawężenie badań nad syntezą nośników do 1 preparatu, który, opcjonalnie, jest poddawany modyfikacjom pozwalającym na dobór odpowiedniego stopnia funkcjonalizacji powierzchni.

Dobór nośnika i stopnia funkcjonalizacji powierzchni jest zwykle punktem wyjścia do doboru warunków immobilizacji, czyli wartości pH wiązania białka, doboru stężenia białka i ewentualnie wpływu stopnia oczyszczenia enzymu na efektywność wiązania i, opcjonalnie, redukcja zasad Schiff'a.

Stabilność preparatu enzym-nośnik

Dobór nośnika i jego budowy fizykochemicznej oraz dobór warunków immobilizacji są zawsze ukierunkowane na maksymalizację aktywności preparatu enzym-nośnik. Ograniczenie wstępnych testów do oznaczania aktywności jest jednak pozornym ułatwieniem w pracy, gdyż nie uwzględnia stabilności preparatów. Określenie „stabilność immobilizowanych enzymów” nie jest terminem jednoznacznym. W literaturze zwiększenie stabilności związanego enzymu jest rozumiane jako:

- mniejsza podatność na agregację;
- mniejsza podatność na atak enzymów proteolitycznych;
- większa trwałość w warunkach przechowywania bez stabilizatorów;
- większa termostabilność;
- brak autolizy;
- większa stabilność konformacyjna w obecności rozpuszczalników organicznych i cieczy jonowych.

Jednak brak autolizy i agregacji oraz większa odporność na proteazy to elementarny skutek immobilizacji, z definicji zawsze obserwowany. Rzadziej otrzymuje się immobilizowane enzymy o znacząco zwiększonej stabilności na przechowywanie, a co ma duży walor handlowy. Brak stabilizatorów w takich testach gwarantuje, że po ich dodaniu związany enzym będzie jeszcze stabilniejszy w roztworze. Z kolei przechowywanie immobilizowanych enzymów w roztworze jest lepszym rozwiązaniem z przemysłowego punktu widzenia; nie ma potrzeby uwadniać preparatów w oddzielnym reaktorze, co wynika ze zróżnicowanej chłonności wody różnych preparatów. Nieobojętne jest też podawanie ilości nośnika w jednostkach objętości, co można bezpośrednio przełożyć na objętość reaktora, z ominięciem zawodnych współczynników przeliczeniowych.

Jeszcze rzadziej bada się termostabilność immobilizowanych enzymów. Może to wynikać z faktu, że rzadko otrzymywane są wyniki z istotnie większą odpornością związanego białka na podwyższone temperatury i wyniki o wydźwięku negatywnym nie są prezentowane w publikacjach. Tymczasem, razem ze wzrostem stabilności podczas przechowywania, zwiększona termostabilność jest najczęściej sygnałem o możliwości zwiększenia stabilności operacyjnej preparatu. Stabilność operacyjną prezentuje się w publikacjach wyjątkowo rzadko. Po pierwsze, długoterminowe procesy są bardzo czasochłonne, wymagają stosowania dużych ilości odczynników i substratów reakcji oraz muszą być prowadzone w warunkach w miarę zbliżonych do przemysłowych. Testy stabilności operacyjnej można prowadzić w mieszalnikowych reaktorach okresowych lub w kolumnach ze złożem upakowanym, gdyż są to standardowo stosowane typy



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.01.03.01-00-158/09-06

reaktorów z immobilizowanymi enzymami. W większości przypadków w publikacjach prezentuje się wyniki otrzymywane w maksymalnie 5-10 procesach okresowych lub w ciągu 2-3 dni pracy ciągłej, a i tak rzadko osiąga się pozytywne rezultaty, a tym samym je publikuje. Tymczasem przemysł oczekuje, że dobry preparat immobilizowany po około 300 procesach w trybie okresowym albo 2 miesiącach pracy ciągłej utraci maksymalnie 50% wyjściowej aktywności. Takim wymaganiom testowania preparatów enzym-nośnik laboratoria badawcze nie są w stanie sprostać.

DOBÓR NOŚNIKÓW, ICH FUNKCJONALIZACJI ORAZ AKTYWACJI DO OTRZYMYWANIA AKTYWNYCH I STABILNYCH PREPARATÓW LAKAZY I TYROZYNAZY

Liczba wykorzystywanych obecnie procedur immobilizacji enzymów jest bardzo duża; szacuje się, że tylko w immobilizacji kowalencyjnej występuje około 100 metod, co wyklucza możliwość przetestowania wszystkich. W prezentowanych badaniach skupiono się na 2 podstawowych procedurach: adsorpcji jako metodzie taniej, z regeneracją nośnika i z desorpcją enzymu w czasie procesu oraz na jej przeciwieństwie, immobilizacji kowalencyjnej. Spośród metod kowalencyjnych, skupiono się na wiązaniu białka poprzez grupy aminowe na jego powierzchni. Wybór podyktował fakt, że są to głównie grupy aminowe lizyny, które występują statystycznie częściej na powierzchni białka i stosunkowo rzadko są zaangażowane w tworzenie struktury centrum aktywnego lub struktur warunkujących stabilność konformacyjną. Stosownie do tego, nośniki były funkcjonalizowane (jeżeli nie posiadały danych ugrupowań) grupami hydroksylowymi, karboksylowymi, aminowymi lub oksiranowymi oraz tak dobierano wartość pH podczas immobilizacji oraz rodzaj aktywatora nośnika, aby udział grup aminowych białka w tworzeniu wiązania kowalencyjnego był preferowany (Tabela 1). Natomiast same nośniki różniły się kosztami otrzymywania w kolejności od najtańszych: nośnik akrylowy BA/EGDMA (A), żele krzemionkowe (Z), nośniki celulozowe Granocel (G), membrany mikrofiltracyjne z celulozy i poliamidu, Eupergit C, mezoporowate pianki krzemionkowe (MCF, zol-żel). Różniły się także składem chemicznym i jakością grup funkcyjnych (Tabela 2 i 4) oraz rozmiarem ziaren i średnim wymiarem porów (Tabela 3).

Tabela 2. Nośniki ziarniste i membrany MF użyte do immobilizacji lakazy i tyrozynazy.

