

III 465533

F.C.P.

ELENA POPA

BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI

VOLUMUL II

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
1997



BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITARĂ
București

Cota III 465533

Inventar C. 1884/97

ELENA POPA

145698

BIOCATALIZATORI IMOBILIZAȚI ,

VOLUMUL II

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
1997

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ
BUCUREȘTI
COTA III 465533

W 465533

374/97

Referenți științifici: Prof. Dr. OVIDIU MAIOR
Conf. Dr. ALEXANDRU GIOABA

B.C.U. București



C 01884 97

© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90-92, București - 76235; Telefon 410.23.84

ISBN - 973-575-123-2

	<u>Pag.</u>
I.	IMOBILIZAREA CELULELOR
I.1.	Considerații generale..... 9
I.2.	Tipuri de suporturi utilizate la imobilizarea celulelor..... 16
I.2.1.	Suporturi organice..... 16
I.2.2.	Suporturi anorganice..... 18
I.3.	Mecanismul imobilizării celulelor pe suporturi.... 19
I.4.	Criterii de alegere a suporturilor..... 20
I.5.	Tehnici de imobilizare a celulelor..... 21
I.5.1.	Tehnici de imobilizare fizică..... 22
I.5.1.1.	Adsorbția..... 22
I.5.1.2.	Includerea celulelor în geluri insolubile..... 29
1°.	Polimeri sintetici..... 32
2°.	Polimeri naturali..... 38
A.	Gelificarea termică..... 38
B.	Gelificarea ionotropă..... 47
C.	Precipitarea..... 54
I.5.2.	Tehnici de imobilizare chimică a celulelor..... 57
I.5.2.1.	Reticularea..... 57
I.5.2.2.	Copolimerizarea..... 58
I.5.2.3.	Legarea covalentă..... 58
I.5.3.	Autoimobilizarea celulelor..... 61
I.6.	Activitatea celulelor imobilizate..... 62
I.6.1.	Fenomene de transport de masă..... 62
I.6.2.	Stabilitatea catalitică..... 63

II.	APLICATII ALE BIOCATALIZATORILOR IMOBILIZATI IN BIOTEHNOLOGIE	
II.1.	Surse de celule.....	65
II.1.1.	Tesuturile umane si animale.....	65
II.1.2.	Celule vegetale.....	66
II.2.	Utilizarea reactoarelor enzimatie în biotehnoologia.....	67
II.2.1.	Surse de biocatalizatori.....	70
II.2.2.	Utilizarea preparatelor imobilizate în bioreactoare.....	71
II.2.2.1.	Enzime imobilizate.....	71
II.2.2.2.	Sisteme enzimatic multiseventuale co-imobilizate.....	75
II.2.2.3.	Sisteme celulare imobilizate.....	76
II.3.	Tipuri de reactoare enzimatic.....	77
II.3.1.	Reactoare în sistem discontinuu („batch”).....	77
II.3.2.	Reactoare în flux continuu.....	78
II.3.2.1.	Reactoare cu membrană.....	81
II.3.2.2.	Reactoare tubulare.....	82
II.3.2.3.	Alte variante de reactoare.....	88
II.4.	Biotehnologii bazate pe celule imobilizate.....	92
II.4.1.	Reactoare „batch”.....	97
II.4.2.	Reactoare în flux continuu.....	97
III.	ALTE APLICATII ALE BIOCATALIZATORILOR IMOBILIZATI	
III.1.	Aplicații în studii biochimice.....	105
III.1.1.	Studiul structurii cuaternare a enzimelor.....	105
III.1.1.1.	Alegerea condițiilor experimentale.....	105
III.1.1.2.	Criterii de control al prezenței subunităților imobilizate.....	107

III.1.2.	Investigarea structurii terțiare a proteinelor.....	111
III.1.3.	Metode de investigare a modificărilor conformaționale ale proteazelor imobilizate...	114
III.2.	Aplicații în Chimie Analitică.....	115
III.2.1.	Variante constructive ale sensorilor enzimatici.....	116
III.2.1.1.	Electrozi ioni-selectivi.....	120
III.2.1.2.	Alegerea biocatalizatorului și a metodei de imobilizare.....	122
III.2.1.3.	Enzima ca reactiv analitic.....	122
III.2.2.	Exemple de utilizare a sensorilor enzimatici.....	124
III.2.2.1.	Sensori pentru glucoză.....	124
III.2.2.2.	Sensori enzimatici de pH.....	126
III.2.2.3.	Sensori pentru uree.....	127
III.2.2.4.	Sensori pentru aminoacizi.....	129
III.2.2.5.	Sensori pentru alcooli.....	132
III.2.2.6.	Sensori pentru acid uric.....	133
III.2.2.7.	Sensori pentru acid lactic.....	133
III.2.2.8.	Sensori pentru amigdalină.....	134
III.2.2.9.	Sensori pentru penicilină.....	134
III.2.3.	Sensori cu substrat pentru dozarea enzimelor.....	135
III.2.4.	Tendențe și orientări în utilizarea biosensibilizatorilor în bichimie.....	136
III.2.4.1.	Tipuri moderne de traductori.....	138
III.2.4.2.	Bioreceptori.....	140
III.3.	Aplicații în cromatografia de afinitate.....	144

III.3.1.	Suporturi.....	149
III.3.1.1.	Polizaharide.....	150
III.3.1.2.	Polimeri sintetici.....	152
III.3.1.3.	Suporturi anorganice.....	153
III.3.1.4.	Alte tipuri de suporturi.....	155
III.3.2.	Metode de imobilizare a enzimelor.....	156
III.3.3.	Metode de lucru în cromatografia afină cu enzime imobilizate.....	157
III.3.3.1.	Factorii care influențează determinările în cromatografia afină.....	158
III.3.4.	Utilizări ale cromatografiei afine în separarea și purificarea proteinelor.....	164
III.3.4.1.	Strategii de obținere a adsorbenților specifici pentru proteaze.....	164
III.4.	Aplicații medicale și în imunochimie ale enzimelor imobilizate.....	166
III.4.1.	Utilizarea enzimelor imobilizate „in vivo”.....	166
III.4.1.1.	Injecția locală.....	167
III.4.1.2.	Perfuzii extracorporale.....	168
III.4.1.3.	Administrarea gastrointestinală.....	170
III.4.1.4.	Aplicații locale.....	171
III.4.2.	Mecanismul acțiunii enzimelor incluse în lipozomi.....	171
III.4.2.1.	Tratarea deficiențelor enzimatice.....	172
III.4.2.2.	Terapia neoplasmelor.....	174
III.4.3.	Sisteme enzimatice multisevențiale și regenerarea cofactorilor.....	176
III.4.4.	Biodegradabilitatea preparatelor de enzime imobilizate.....	177

III.4.5.	Utilizarea enzimelor imobilizate în imunochimie.....	177
III.4.5.1.	Imunosupresive.....	177
III.4.5.2.	Adjuvanți imunologici.....	178
III.4.5.3.	Tehnici imuno-enzimatice pentru analize biomedicale.....	178
III.5.	Aplicații ale enzimelor imobilizate în sinteza și semisinteza organică.....	182
III.5.1.	Obținerea de enantiomeri optic puri.....	184
III.5.1.1.	Scindarea amestecurilor racemice.....	185
III.5.1.2.	Sinteza asimetrică.....	190
III.5.1.3.	Obținerea de L- α -aminoacizi prin hidroliza proteinelor.....	199
III.5.2.	Obținerea antibioticelor de semisinteză.....	199
III.5.2.1.	Obținerea acidului 6-aminopenicilanic și a penicilinelor.....	199
III.5.2.2.	Semisinteza de cefalosporine.....	202
III.5.3.	Obținerea de steroidi.....	204
III.5.4.	Sinteze de peptide.....	206
III.5.5.	Alte sinteze de compuși organici.....	208
III.5.5.1.	Obținere de alcooli optic activi.....	208
III.5.5.2.	α -Cetoacizi.....	211
III.5.5.3.	Alți acizi carboxilici.....	212
III.5.6.	Obținere de reactivi pentru sinteze fine.....	216
III.5.6.1.	Sinteza porfobilinogenului.....	216
III.5.6.2.	Sinteza glutatationului.....	217
III.5.6.3.	Obținere de cofactori.....	217
III.5.6.4.	Sinteze de compuși radiomarcați.....	218
III.5.7.	Utilizarea enzimelor imobilizate pentru reacții în mediu neapos.....	218

III.5.7.1.	Metode de modificare a enzimelor.....	218
III.5.7.2.	Tipuri de reacții enzimactice oare decurg în mediu neapos.....	221
III.5.8.	Considerații generale asupra utilizării enzimelor immobilizate în sinteza organică.....	228
III.5.8.1.	Aplicabilitatea metodei alese.....	229
III.6.	Aplicații ale biocatalizatorilor imobilizați în industria alimentară.....	232
III.6.1.	Hidroliza proteinelor la peptide și aminoacizi..	234
III.6.2.	Industrializarea laptelui.....	236
III.6.2.1.	Coagularea laptelui.....	236
III.6.2.2.	Preluorarea laptelui și hidroliza lactozei.....	238
III.6.2.3.	Industrializarea zerului.....	241
III.6.3.	Utilizări în industria berii.....	243
III.6.4.	Industria vinului și sucurilor.....	244
III.6.5.	Aplicații în industria produselor zaharoase.....	245
III.6.5.1.	Hidroliza amidonului și celulozei.....	245
III.6.5.2.	Invertirea zahărului.....	248
III.6.5.3.	Epimerizarea D-glucozei la D-fructoză.....	249
III.6.6.	Alte aplicații.....	253
III.6.6.1.	Hidroliza rafinozei.....	253
III.6.6.2.	Obținere de acid gluconic.....	253
III.6.6.3.	Conservarea cărnii.....	256
	Listă de abrevieri.....	257
	Bibliografie.....	259

I. IMOBILIZAREA CELULELOR

I.1. Considerații generale

După cum am arătat în vol. I, unul dintre avantajele majore ale utilizării enzimelor immobilizate, constă în posibilitatea fixării pe suporturile insolubile chiar a celulelor (viabile sau nu) ca și a organelor celulare. Acest lucru este deosebit de important având în vedere costul ridicat al izolării și purificării enzimelor intracelulare. Utilizarea celulelor, a extractelor celulare sau a organelor celulare înlătură acest inconvenient major, permițând scăderea prețului de cost al compuşilor obținuți cu ajutorul agregatelor respective. În plus, enzimele din aceste preparate au o stabilitate mult mai mare în comparație cu enzimele pure, aflându-se în mediul lor natural.

În acest fel, odată cu enzimele intracelulare ca și cu cele legate de membranele celulare se imobilizează și cofactorii respectivi, care își păstrează activitatea și stabilitatea.

Celulele immobilizate pot fi folosite nu numai pentru reacții enzimatice într-o singură etapă, dar și pentru efectuarea unor reacții complexe, alcătuite din mai multe trepte secvențiale și chiar pentru reacții care includ cicluri metabolice complete (fermentații).

În majoritatea cazurilor sistemele celulare sunt mult mai rezistente la perturbările din mediul înconjurător (variații de temperatură, pH, tărâie ionică etc.) și mai puțin sensibile la factorii de toxicitate (oxigen, ioni metalici etc.) decât enzimele pure immobilizate.

În cazul enzimelor sau sistemelor de enzime immobilizate se observă o descreștere a activității catalitice a agregatelor

datorită cantității relativ mari de enzimă legată pe suport și deci interacției de tip proteină-proteină. Asemenea descreștere a activității nu se observă în cazul sistemelor celulare immobilizate chiar în cazul unor concentrații microbiene foarte înalte (10^9 celule/ml suport).

Pe lângă aceste avantaje, preparatele de celule immobilizate prezintă și unele inconveniente legate de particularitățile materialelor celulare utilizate.

Astfel, deși se pot folosi pentru immobilizare și celule moarte (neviabile), activitatea catalitică a acestor preparate nu este mult diminuată în comparație cu cea a celulelor vii (viabile).

Immobilizarea celulelor viabile pune însă probleme legate de menținerea integrității celulare, de asigurarea unui mediu favorabil immobilizării acestora, ca și de eliminarea produșilor secundari ai metabolismului. De obicei, celulele immobilizate se alimentează suplimentar cu un mediu nutritiv sau cu o sursă de energie capabilă de a menține celulele viabile și active. Proliferarea asigurată astfel trebuie să fie suficient de lentă pentru a permite regenerarea cofactorilor corespunzători diferitelor etape ale unor reacții complexe. Pentru aceasta se poate folosi și o diluție înaltă a mediului de reacție.

Rezultă că utilizând celule immobilizate procesele biochimice devin heterogene, ceea ce crează probleme legate de difuzie, care nu permit utilizarea integrală a capacității catalitice a celulelor.

Viteza de reacție va fi optimă numai într-un strat periferic al agregatului. Pentru eliminarea acestui dezavantaj major se pot folosi mai multe metode:

- limitarea numărului de celule folosite (ceea ce va duce la diminuarea capacității reactoarelor cu celule immobilizate);

- reducerea dimensiunilor particulelor care va determina o creștere efectivă a ariei de transfer, dar designul reactorului și performanța sa sunt strâns legate de dimensiunile optime ale particulelor;

- creșterea concentrației substratului din faza exterioară (pot apare probleme legate de izolarea produșilor de reacție, recircularea substratului și creșterea vîscozității soluției de substrat);

- creșterea porozității și a dimensiunilor porilor suportului, care conduc la creșterea vitezei de difuzie (se utilizează în cazul celulelor cu dimensiuni mari).

Un dezavantaj al celulelor vii este bariera difuzională suplimentară reprezentată de membrana celulară. Acest dezavantaj poate fi evitat utilizând celule neviabile.

Celulele immobilizate nu reprezintă un biocatalizator convenabil pentru obținerea substanțelor macromoleculare, deoarece se reduce mult viteza de difuzie a substratelor și produșilor de reacție macromoleculari și aceasta cu atât mai mult cu cât gradul de polimerizare este mai ridicat. Acest inconvenient poate fi însă limitat de creșterea dimensiunilor porilor suportului.

O proliferare viguroasă a celulelor poate distruge preparatul immobilizat; deci proliferarea trebuie controlată.

Celulele vii nu trebuie să fie distruse prin imobilizare; de aceea se va alege, de la caz la caz, procedeul de imobilizare care să excludă acest accident nedorit.

Prima imobilizare de celule este cunoscută din 1966 (Mosbach și Mosbach); primele reacții biochimice cu celule immobilizate au fost efectuate în 1979 (Venkatasubramanian și Vieth).

Inițial s-au utilizat preparate de celule immobilizate pentru reacții necesitând existența unei singure enzime (aminoacilaza,

penicilinaza, glucoizomeraza, aspartaza, fumaraza, lactaza etc.),
ou aplicații industriale.