Nazwa nośnika/ grupy nośników	Dodatkowe informacje	Producent	Numer zadania
Eupergit C	Kopolimer metakryloamidu, N,N'-metyleno-di(akryloamidu) i akrylan glicydylu	Sigma-Aldrich	-
BA/EGDMA (A)	Kopolimer akrylanu butylu i dimetakrylanu glikolu etylenowego, modyfikowany etylenodiaminą	Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa	-
Nośniki celulozowe Granocel (G)	Granulowana celuloza mikrokrystaliczna (G), modyfikowana pentaetylenoheksaminą (NH ₂ -G) lub N-chloroetylo-N,N-dietyloaminą (DEAE-G) lub NaOH i etanolem (CM-G)	Laboratorium prof. J. Liesiene Uniwersytet w Kownie, Litwa	3
Nośniki	Modyfikowane 3-aminopropylotrietoksylanem (APTS), lub 2-amino-3-aminopropylotrimetoksylanem (AEAPTS),	Degussa, IE Int. Enzymes Ltd. modyfikacja w zespole	8



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.01.03.01-00-158/09-06

MN-Kieselgel 60 i Silica-gel (Z)	lub 2-aminoetylo-3-aminopropylometylodimetoksylanem (AEAPMDS), lub 3-glicydylopropylotrietoksylanem (GPTS)	prof. A. Jarzębskiego, Politechnika Śląska, Gliwice	
Mezoporowate pianki krzemionkowe (MCF)	Modyfikowane jak wyżej	Zespół prof. A. Jarzębskiego Politechnika Śląska, Gliwice	8
Membrany MF z celulozy (Cel)	Modyfikacja zimną plazmą alliloaminy, alkoholu allilowego lub kwasu akrylowego	Sartorius, modyfikacja w zespole dr hab. Jolanty Bryjak, we współpracy z dr Ireną Gancarz z PWr	3
Membrany MF z poliamidu (PA)	Modyfikacja zimną plazmą alliloaminy, alkoholu allilowego lub kwasu akrylowego	Sartorius, modyfikacja w zespole dr hab. Jolanty Bryjak, we współpracy z dr Ireną Gancarz z PWr	3

Tabela 3. Grupy funkcyjne, aktywatory, pH podczas immobilizacji oraz rozmiar ziaren i średni wymiar porów nośników ziarnistych stosowanych do immobilizacji. CDI – karbodiimid, DVS – diwinylosulfon, AG – aldehyd glutarowy

Nośnik	Grupy funkcyjne	Aktywator/pH	Rozmiar ziaren [mm]	Średni wymiar porów [nm]
Eupergit C	Glicydylowe	- / 8	0.3 – 0.5	15
A	Aminowe lub hydroksylowe lub karboksylowe	AG / 7 lub DVS / 8 lub CDI / 5	0.6 – 0.8	8.8
Granocel (G)	Aminowe lub hydroksylowe lub karboksylowe lub DEAE	AG / 7 lub DVS / 8 lub CDI / 5 lub AG / 7	0.2 – 0.3	2-35
MN-Kieselgel 60	Glicydylowe lub aminowe	- / 8 lub AG / 7	0.2 – 0.5	4.0 – 5.1
Silica-gel	Glicydylowe lub aminowe	- / 8 lub AG / 7	0.2 – 0.3	2.1 – 2.3
Pianki mezoporowate (MCF)	Glicydylowe lub aminowe lub hydroksylowe	- / 8 lub AG / 7 lub DVS / 8	0.02 – 0.05	22 – 25



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.01.03.01-00-158/09-06

Tabela 4. Aktywatory, pH podczas immobilizacji oraz podstawowe parametry membran mikrofiltracyjnych (MF) z celulozy (Cel) i poliamidu (PA) aktywowanych zimną plazmą, stosowanych do immobilizacji lakazy i tyrozynazy. CDI – karbodiimid, DVS – diwinylosulfon, AG – aldehyd glutarowy

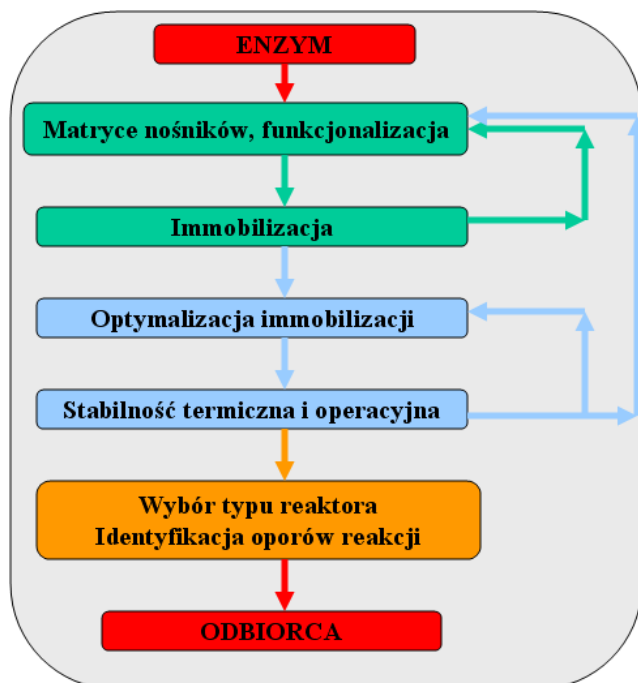
Membrany MF	Grupy funkcyjne	Aktywator/pH	Charakterystyka membran
Cel; AIOH-Cel; NH ₂ -Cel; AAC- Cel	Aminowe hydroksylowe karboksylowe	lub AG / 7 lub DVS / 8 lub lub CDI / 5	Membrany płaskie (19.6 cm ²) z azotanu celulozy, średni wymiar porów 0.2 μm
PA; AIOH-PA ; NH ₂ -PA ; Aac-PA	Aminowe hydroksylowe karboksylowe	lub AG / 7 lub DVS / 8 lub lub CDI / 5	Membrany płaskie (19.6 cm ²) z poliamidu, średni wymiar porów 0.2 μm

W ramach realizacji tematu, podjęto szereg prób optymalizacji struktury i funkcjonalizacji nośników, produkowanych przez wykonawców Projektu oraz w ramach współpracy nieformalnej (dr Irena Gancarz, Politechnika Wroclawska), celem uzyskania preparatu enzym-nośnik o wysokiej aktywności enzymatycznej, z wysoką wydajnością immobilizacji i z jak najmniejszą inaktywacją enzymu, wywołaną modyfikacją fizyczną lub chemiczną. Unikalną wartością przedstawionych badań była właśnie możliwość doboru wybranych parametrów nośnika do potrzeb immobilizacji konkretnego enzymu.

Jednocześnie, powtarzalność grup funkcyjnych na różnych nośnikach, pozwalała oszacować rolę materiału nośnika na efektywność immobilizacji. Przykładowy schemat doboru nośnika do potrzeb konkretnego enzymu przedstawiono na Rysunku 1, natomiast na Rysunku 2 zobrazowano kolejne etapy doboru właściwości nośnika Granocel do immobilizacji lakazy. Podczas pracy nad dobraniem warunków immobilizacji, dzięki współpracy z producentami nośników, zmieniano takie parametry nośników celulozowych, Z i MCF, jak: rodzaj grup funkcyjnych na nośnikach, ilość grup funkcyjnych, średni wymiar porów, granulację, a w przypadku membran MF rodzaj grup funkcyjnych.

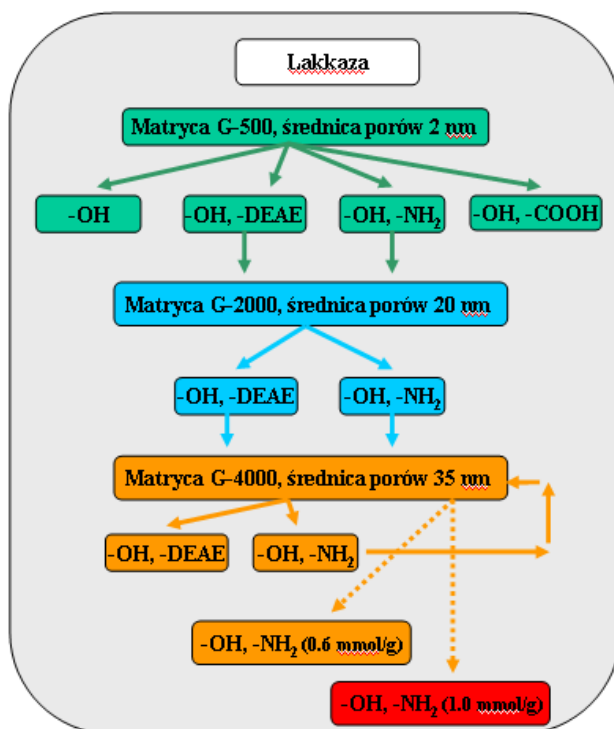
Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09-06



Rysunek 1. Ogólny schemat postępowania w doborze rodzaju nośnika do układu reakcyjnego

OPTYMALIZACJA IMMOBILIZACJI





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.01.03.01-00-158/09-06

Rysunek 2. Ogólny schemat postępowania w doborze rodzaju nośnika (tu Granocel) do układu reakcyjnego.

O możliwościach zwiększenia aktywności lakazy immobilizowanej (aktywacja AG) przez dobór tylko 2 parametrów, czyli średniego wymiaru porów i stopnia funkcjonalizacji, świadczy najlepiej porównanie otrzymanych aktywności: 680 U ml nośnika dla Granocel-500, 1200 U mL⁻¹ dla Granocel-2000 oraz 2000 U mL⁻¹ dla Granocel-4000 ze stopniem podstawienia grupami aminowymi 0.6 mmol g⁻¹ i 4200 U mL⁻¹ po zmianie stopnia funkcjonalizacji do 1.0 mmol g⁻¹.

Poniżej przedstawiono metodykę dotyczącą immobilizacji lakazy i tyrozyazy, pozwalającą otrzymać preparaty zarówno o wysokiej aktywności, jak i o podwyższonej stabilności operacyjnej. Poniższe wskazania mają jednak charakter bardziej ogólny i mogą być wykorzystane w immobilizacji innych enzymów. Natomiast ogólne schematy otrzymywania immobilizowanej lakazy i tyrozyazy przedstawiono na rysunkach 3-10.

IMMOBILIZACJA KOWALENCYJNA I ADSORPCYJNA – NOŚNIKI GRANOCEL, AKRYLOWE, TYPU Z, MCF ORAZ MEMBRANY MF

ETAP I: AKTYWACJA NOŚNIKÓW I IMMOBILIZACJA BIAŁKA

(1) AKTYWACJA DIWINYLOSULFONEM (DVS) I IMMOBILIZACJA – nośniki: niefunkcjonalizowany Granocel, DEAE-Granocel, CM-Granocel, NH₂-Granocel, nośnik akrylowy OH-A, niefunkcjonalizowany OH-MCF i OH-Z, membrany mikrofiltracyjne z celulozy AIOH-Cel i poliamidu AIOH-PA:

- a. odmierzyć 20 mL nośnika lub użyć 4 membrany MF o średnicy 2.5 cm;
- b. przemyć nośnik 5-6 x 40 mL wody przez odsączenie;

Uwaga, nośniki MCF zamiast przemywania muszą być odwirowane przy 6000 rpm przez 20 min

- c. przemyć nośnik 2 x 40 mL 1 M Na₂CO₃ (pH 11) przez odsączenie (odwirowanie);
- d. do nośnika dodać równą objętość 1 M Na₂CO₃;
- e. postawić naczynie na mieszadle magnetycznym, ustawionym na 30 rpm, następnie dodawać kroplami 4 mL DVS i pozostawić na mieszadle w temperaturze pokojowej przez 2h;

Uwaga, nośnik po odsączeniu (odwirowaniu) powinien zmienić barwę na kolor jasny, szarofioletowy. Jeżeli nie doszło do zmiany koloru, to prawdopodobnie DVS jest częściowo rozłożony i należy zwiększyć jego stężenie minimum 2 razy i ponownie aktywować. Szybkość mieszania należy dostosować do wytrzymałości mechanicznej nośnika (niezbędny wstępny test).