De abia în perioada 1982-1983 s-au abordat și reacții în
mai multe etape (fermentații, bioconversii), necesitând sisteme
enzimatice multisevențiale, cofactori specifici, recuperarea și
regenerarea ATP etc. În acest scop s-au utilizat agregate inselu-
bile obținute prin imobilizare de organite celulare, spori ca și
celule vegetale și animale, viabile sau neviabile.

Datorită caracterului de proces catalitic heterogen al
reacțiilor biochimice care utilizează celule imobilizate, se fo-
loresc cu succes în special reactoare-coloană cu procedeu în flux
continuu, ceea ce duce la o scădere drastică a costurilor de fa-
bricație.

Metoda este folosită pe scară industrială în procesele fer-
mentative bazate pe culturi de celule imobilizate, cu proliferare
controlată.

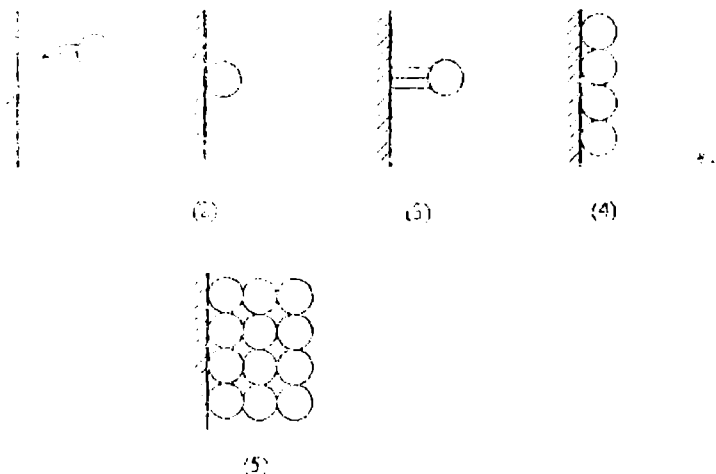
În timp ce fermentația convențională necesită o densitate
microbiană scăzută și deci manipularea unor volume mari de soluții
diluante de substrat, celulele imobilizate (cu o densitate mare de
celule per unitatea de volum al reactorului) determină viteze mari
de reacție și randamente bune în producție. Operația din fermentor
rămâne posibilă și la diluții mari ale substratului. Productivita-
tea reactorului se poate diminua în timp, datorită formării conti-
nue de metaboliți toxici în celulele viabile imobilizate.

Asemenea reactoare pot asigura o recirculare continuă a
substratului, ceea ce duce la îmbunătățirea vitezelor de difuzie
ale substratului la situsul catalitic al agregatului suport-celu-
le.

În fig. nr. 1 este prezentată schema diferitelor etape ale
imobilizării celulelor microbiene pe o suprafață solidă.

Fig. nr. _____

Etapele imobilizării celulelor pe un suport solid



Etapa de apropiere (1) a celulelor de suprafața suportului are loc prin diverse mecanisme de transport de masă: convecție, difuzie, sedimentare. În faza (2) apar interacții (de natură fizică sau/și chimică) care rețin celulele pe suprafață. Apoi celulele aderă puternic (3); multiplicarea lor conduce la colonizarea suportului (4) și eventual la formarea unui biofilm (5).

Aderarea microorganismelor pe suport este influențată atât de proprietățile electrice ale suprafeței cât și de hidrofobicitate. Astfel, microorganismele hidrofobe vor adera la materiale ca: sticlă, polimeri sintetici, dar aderarea va fi influențată de apariția unor repulsii electrostatice de tip celulă-celulă sau celulă-suport, ca și de influența pH-ului și a sării ionice a mediului exterior.

Celulele hidrofile vor adera numai pe suporturi care se pot încărcă pozitiv (suprafețe metalice acoperite cu oxizi) sau pe

suporturi tratate în prealabil pentru a le micșora sarcina negativă a suprafeței).

Diferitele tratamente ale suprafeței vor determina deci scăderea repulsiilor electrostatice celulă-celulă și celulă-suport, favorizând atracția celulă-suport.

În tabelul Nr. 1 sunt date câteva sisteme de imobilizare a unor microorganisme prin tratamente care modifică sarcinile suprafețelor suportului și celulelor.

Tabelul Nr. 1

Imobilizarea microorganismelor prin adsorbție, datorită modificării sarcinilor suprafețelor celulelor și suportului

Specia	Suport		Tratarea	
	Compoziție	Morfologie	Celulelor	Suportului
1	2	3	4	5
Saccharomyces cerevisiae	sticlă, policarbonat	p	$Al^{3+}; Fe^{3+}$	-
	sticlă	p	-	$Fe_2O_3, Al(OH)_3$ Fe^{3+}
	sticlă, metale și polimeri organici	p	-	
Arthrobacter simplex	sticlă	p	Al^{3+}	-
	sticlă	p, b, f	-	$Al(OH)_3$

Tabelul Nr. 1 (continuare)

1	2	3	4	5
Acetobacter acetii	sticlă, mioă, polimeri organici	p	-	Fe ³⁺
Corynebacterium glutamicum	sticlă	r	-	DEAE-dextran, aminosilan
Xanthomonas campestris	sticlă sticlă	p p	Al ³⁺ -	- Al ³⁺ ; Al(OH) ₃
Escherichia coli	sticlă	p	Al ³⁺	Al ³⁺
Bacillus licheniformis	sticlă, policar- bonat poliuretan sticlă	p s f	-	Fe ³⁺ , chitosan, DEAE-dextran, aminosilan
Klebsiella oxytoca	sticlă poliuretan	p,f s	- -	chitosan chitosan
Kluyveromyces lactis	sticlă policarbonat	p,f p	- -	chitosan chitosan
Kluyveromyces lactis și Klebsiella oxytoca, coimo- bilizate	sticlă	f	-	chitosan

Abrevieri: b = perle; f = fibre; s = spumă; p = plăcuțe;
r = inele Rachig sau de sticlă poroasă

Din acest tabel se observă că fixarea celulelor se poate realiza prin tratarea lor sau a suportului cu ioni ca Al^{3+} sau Fe^{3+} , sau prin utilizarea unor schimbători de ioni (chitosan, DEAE-dextran) depuși pe suprafața suportului sau prin scoperirea suportului cu un strat de particule coloidale încărcate pozitiv $[Al(OH)_3, Fe_2O_3]$.

I.2. Tipuri de suporturi utilizate la imobilizarea celulelor

Principiul general al fixării celulelor pe suport solid nu diferă esențial de cel al imobilizării enzimelor pure, la baza obținerii agregatelor suport-celule stând (ca și în cazul enzimelor) formarea de legături fizice sau chimice între suport și suprafața celulelor.

De cele mai multe ori alegerea suporturilor este empirică, puține dintre ele având o utilizare universală.

Se folosesc atât suporturi anorganice cât și organice; acestea din urmă sunt preferate, deoarece oferă o varietate mai mare de grupări reactive pe suprafața lor ($-NH_2$, $-COOH$, $-OH$ etc.).

I.2.1. Suporturi organice

Se folosesc pentru imobilizarea celulelor: polizaharide, proteine și polimeri sintetici (tabelul Nr. 2)

Pe asemenea suporturi celulele pot fi imobilizate prin: includere, encapsulare (cu sau fără reticulare), adsorbție, sau legare covalentă.