- f. odmyć (odwirować) zaktywowany nośnik 4 x dużym nadmiarem wody, a następnie kolejnymi porcjami wody w 10 min interwałach czasowych, przygodnie mieszając. Pod koniec 3 odmycia



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.01.03.01-00-158/09-06

sprawdzić wartość pH wody. Odmywanie z odsączeniem kontynuować do momentu otrzymania pH wody około 7.5;

g. zaktywowany preparat przemyć (odwirować) dwukrotnie 80 mL zimnego (10 °C) roztworu 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0-8.2), pozostawiając 15 min przerwę pomiędzy kolejnymi porcjami;

h. zaktywowany preparat odsączyć i dodać roztwór enzymu (nośnik : roztwór białka w proporcjach 1 : 2 lub 10 ml na 4 membrany) o temperaturze maksymalnej 10 °C. Zawiesinę łagodnie mieszać lub wytrząsać przez 2 h w temperaturze 4-10 °C a następnie pozostawić przez 12 h w 4-10 °C bez mieszania.

(2) AKTYWACJA ALDEHYDEM GLUTAROWYM (AG) I IMMOBILIZACJA – nośniki: DEAE-Granocel, NH_2 -Granocel, nośnik akrylowy NH_2 -A, NH_2 -MCF, NH_2 -Z, membrany mikrofiltracyjne z celulozy AI NH_2 -Cel i poliamidu AI NH_2 -PA :

a. odmierzyć 20 mL nośnika lub użyć 4 membrany MF o średnicy 2.5 cm;

b. przemyć nośnik 5-6 x 40 mL wody przez odsączenie;

Uwaga, nośniki MCF zamiast przemywania muszą być odwirowane przy 6000 rpm przez 20 min

c. przemyć nośnik 2 x 40 mL 0.1 M buforem fosforanowym (pH 7.0) przez odsączenie;

d. do nośnika dodać równą objętość 0.1 M buforu fosforanowego, postawić naczynie na mieszadle magnetycznym, ustawionym na 30 rpm, następnie dodać 2 mL 25%AG i pozostawić na mieszadle przez 5 minut. Wyłączyć mieszadło i, przygodnie mieszając, aktywować nośnik przez dalsze 35 min;

Uwaga, z wyłączeniem preparatów Granocel, nośniki w trakcie aktywacji zmieniają kolor od żółtego po beżowo-brązowy.

e. odmyć zaktywowany nośnik 4 x dużym nadmiarem wody, a następnie kolejnymi porcjami wody w 10 min interwałach czasowych, przygodnie mieszając. Pod koniec 10 odmycia ostrożnie powąchać zawiesinę w naczyniu. Odmywanie z odsączeniem kontynuować do momentu całkowitego zaniku charakterystycznego zapachu;

f. zaktywowany preparat przemyć dwukrotnie 80 mL zimnego (10 °C) roztworu 0.1 M buforu fosforanowego (pH 7.0), pozostawiając 15 min przerwę pomiędzy kolejnymi porcjami;

g. zaktywowany preparat odsączyć i dodać roztwór enzymu (nośnik : roztwór białka w proporcjach 1 : 2) o temperaturze maksymalnej 10 °C. Zawiesinę łagodnie mieszać lub wytrząsać przez 2 h w temperaturze 4-10 °C, a następnie pozostawić przez 12 h w 4-10 °C bez mieszania.

(3) AKTYWACJA KARBODIIMIDEM (CDI) I IMMOBILIZACJA – nośniki: CM-Granocel, COOH-A, membrany mikrofiltracyjne z celulozy AAC-Cel i poliamidu AAC-PA:

a. odmierzyć 20 mL nośnika lub użyć 4 membrany MF o średnicy 2.5 cm;

b. przemyć nośnik 5-6 x 40 mL wody przez odsączenie;

Uwaga, nośniki MCF zamiast przemywania muszą być odwirowane przy 6000 rpm przez 20 min

c. przemyć nośnik 2 x 40 mL 0.1 M KH_2PO_4 (pH 5.0) przez odsączenie;



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.01.03.01-00-158/09-06

- d. do nośnika dodać równą objętość 0.1 M KH_2PO_4 , postawić naczynie na mieszadle magnetycznym, ustawionym na 30 rpm, następnie dodać CDI (końcowe stężenie ????) i pozostawić na mieszadle przez 20 minut;
- e. odmyć zaktywowany nośnik 4 x dużym nadmiarem wody, a następnie 4 x kolejnymi porcjami (80 mL) wody zachowując 10 min interwały czasowe;
- f. zaktywowany preparat przemyć dwukrotnie 80 mL zimnego (10 °C) roztworu 0.1 M KH_2PO_4 (pH 7.0), pozostawiając 15 min przerwę pomiędzy kolejnymi porcjami;
- g. zaktywowany preparat odsączyć i dodać roztwór enzymu (nośnik : roztwór białka w proporcjach 1 : 2) o temperaturze maksymalnej 10 °C. Zawiesinę łagodnie mieszać lub wytrząsać przez 2 h w temperaturze 4-10 °C, a następnie pozostawić przez 12 h w 4-10 °C bez mieszania.

(4) IMMOBILIZACJA NA NOŚNIKACH Z GRUPAMI OKSIRANOWYMI – nośniki: glic-MCF, glic-Z, EupergitC

- a. odmierzyć 20 mL nośnika;
- b. przemyć nośnik 5-6 x 20 mL wody przez odsączenie;

Uwaga, nośniki MCF zamiast przemywania muszą być odwirowane przy 6000 rpm przez 20 min

- c. preparat przemyć dwukrotnie 80 mL zimnego (10 °C) roztworu 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0-8.2), pozostawiając 15 min przerwę pomiędzy kolejnymi porcjami;
- d. preparat odsączyć i dodać roztwór enzymu (nośnik : roztwór białka w proporcjach 1 : 2) o temperaturze maksymalnej 10 °C. Zawiesinę łagodnie mieszać lub wytrząsać przez 2 h w temperaturze 4-10 °C a następnie pozostawić przez 12 h w 4-10 °C bez mieszania.

(5) IMMOBILIZACJA ADSORPCYJNA NA NOŚNIKACH – nośniki typu: MCF, Z, Akryl, EupergitC, Granocel, membrany mikrofiltracyjne z celulozy Cel i poliamidu PA

- a. odmierzyć 5 mL nośnika lub użyć 4 membrany MF o średnicy 2.5 cm;
- b. przemyć nośnik 5-6 x 20 mL wody przez odsączenie;

Uwaga, nośniki MCF zamiast przemywania muszą być odwirowane przy 6000 rpm przez 20 min

- c. preparat przemyć dwukrotnie 80 mL zimnego (10 °C) roztworu 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0-8.2) lub 0.1 M buforem fosforanowym (pH 7.0), lub 0.1 M KH_2PO_4 , pozostawiając 15 min przerwę pomiędzy kolejnymi porcjami;
- d. preparat odsączyć i dodać roztwór enzymu (nośnik : roztwór białka w proporcjach 1 : 2) o temperaturze maksymalnej 10 °C. Zawiesinę łagodnie mieszać lub wytrząsać przez 2 h w temperaturze 4-10 °C a następnie pozostawić przez 12 h w 4-10 °C bez mieszania.

ETAP II: ODMYWANIE BIAŁKA ZWIĄZANEGO NIESPECYFICZNIE

Etap wspólny dla wszystkich rodzajów immobilizacji kowalencyjnej:



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.01.03.01-00-158/09-06

- a. odmyć przez odsączenie lub odwirować nadmiar roztworu z nadmiaru nośnika;
- b. nośnik odmyć trzykrotnie małymi porcjami 0.1 M buforu fosforanowego pH 7.0;

Uwaga 1. Nośniki MCF zamiast przemywania muszą być odwirowane przy 6000 rpm przez 20 min.

Uwaga 2. Membrany odmywać przez odsączenie z wykorzystaniem sita stalowego.

Uwaga 3. Nośniki ziarniste umieścić w kolumnie chromatograficznej.

c. nośnik odmywać 0.1 M buforem fosforanowym pH 7.0 do spadku absorbancji w 280 nm do wartości bliskiej 0.0 (min. 0.002) (odmycie nadmiaru białek);

d. procedurę odmywania kontynuować stosując 0.1 M bufor fosforanowy pH 7.0, zawierający 0.5 M NaCl (odmycie białek związanych oddziaływaniami jonowymi);

e. procedurę odmywania kontynuować stosując 0.1 M bufor octanowy pH 5.0 (odmycie białek związanych elektrostatycznie);

f. procedurę odmywania kontynuować stosując wodę dejonizowaną (odmycie białek związanych oddziaływaniami hydrofobowymi);

Uwaga. Jest to etap ostatni dla immobilizacji adsorpcyjnej. Nośniki przemyć 3 razy odpowiednim buforem (0.1 M bufor fosforanowo-cytrynianowy dla lakazy lub 0.1 M bufor fosforanowy dla tyrozynazy) i można oznaczać aktywność związanego białka.

g. nośnik ziarnisty przenieść ilościowo do zlewki. Wszystkie nośniki zawiesić w 0.5 M buforze tris-HCl, pH 7.8, celem zablokowania grup reaktywnych;

h. zawiesinę przetrzymać w 14 °C przez 12 h;

i. nośniki odsączyć, przemyć 3 razy wodą dejonizowaną, a następnie 3-4 razy odpowiednim buforem.

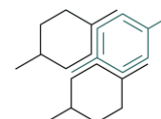
ETAP III: OZNACZANIE AKTYWNOŚCI IMMOBILIZOWANYCH ENZYMÓW

a. Pomiar aktywności tyrozynazy

Tyrozynaza charakteryzuje się dwoma rodzajami aktywności – katalizuje reakcję hydroksylacji monofenoli do difenoli (aktywność monofenolazowa) oraz utleniania difenoli do chinonów (aktywność difenolazowa). W związku z tym aktywność tego enzymu należy oznaczać w obecności dwóch substratów: np. L-Tyrozyny jako przedstawiciela monofenoli oraz L-DOPA, jako przedstawiciela difenoli. Pomiar aktywności prowadzić w temperaturze 30 °C, w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7.0 i w obecności 1 mM L-Tyrozyny lub L-DOPA jako substratu. W obu przypadkach aktywność można oznaczać poprzez zmianę absorbancji przy długości fali 475 nm w czasie, co odpowiada przyrostowi ilości (stężenia) dopachromu (barwnego produktu) w trakcie prowadzonej reakcji. Za szybkość reakcji należy przyjąć współczynnik kierunkowy prostej, przebiegającej przez punkty pomiarowe w czasie reakcji.

Uwaga. Reakcja z substratem monofenolowym charakteryzuje się tzw. lag-fazą i dlatego w tym przypadku szybkość reakcji odpowiada odcinkowi prostoliniowemu po zakończeniu tej fazy.

Za 1 jednostkę aktywności (1 U) przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach reakcji powoduje zmianę absorbancji o 0.001 w czasie 1 min.





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.01.03.01-00-158/09-06

b. Pomiar aktywności lakazy

Pomiar aktywności prowadzić w temperaturze 30 °C, w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5.3 i w obecności ABTS (min. 2.5 mg/MI) jako substratu. Aktywność można oznaczać poprzez zmianę absorbancji przy długości fali 420 nm w czasie, co odpowiada przyrostowi ilości (stężenia) barwnego produktu w trakcie prowadzonej reakcji. Za szybkość reakcji należy przyjąć współczynnik kierunkowy prostej, przebiegającej przez punkty pomiarowe w czasie reakcji.

Za 1 jednostkę aktywności (1 U) przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach reakcji powoduje przyrost produktu o 1 μmol (molowy współczynnik ekstynkcji 36000 [1/M cm]) w czasie 1 min.

c. Pomiar aktywności enzymów immobilizowanych

Aktywność preparatów immobilizowanych należy mierzyć w mieszalnikowych (120-250 rpm) termostatowanych reaktorach, do których wprowadza się odmierzoną ilość nośnika z enzymem i uzupełnia odpowiednim buforem do połowy pożądanej objętości reaktora. Po preinkubacji (min. 15 min) dodaje się równą objętość wstępnie preinkubowanego odpowiedniego substratu, włączając jednocześnie stoper. Próbkę z reaktora (1.2 mL) pobiera się w odstępach 1-2 min, wyłączając mieszanie 5-10 sec przed upływem czasu poboru próbki, następnie pobiera się próbkę i natychmiast ponownie włącza mieszanie. Po odczycie spektrofotometrycznym, pobraną próbkę zwraca się do reaktora. Pomiary prowadzić w zakresie zmian absorbancji od 0.1 do 0.6. Pobrać minimum 5 próbek z reaktora. W przypadku zbyt szybkich zmian absorbancji, pomiar należy powtórzyć, stosując mniejszą objętość nośnika lub/ oraz większą objętość mieszaniny reakcyjnej.