Tabelul Nr. 2

Suporturi organice folosite pentru imobilizarea celulelor

Polizaharide	Celuloză Agar/ageroză Chitosan Dextran Carageenan Alginat Pectat Gumă xantanioă
Proteine	Colagen Gelatină Albumină Fibrină
Polimeri sintetici	Poliacrilamidă Polimetacrilat Poliuretan Rășini epoxi Polistiren Poliesteri Polipropilenă Polipropilenoxid Alcool polivinilic Poliolorură de vinil

I.2.2. Suporturi anorganice (Tabelul Nr. 3)

Deși mai puțin folosite pentru imobilizarea celulelor (având mai puține grupări reactive pe unitatea de suprafață), suporturile anorganice au o stabilitate termică bună și proprietăți reologice excelente (nu sunt deformabile).

Tabelul Nr. 3

Suporturi anorganice pentru imobilizarea celulelor

Neactivate	Alumină (Al_2O_3) Oxid de zirconiu (ZrO_2) Oxid de magneziu (MgO) Silice (SiO_2) Sticlă Ceramică Nisip Oxid de titan (TiO_2) Feromagnetită
Activate	Suporturi activate ou diverși agenți de cuplare

În soluție, suprafața acestor materiale se hidratează și grupele -OH reținute pot reacționa direct cu grupările -COOH sau -NH₂ de pe suprafața celulelor. Se pot folosi și suporturi anorganice modificate, cu grupări -NH₂ sau -CHO pe suprafață.

Tehnicile de imobilizare a celulelor utilizate în cazul suporturilor anorganice sunt: adsorbția și legarea covalentă.

Din cele de mai sus se poate trage concluzia că celulele pot fi immobilizate pe suporturi (organice sau anorganice) atât prin metode fizice (adsorbția, includerea, încapsularea) cât și chimice (prin legare covalentă).

I.3. Mecanismul immobilizării celulelor pe suporturi

Există un număr de șase mecanisme distinote, responsabile de immobilizarea celulelor pe un suport insolubil și anume:

Pentru immobilizarea fizică

- a) Interacții electrostatice celule-suport
- b) Formarea de legături ionice între grupele $-NH_2$ sau $-COOH$ de pe suprafața celulei și o grupare reactivă de pe suprafața suportului.
- c) Adsorbția biospecifică, prin care centrii specifici receptori de pe suprafața celulei pot fi utilizați pentru legarea pe un suport solid.
- d) Includerea fizică în polimeri atât a celulelor viabile cât și a nutrienților și a produsilor de reacție ce pot difuza în faza exterioară.

Pentru immobilizarea chimică

- e) Formarea de legături covalente parțiale între grupările $-NH_2$ sau $-COOH$ de pe suprafața celulelor și grupările $-OH$ de pe suprafața suporturilor anorganice de tip sticlă sau ceramică.
- f) Formarea de legături covalente între grupările reactive de pe suprafața celulelor și grupările grefate pe suportul activat, cu ajutorul unor agenți de cuplare (izocianat, aminosilan, glutaraldehidă, carbodiimidă, imidoeter etc.).

I.4. Criterii de alegere a suporturilor

Condițiile pe care trebuie să le îndeplinească suportul (în afară de cele legate strict de interacțiile celule-suport) pentru obținerea unor agregate stabile și cu o activitate biocatalitică ridicată sunt:

- Suportul nu trebuie să fie toxic față de celule și să nu afecteze negativ metabolismul celular.

- Capacitatea înaltă de retenție a suportului față de celule (raportată la greutatea celulelor uscate/gram de suport). Din acest punct de vedere este preferată tehnica includerii în geluri de polimeri (cu o retenție mult mai bună) comparativ cu adsorbția.

- Suportul trebuie să fie stabil la temperaturi înalte, la presiuni ridicate și la domeniile specifice de pH în care urmează a fi folosit.

- Se preferă suporturi cu o porozitate înaltă, care permit o bună legare a celulelor și o difuzie convenabilă a substratului.

- Suporturile cele mai bune trebuie să se pretese cu ușurință la transformarea în particule cu dimensiuni dorite și să nu prezinte variații mari de volum în cursul operațiilor.

- Suporturile, ca și tehnica de imobilizare trebuie alese în așa fel încât să se evite ca microorganismele imobilizate să producă substanțe secundare ca: gume, oleiuri, nămoluri care reduc viteza reacțiilor principale și impurifică produșii de reacție.

O metodă de imobilizare a celulelor utilizată uneori este și reticularea acestora, în absența unui suport insolubil.

Procedeul cel mai utilizat de imobilizare a celulelor viabile este includerea în geluri insolubile cu variantele tehnice cunoscute (obținere de particule, fibre, microcapsule, Hollow-fibers, filme).

I.5. Tehnici de imobilizare a celulelor

În linii mari, tehnicile de imobilizare fizică și chimică a celulelor respectă aceleași principii ca în cazul imobilizării enzimelor pure, cu modificări legate de particularitatea lucrului cu celule.

În celulele vii numai un număr limitat de enzime sunt stabile și au o activitate catalitică persistentă. În unele cazuri enzimele sunt produse în celulă ca intermediari, doar pentru o scurtă perioadă de timp în ciclul unui proces fermentativ, astfel încât activitatea lor scade rapid odată cu divizarea și creșterea celulelor. Sunt și tipuri de enzime care o dată formate rămân în celulele vii, limitând drastic utilizarea acestora drept biocatalizatori.

Deși s-au propus metode de tratare ulterioară pentru a stabiliza activitatea în scădere rapidă a unor enzime, nu s-a descoperit totuși un procedeu universal de protecție a acestora.

De la caz la caz, menținerea activității enzimatică poate fi obținută prin tratamente ca: deshidratarea parțială a celulelor, modificarea pH-ului, preincubarea cu ioni metalici, șocuri termice, tratare controlată cu detergent, autoliza parțială, inducerea autofloculării, reticularea intracelulară, permeabilizarea celulei.

Chiar celulele tratate pot fi considerate biocatalizatori insolubili, suportul fiind însuși matricele celulare. Celulele tratate nu pot fi folosite decât pentru reacții într-o singură etapă.

Sporii de funghi și bacterii au un conținut stabil în enzime; sporii pot fi considerați ca niște adevărate „containere” stabile și neutre pentru un mare număr de enzime uzuale. Cu asemenea materiale se pot cataliza multe reacții ca: bioconversia steroizilor, bioconversia acizilor grași la 2-cetoacizi (cu spori de funghi)

bioconversia amidonului la glucoză (cu *Aspergillus wentii* ocnidia), oxidarea trigliceridelor la metilcetone (spori de fungi), bioconversia penicilinei V la acid 6-aminopenicilanic (spori de *Fusarium*) etc.

I.5.1. Tehnici de imobilizare fizică

I.5.1.1. Adsorbția

În natură se cunosc cazuri de formare de filme microbiene pe: particule de nisip, argilă, țesuturile plantelor, tuburi de PVC, suprafețe metalice, sticlă etc.

Fiind o metodă blândă de imobilizare, adsorbția implică minima denaturare a celulelor. Adsorbția este influențată de natura chimică a suprafeței celulei, care poate fi formată din peptide, polihexozamine, acid diaminopimelic, încărcate cu centri cu sarcini ionice necesare fixării pe suport. Între suprafața celulei și cea a suportului mai pot apărea interacții van der Waals, legături ionogene (ioni ca: Fe^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} au un rol asemănător cu cel al punților de hidrogen).