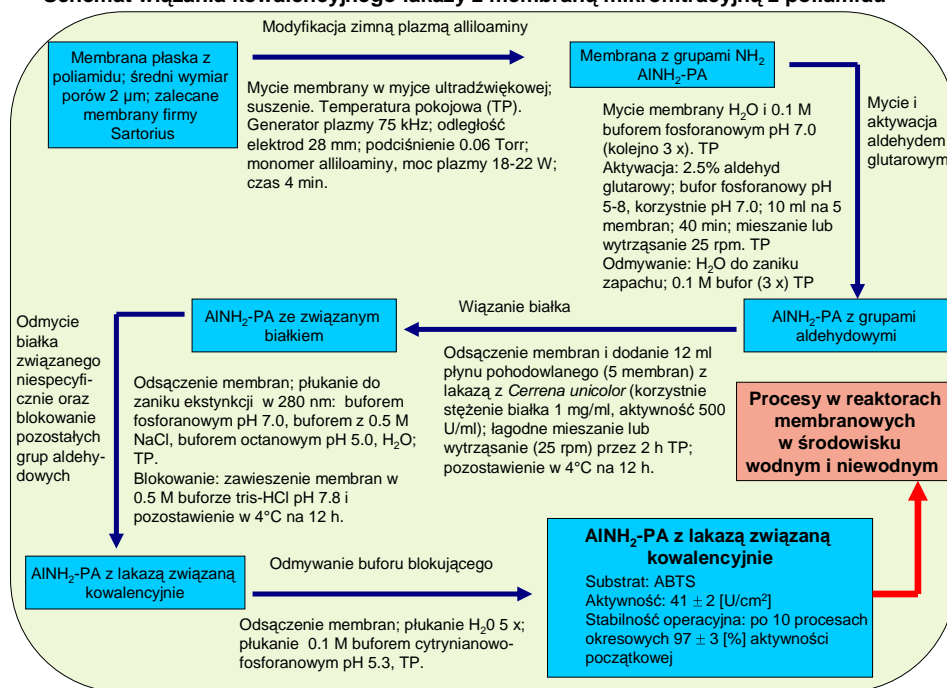
Uwaga. Nośniki typu MCF można „rozcieńczać” jak roztwór rzeczywisty. Nośnik akrylowy ulega rozdrobnieniu w warunkach reaktora mieszalnikowego – należy stosować łagodne mieszanie.

Ogólne schematy otrzymywania immobilizowanej lakazy i tyrozynazy o podwyższonej stabilności operacyjnej przedstawiono na rysunkach 3-10.

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

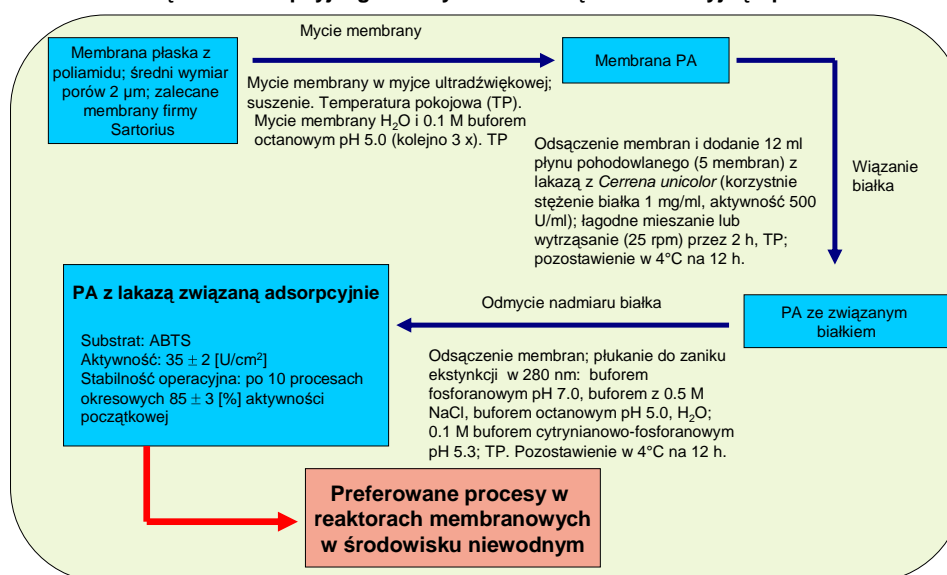
Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09-06

Schemat wiązania kowalencyjnego lakazy z membraną mikrofiltracyjną z poliamidu



Rysunek 3.

Schemat wiązania adsorpcyjnego lakazy z membraną mikrofiltracyjną z poliamidu

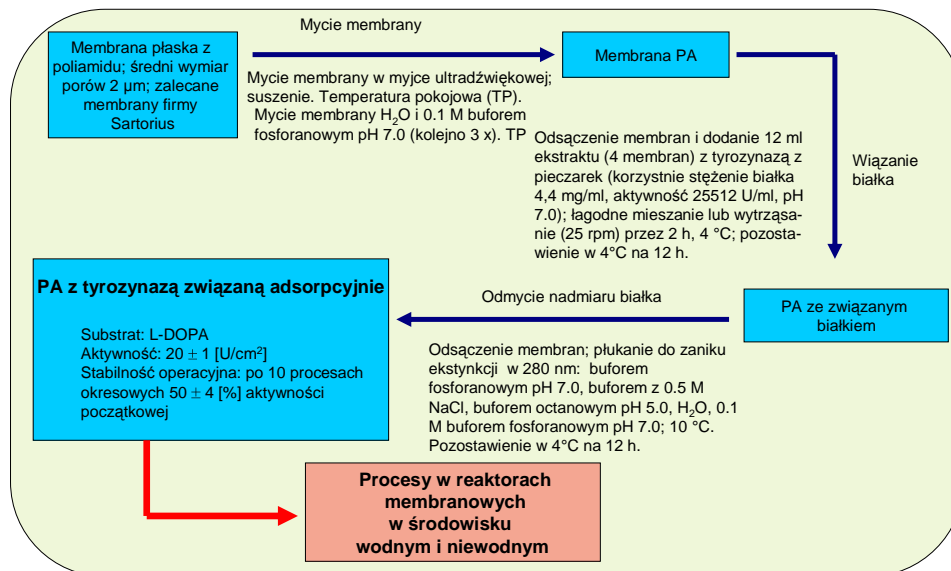


Rysunek 4.