Deși este o tehnică rapidă și simplă, adsorbția nu este ideală, depinzând în majoritatea cazurilor de pH. În plus, sarcinile celulelor se pot modifica odată cu vârsta și pot altera condițiile de microvecinătate. Simplitatea procedurii îl recomandă pentru o serie de aplicații practice (Tabelul Nr. 4).

Tabelul Nr. 4

Exemple de celule microbiene adsorbite pe diverse suporturi

Specia	Suportul	Enzima	Produs de reacție
Azobacter acetii	Ceramică	Sistem multi-enzi- matic	Acid acetic
Aspergillus niger	Stiolă	Idem	Acid citric
Escherichia coli	Dowex 1	-	-
Nocardia erythropolis	DEAE-celuloză	Colesterol- oxidaza	Colest-4-en-3-onă
Saccharomyces cerevisiae	Amberlit	Sistem multi-enzi- matic	Etanol
S.cerevisiae	Căramidă	Idem	Etanol
S.cerevisiae	ECTEOLA- celuloză	Idem	Etanol

A. Adsorbție pe suporturi organice

Dintre suporturile organice utilizate în tehnica imobilizării prin adsorbție a celulelor se remarcă trei categorii: rășinile schimbătoare de ioni, celuloza și derivații ai săi, și lectinele.

a) Rășinile schimbătoare de ioni (polimeri sintetici)

Se utilizează atât anioniți, cât și cationiți. Legătura

suport-celule este rezultatul direct al sarcinilor prezente pe suprafețe, al configurațiilor specifice ale centrilor încărcăți electric și al accesibilității grupărilor ionice funcționale.

Se folosesc rășini ca: copolimeri stiren-divinilbenzen (de tip Dcwex), copolimeri ai fenolului cu formaldehida sau polimeri ai stirenului și acidului malic.

Procedeu adsorbției constă în circularea unei suspensii de celule printr-o coloană cu rășină, urmată de spălare (pentru îndepărtarea celulelor nefixate).

În tabelul nr. 2 se regăsesc câteva exemple de suporturi de acest tip.

Adsorbția celulelor pe suport este influențată de: natura suportului, vechimea culturii de celule, concentrația inițială a celulelor, pH etc.

În condiții optime celulele viabile sunt bine reținute și chiar uneori adsorbția aduce modificări pozitive în fiziologia celulară.

Un exemplu de utilizare a unui agregat obținut prin adsorbție este fixarea celulelor de *Escherichia coli* pe un copolimer reticulat, insolubil, de tip stiren-polibromură de N-benzil-4-vinilpiridină. Aductul obținut se utilizează într-un procedeu continuu de sinteză a acidului L-aspartic din fumarat de amoniu.

Particulele sferice (perle) de rășină reticulată sunt introduse într-o coloană răcită cu apă, realizându-se astfel un reactor cu pat compact. Imobilizarea are loc prin trecerea unei suspensii de celule de *Escherichia coli* (care conține L-aspartază) prin coloana umplută cu perle de copolimer, după care se trece prin coloană o soluție de fumarat de amoniu tamponată.

Acidul L-aspartic se obține cu randament cantitativ, pH-ul optim al soluției de substrat fiind de 7,4-7,7, iar temperatura

de lucru egală cu 30°C. Atât condițiile de imobilizare cât și parametrii reacției nu impiedică asupra viabilității celulelor.

b) Celuloza și celuloza modificată

Celuloza se utilizează datorită stabilității sale crescute. Celulozele substituite cele mai folosite pentru imobilizarea celulelor sunt:

-DEAE-celuloza (conține gruparea $-NH_2$ puternic bazică, fiind un schimbător de anioni);

-CMC este un puternic schimbător de ioni acid.

Fiind fibroase, celuloza și celuloza modificată au o arie mare a suprafeței. Se utilizează de obicei sub formă perlată, având o porozitate înaltă.

Preparatele celulozice pot fi dizolvate în pentan, hexan sau decan în raport 1:10 până la 1:6, după care se insolubilizează prin tratare cu diizocianati sau cu aminopropilsilan.

De exemplu *Aspergillus oryzae* se poate adsorbi pe o coloană conținând NCTEOLA-celuloză spălată cu tampon fosfat 0,05 M (pH = 5,8). Celulele neimobilizate se îndepărtează prin spălare. Activitatea invertazei din *Aspergillus oryzae* astfel imobilizată rămâne stabilă. Preparatul poate fi folosit într-o baterie de celule, într-un proces enzimatic continuu.

c) Lectinele

Lectinele sunt proteine naturale ușor accesibile, fiind extrase din plante, legume, pești sau melci. Capacitatea lectinelor de a aglutina unele specii de celule se datorează abilității lor de a lega antigeni specifici pe suprafața celulelor, rezultând un proces de aglomerare. Se realizează în acest fel o legare selectivă a celulelor pe un suport inert. Tehnica este folosită pentru adsorbția celulelor animale. Lectina leagă antigenul simultan pe suprafața suportului și pe cea a celulelor bacteriene.

Puțin folosită, metoda oferă o variantă posibilă a imobilizării celulelor prin adsorbție.

B. Adsorbție pe suporturi anorganice

Pentru imobilizarea celulelor se poate folosi o gamă largă de materiale poroase (tabelul nr. 4) ca: nisip, sticlă, oărmidă, ceramică, silicați, particule cu proprietăți magnetice, oxizi ai metalelor și hidroxizi metalici precipitați etc.

Deși metoda de imobilizare este simplă și rapidă, legăturile dintre celule și suport sunt influențate de variația compoziției și proprietăților suprafeței suportului, ca și de pH, tărie ionică, vârsta celulelor, sarcina suprafețelor, aria suprafeței suportului.

Astfel, s-a observat că *Saccharomyces carlsbergensis* se adsorbe bine pe kieselgur la $\text{pH} = 3$ și pe bentonită acidă, iar pe aminobentonită numai la $\text{pH} = 5$.

Creșterea tăriei ionice a mediului are ca rezultat creșterea cantității de celule adsorbite la o anumită valoare a pH-ului.

Sarcinile suportului aflate în microvecinătatea celulelor afectează sarcinile acestora, interacțiunile de tip ion-ion putând duce la desorbție.

S-a arătat că, în general, celulele microbiene încărcate negativ se adsorb repede pe suprafața unor suporturi cu sarcini pozitive ca DEAE-Sephadex A-50 sau A-25, Amberlit IR-45 sau Biorad AG-21K. La prima vedere, surprinde cu atât mai mult faptul că aceleași celule încărcate negativ se pot atașa ușor și pe suprafața suporturilor anorganice cu sarcini de același semn (sticlă, ceramică).

Gradul de încărcare electrică depinde de modul de pretratare a suportului. Astfel, sticlele-frite au sarcini electrice slabe, pe când ceramicile acoperite cu oxid de zirconiu ca și sticla

poroasă prezintă sarcini negative mai mari, permițând o acumulare mare de celule pe suprafață. Aduoții rezultați vor avea o activitate enzimatică stabilă.

Se poate trage concluzia că simpla interacție electrostatică suport-celule nu este în totalitate responsabilă de imobilizarea acestora. În timpul imobilizării se formează probabil și legături covalente între celule și suprafața suportului.

O aplicație largă o au hidroxizii metalici precipitați în soluții apoase din săruri (de obicei $ZrCl_4$ sau $TiCl_4$). În funcție de pH, în cursul precipitării hidroxizii se polimerizează. Gradul de polimerizare este deci dependent de pH, iar polimerii gelatinoși rezultați conțin pe suprafața lor grupări-OH, care formează legături covalente cu grupările $-COOH$, $-NH_2$ sau $-OH$ de pe suprafața celulelor.