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

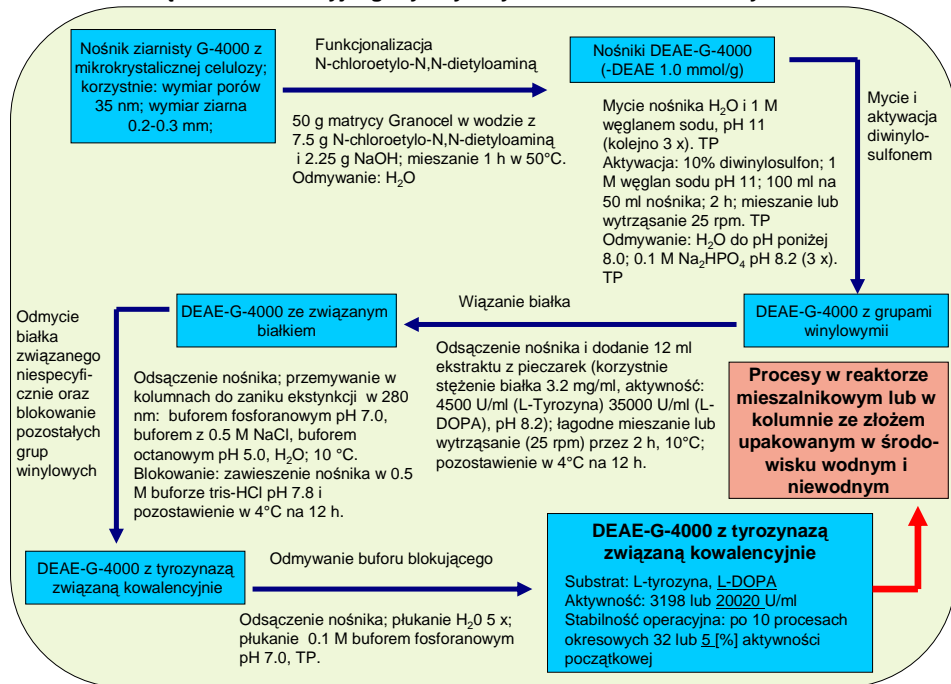
Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09-06

Schemat wiązania adsorpcyjnego tyrozynazy z membraną mikrofiltracyjną z poliamidu



Rysunek 5.

Schemat wiązania kowalencyjnego tyrozynazy z nośnikiem celulozowym Granocel

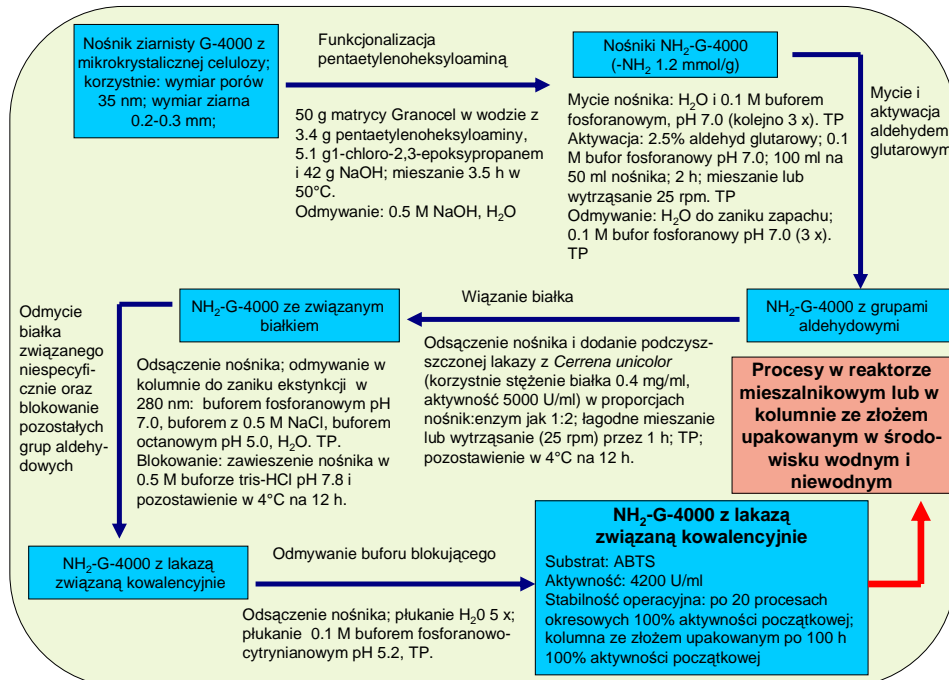


Rysunek 6.

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

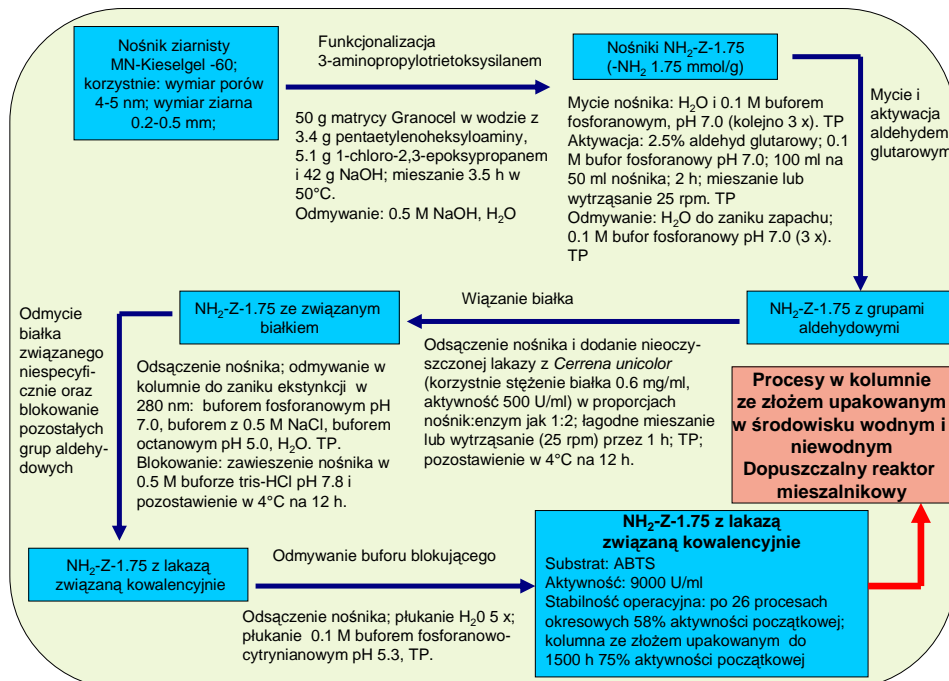
Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09-06

Schemat wiązania kowalencyjnego lakazy z nośnikiem celulozowym Granocel



Rysunek 7.