De exemplu, $Ti(OH)_4$ formează geluri la pH acid, iar $Zr(OH)_4$ la pH neutru sau alcalin.

În fig. nr.2 sunt schematizate legăturile de tip donator-acceptor formate între $Zr(OH)_4$ și ZrO_2 și grupările $-COOH$, $-OH$ și $-NH_2$ de pe suprafața celulelor.

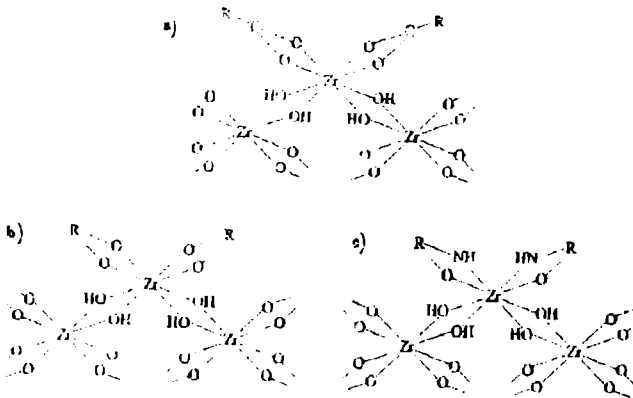
Pe hidroxizii metalici se pot imobiliza: *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus*.

Metodica generală a imobilizării constă în amestecarea suspensiei de celule cu un hidroxid metalic proaspăt precipitat, timp de câteva minute, după care se centrifughează celulele imobilizate.

Majoritatea celulelor rămân fixate pe suprafața gelului și o mică parte sunt incluse în el. Viabilitatea celulelor astfel imobilizate este bună.

Fig. nr. 2

Reprezentarea schematică a complexelor-chelați ai hidroxidului de Zr^{IV} cu grupările nucleofile de pe suprafața celulelor immobilizate: a) grupe $>C=O$; b) grupe $-OH$; c) grupe $-NH_2$



În cazul sticlelor și ceramicelor, formate în principal din oxizi de: Al, Si, Mg, Ti, în soluții tampon se formează pe suprafața lor hidroxizi; grupele $-OH$ din acești hidroxizi pot fi înlocuite cu grupările $-NH_2$ sau $>C=O$ de pe suprafața celulei, formându-se o legătură covalentă parțială.

Pe asemenea suporturi ca: sticle silicioase fritate, cordierit $[Mg_2Al_3(AlSi_5O_{18})]$ și ceramice zirconice se pot immobiliza *Penicillium chrysogenum* (micelii) și *Streptomyces olivochromogenes* (celule). În timp ce fungii preferă cordieritele, actinomyceetele se imobilizează mai bine pe frittă de sticlă.

Încorporând ioni metalici specifici în suporturi organice se poate asigura retenția celulelor prin același mecanism (Kolot 1980). De exemplu, introducând ioni Fe^{3+} în pectat reticulat cu imino-

diacetat, se pot lega celule de drojdie, care în absența ionului metalic nu ar fi reținute.

I.5.1.2. Includerea celulelor în geluri insolubile

Celulele se pot include în geluri organice sau anorganice preformate sau printr-o operație simultană de formare a gelului insolubil și de fixare a celulelor. Se folosesc atât materiale sintetice cât și naturale. În tabelul nr. 5 se pot găsi exemple de celule incluse în geluri de poliacrilamidă.

Tabelul nr. 5

Exemple de celule microbiene incluse în poliacrilamidă

Specia	Enzimele	Substrat	Produs de reacție
1	2	3	4
Acetobacter Suboxydans	Sistem multienzimatic	Glicerină	Dihidroxiacetona
Aspergillus niger	Idem	Glucoză	Acid gluconic
Bacillus megaterium	20 α - și 20 β - hidrosteroid- dehidrogenaza	Cortizon	Derivat 20-hidro- xilio
Corynebacterium dismutans	Sistem multienzimatic	¹⁴ C-Glucoză	¹⁴ C-Alanină
Escherichia alcalescens	β -Galactozidază	Lactoză	Glucoză + Galactoză

Tabelul nr. 5 (continuare)

1	2	3	4
<i>Escherichia alcalescens</i>	Aspartază	Fumarat de amoniu	Acid L-aspartic
<i>Escherichia coli</i>	β -Galactozidază	Laotoză	Glucoză + Galactoză
<i>Escherichia coli</i>	Sistem multienzimatic	Indol + Piruvat + NH_3	L-Triptofan
<i>Escherichia coli</i>	Idem	L-Glutamat + L-Cisteină + Glicină	Glutation
<i>Glucanobacter melanogenes</i>	Idem	L-Sorboza	L-Sorboză
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alcool- dehidrogenaza	Etanol + NAD^+	Acetaldehidă + NADH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sistem multienzimatic	Glucoză	Etanol
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertază	Zaharoză	Glucoză + Fructoză
<i>Penicillium ohrysoenum</i>	Sistem multienzimatic	Glucoză + NH_3 + Acetat de fenil	Penicilina G
<i>Streptomyces olavuligerus</i>	Idem	Glucoză	Cefalosporine
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	β -Galactozidază	Laotoză	Glucoză + Galactoză

În cazul unor polimeri, includerea este exclusiv fizică, pe când în alte cazuri se formează în plus și legături covalente parțiale între celule și suport.

Indiferent de natura gelului, se aplică în general trei metode de includere a celulelor:

a) Polimerizarea în bloc în prezența celulelor, urmată de dezintegrarea mecanică în particule. Este o metodă simplă dar prezintă dezavantajul obținerii unor particule neregulate, improprii pentru utilizarea în coloane, datorită riscului tasării.

b) Topirea polimerului preformat sub formă de perle (picături). Particulele rezultate au o suprafață uniformă dar nu se pretează la imobilizarea unor cantități mari de celule.

c) Formarea de picături (perle) într-un sistem bifazic. Particulele vor reține o cantitate mare de celule, agregatul format putând fi utilizat la umplerea unor coloane.

Asemenea perle se obțin prin suspendarea unui amestec apos de celule și polimer preformat într-o fază hidrofobă.

Natura gelului ca și modul de includere diferă de la caz la caz, în funcție de natura celulelor; se alege metoda prin care se obțin agregate cu activitate enzimatică maximă.

Astfel, utilizând poliacrilamida mecanismul formării gelului (din precursorul acrilamidă) este radicalic, ceea ce duce la o pierdere parțială a celulelor.

Alginatul se poate folosi la includerea celulelor vii, dar gelul se poate distruge în prezența iemului fosfat.

O problemă serioasă a includerii în geluri o constituie efectele difuziei externe care pot duce la scăderea activității enzimatice a celulelor. Astfel, pentru a proteja celulele de factorii externi defavorabili, se poate recurge la modificarea porozității gelurilor de poliacrilamidă. Barierele impuse de

permeabilitatea membranei celulare pot fi îndepărtate printr-o autoliză controlată, prin uscarea, liofilizarea sau înghețarea celulelor, sau prin tratarea celulelor cu toluen sau cu agenți tensioactivi. Deși aceste tratamente pot mășori viabilitatea celulelor, se conservă totuși activitatea enzimatică.

1° Polimeri sintetici

Supporturile formate din polimeri sintetici prezintă avantajul unor proprietăți fizico-chimice bune pentru imobilizarea celulelor.