Schemat wiązania kowalencyjnego lakazy z nośnikiem krzemionkowym

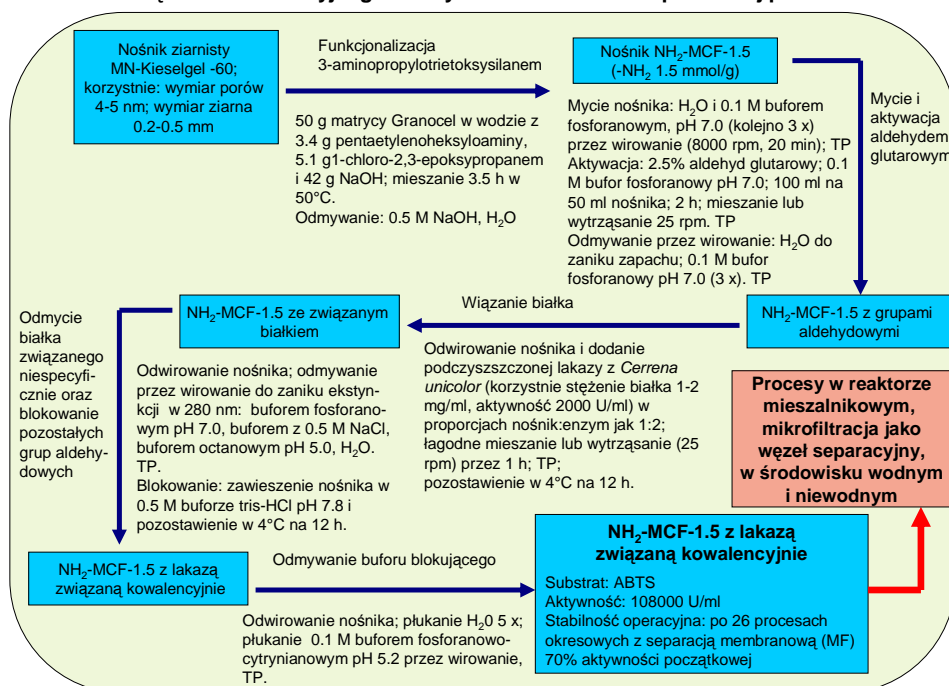


Rysunek 8.

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

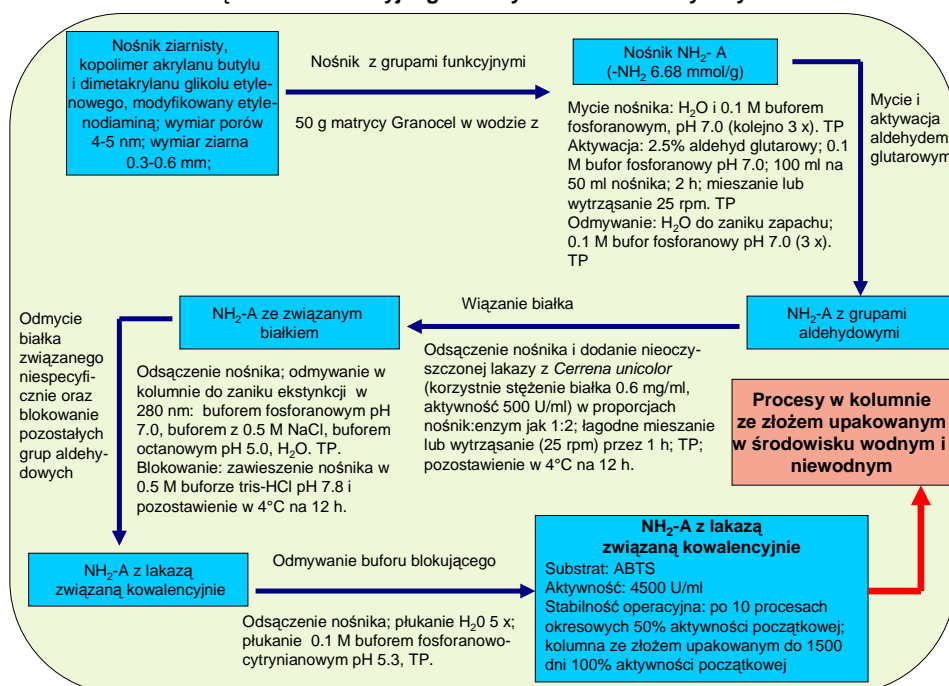
Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09-06

Schemat wiązania kowalencyjnego lakazy z nośnikiem z mezoporowatej pianki komórkowej



Rysunek 9.

Schemat wiązania kowalencyjnego lakazy z nośnikiem akrylowym



Rysunek 10.



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.01.03.01-00-158/09-06

Podsumowanie

Schematy immobilizacji przedstawione na rysunkach 3-10 zawierają, obok ogólnych procedur o charakterze metodycznym, informacje o stabilności operacyjnej związanej lakazy i tyrozynazy w dobranych typach reaktorów. Zalecenia stosowalności określonych typów reaktorów nie mają charakteru obligatoryjnego, a jedynie wskazania, gdyż zmiana substratów/produktów reakcji może wymuszać inne rozwiązanie aparaturowe, jako korzystniejsze. Jedyne ewidentne wykluczenie reaktora mieszalnikowego dotyczy przypadków stosowania enzymów związanych z nośnikiem akrylowym A.

Autor opracowania; dr hab. Jolanta Bryjak Prof. PWr.