În acest scop se pot folosi atât polimeri hidrofobi (în special poliacrilamida), cât și hidrofilii (poliuretani).

Gelurile se prepară prin cele două metode cunoscute (polimerizarea precursorilor simultan cu imobilizarea celulelor sau imobilizare pe polimeri preformați).

A. Poliacrilamida

În cazul includerii celulelor simultan cu formarea gelului de poliacrilamidă, mecanismul reacției fiind radicalic, apare o pierdere severă de celule. În tabelul nr. 5 am dat câteva exemple de utilizare a gelului de poliacrilamidă pentru includerea unor celule.

Procedeul general constă în polimerizarea unei emulsii apoase de acrilamidă, conținând celule în suspensie. Deși tehnica includerii este ușor accesibilă, iar modificarea enzimelor este redusă, gelul este toxic pentru celulele vii. Întrucât poliacrilamida este un polimer liniar, polimerizarea se face în prezența unui agent de reticulare (BIS) care permite obținerea unui gel cu structură tridimensională. Puterea catalitică a agregatului suport-celule depinde direct de concentrațiile relative ale acrilamidei, agentului de reticulare (BIS) și celulelor din amestecul inițial.

Pentru inițierea polimerizării se utilizează metoda chimică (folosind: persulfati, -dimetilaminopropionitril sau TEMED) sau metoda fotochimică (utilizând: hidrosulfid de sodiu, riboflavină și TEMED).

Polimerizarea se conduce într-o soluție izotonică tamponată, la 4-15°C.

Pentru a se evita dezavantajele datorate polimerizării radicalice a acrilamidei în prezența celulelor vii, în 1981, Freeman și Aharonowitz au propus utilizarea poliacrilamidei liniare preformate, substituite parțial cu grupări acrilhidrazidice și solubilă în apă.

O variantă a gelurilor sintetice de poliacrilamidă utilizată la includerea unor microorganisme, o constituie copolimerii N-alchil-acrilamidelor termic-reversibili, care prezintă LCST (vezi pag. 43 vol. I).

Astfel, *Arthrobacter simplex* a fost imobilizat de către Park și Hoffman într-un gel copolimer de N-isopropilacrilamidă (90%) și acrilamidă (10%), reticulat cu BIS (4%), având LCST = 37-40°C.

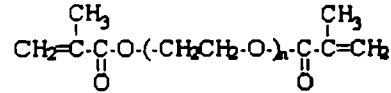
Aductul obținut se folosește pentru construcția unor reactoare „batch”. Cinetica reacțiilor catalizate de aductul gel-microorganism este influențată de temperatură, care controlează dimensiunile porilor gelului-suport. Cu ajutorul aductului obținut s-a convertit hidroocortizonul la prednisolon (via 3-cetosteroid- Δ^1 -dehidrogenaza).

B. Poli-alchilenglicoli foto-reticulabili

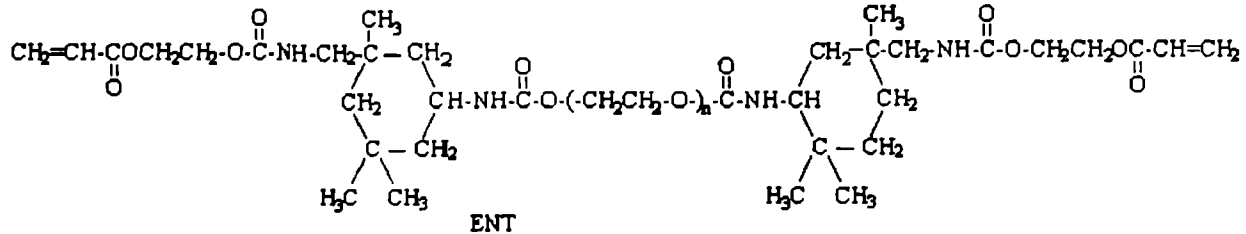
Fukui și colaboratorii (Univ. din Kyoto) au propus utilizarea unor polimeri preformați, cu lanțuri polietilen- și polipropilenglicolice foto-reticulabili, a căror sutură este cea indicată în fig.nr. 3.

Fig. nr. 3

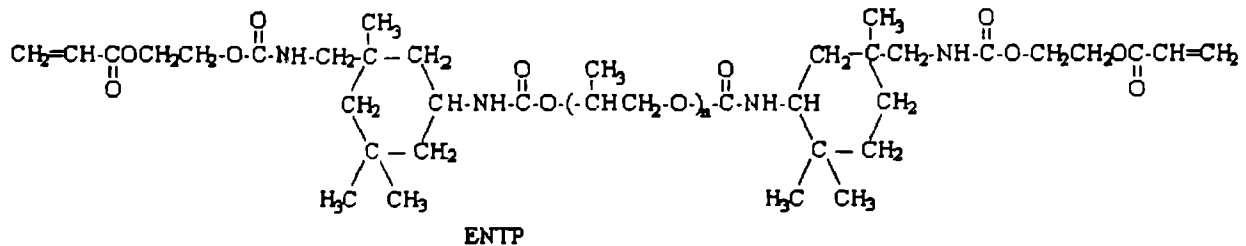
Structura chimică a unor rășini polimere, foto-reticulabile



PEGM



ENT



ENTP

Acești polimeri conțin grupe acriloil terminale, fotoreticulabile. Masa moleculară a polimerului poate fi ajustată, pentru a se obține catene de lungimea dorită. Dacă lanțul polimerului este de tip polietilenglicolic rezultă un gel hidrofîl; gelurile pe bază de polipropilenglicol sunt hidrofobe.

Reticularea polimerului are loc rapid la iradierea cu radiații UV a soluției sale, conținând celule în suspensie în prezența unor cantități mici de fotosensibilizator (eterul etilic sau izobutilic al benzoinel), timp de 3-5 minute (tabelul nr.6).

Tabelul Nr. 6

Exemple de celule microbiene incluse în rășini
prepolimerice foto-reticulabile

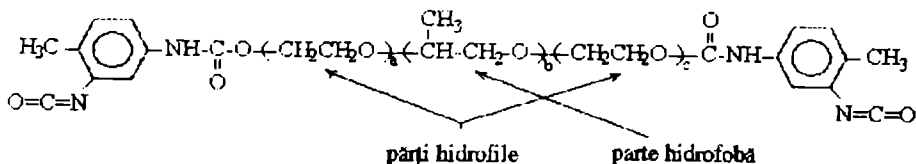
Specia de celule	Enzima	Substrat	Produs
1	2	3	4
Arthrobacter simplex	3-Cetosteroid- Δ^1 -dehidrogenaza	Hidrocortizonă	Prednisolonă
Brevibacterium ammoniagenes	Multi-enzimatic	Pantotenat + Cisteină + ATP	Coenzima A
Corynebacterium sp.	9- α -Hidroxi-laza	4-Androsten-3,17-dionă	9 α -Hidroxi-4-androsten-3,17-dionă
Curvularia lunata	11 β -Hidroxi-laza	Compus S-Reichstein	Cortisol
Enterobacter aerogenes	Transglicozilaza	Uracil-arabinozid + Adenină	Adenin-arabinozid

Tabelul nr.6 (continuare)

1	2	3	4
Rhizopus stolonifer	11- α -hidroxilaza	Progesteronă	11- α -Hidroxiprogesteronă
Rhodotorula minuta	Hidroxilază stereospecifică	(\pm) Mentil- succinat	(-) Mentol
Saccharomyces sp.	Multi-enzimatic	Glucoză	Etanol

C. Poliuretani

În 1982, grupul Fukui (Japonia) a propus pentru imobilizarea celulelor un polimer poliuretanic preformat cu structura următoare:



Variind rapoartele dintre a, c și b se poate modifica hidrofobicitatea gelului.

Acești polimeri sunt miscibili cu apa; prin amestecarea lor cu o suspensie de celule are loc o reacție în urma căreia se elimină CO_2 și se formează uree substituită. Celulele se includ în acest gel astfel „autoreticulat”. În tabelul nr. 7 se dau câteva exemple de celule imobilizate prin această metodă.

Tabelul Nr. 7

Exemple de celule microbiene incluse în polimeri
uretaniei

Specia	Enzima	Substratul	Produsul
Athrobacter simplex	3-Cetosteroid- - Δ^1 -dehidrogenaza	Hidrocortizonă	Prednisolonă
Aspergillus phoenicis	11- β -Hidroxi- laza	Progesteronă	11- β -Hidroxi- progesteronă
Escherichia coli	Penicilin-G- -Acilaza	Penicilina G	G-APA
Nocardia rhodocrous	Steroid- Δ^1 - -dehidrogenaza	3- β -Hidroxi- - Δ^5 -steroide	3-Ceto- Δ^4 - -steroide
Nocardia rhodocrous	Steroid- Δ^1 - -dehidrogenaza	Testosteronă	Δ^1 -Dehidrotesto- steronă

Pentru imobilizarea celulelor în geluri de poliuretani se pot folosi și prepolimeri (izocianati), după metoda recomandată în 1981 de Kluge și Klein, policondensarea și includerea desfășurându-se simultan.

Polimerul rezultat poate avea structură de spumă sau de gel. Având o structură foarte poroasă, spuma se poate folosi în reactoare cu pat compact.

D. Rășini epoxi

Rășinile epoxi au o rezistență mecanică ridicată și o mare

stabilitate chimică, ceea ce le conferă aplicabilități tehnologice.

Pentru imobilizarea celulelor se recomandă metoda policondensării unui precursor (prepolimer) epoxi hidrosolubil sau hidroemulsionabil cu o poliamină, la temperatura camerei (Klein și Eng, 1979; Klein și Kressdorf, 1982).

Metoda a fost folosită de Klein și Wagner în 1980, pentru imobilizarea celulelor de *Escherichia coli* care conțin penicilinază necesară fabricării acidului 6-aminopenicilinic (G-APA).

În schimb celulele de drojdie imobilizate pe această cale nu sunt viabile.

În general, imobilizarea pe rășini epoxi se folosește la celulele mai puțin sensibile, de obicei pentru obținerea unui sistem de enzime multisevențiale.

O foarte bună supraviețuire a celulelor sensibile de *Saccharomyces cerevisiae* poate fi obținută prin incubarea celulelor incluse într-un mediu nutritiv. Agregatul obținut poate fi folosit pentru producția industrială a etanolului.

2°. Polimeri naturali

În cazul utilizării polimerilor naturali (în general de tip peptide sau polizaharide) metoda de includere a celulelor constă în gelificarea acestor macromoleculă „preformate”.

Metodele de gelificare trebuie să fie blânde pentru a proteja celulele imobilizate și diferă în funcție de structura polimerului.

Se cunosc, în general, trei metode de imobilizare pe asemenea polimeri.

A. Gelificarea termică

Prin răcire, soluțiile apoase ale unor polimeri naturali

formează geluri, care prezintă în general fenomenul de histereis (temperatura de gelificare este inferioară temperaturii de topire pentru o concentrație specifică fiecărui polimer). Polimerii folosiți în acest caz sunt: colagenul, gelatina hidrolitică rezultată de la colagen, agarul, agaroză și k-carrageenanul.

Pentru a mări rezistența mecanică și chimică a gelurilor, acestea se tratează uneori cu un stabilizator.

a) Colagenul a fost folosit pentru prima oară la imobilizarea celulelor în 1979 la Universitatea Rutgers din USA, de către Venkatasubramanian și Vieth.

Colagenul este hidrofil și se gonflează în apă; mecanismul imobilizării celulelor în colagen implică interacții ionice, legături de hidrogen și forțe van der Waals între celule și resturile de aminoacizi din lanțul proteinei, conducând la formarea unor agregate suport-celule foarte stabile.

Un procedeu de imobilizare în colagen poate fi descris astfel: 0,5-5% colagen se dispersează în apă acidulată (pH ~ 6,5), după care se adaugă celulele, astfel ca raportul celule/colagen să fie de 0,2/3 material uscat, în greutate.

După floclare, se modifică încet pH-ul de la 6,5 la 11,5, sub agitare, pentru a se dispersa microfibrilele de colagen ce conțin pe suprafața lor celule.

Amestecul obținut se întinde sub forma unei membrane cu grosimea de 2-10 mm, care se usucă și se cufundă apoi într-o soluție de glutaraldehidă (10%) sau de formaldehidă (pH=8,0), timp de 0,5-5 minute, pentru reticulare. Membranele obținute, spălate și uscate, se pot folosi pentru construcția unor reactoare, în alternanță cu foi de hârtie de filtru. Colagenul este un suport excelent, ieftin și accesibil, care reține cantități mari de celule.

În tabelul nr 8 se dau câteva exemple de aplicații ale

gelurilor de collagen.

Tabelul Nr. 8

Utilizarea gelurilor de collagen pentru includerea celulelor microbiene

Specia de celule	Enzima	Substrat	Produs
Streptomyces griseus	Sistem multienzimatic	Glucoză	Candioidină
Saccharomyces cerevisiae	Invertaza	Zaharoza	Glucoză + fructoză
Corynebacterium lilium	Sistem multienzimatic	Glucoză	Acid glutamic
Acetobacter sp.	Sistem multienzimatic	Etanol	Acid acetic
Pseudomonas aeruginosa	-	Ape reziduale	Plutoniu + apă

b) Gelatina

Derivatul hidrolitic al collagenului este un bun suport pentru imobilizarea celulelor (tabelul nr. 9).

Tabelul Nr. 9

Exemple de celule microbiene incluse în gelatină

Specia	Enzima	Substrat	Produs
1	2	3	4
Arthrobacter X-4	Xantinoxidaza	1-Metilxantina	Acid 1-metiluric

Tabelul nr.9 (continuare)

1	2	3	4
Aot. missouriensis	Glucioizomeraza	Glucoza	Fructoza
Aspergillus phoenicis	11- β -Hidroxi- laza	Progesteronă	11- β -Hidroxiprogesteronă
Saccharomyces cèrevisiae	Invertaza	Zaharoza	Glucoză + fructoză
Streptomyces sp.	Glucioizomeraza	Glucoză	Fructoză

Pentru imobilizare, suspensia apoasă de celule se amestecă cu o soluție apoasă 20% de gelatină, la 40°C, astfel încât raportul celule/gelatină să fie 1/10 (material uscat, în greutate).

Amestecul se răcește, iar gelul obținut se liofilizează. Preparatul este apoi mărunțit în particule mici, care se stabilizează prin reticulare cu glutaraldehidă sau cu formaldehidă.

O variantă a acestui procedeu include reticularea simultană cu imobilizarea celulelor. Pentru aceasta, glutaraldehida se adaugă la suspensia caldă de gelatină/celule înainte de răcire.

În acest caz nu mai este necesară liofilizarea.

Microsuporturile pe bază de gelatină se folosesc și pentru cultivarea celulelor animale, mai puțin stabile (Nilsson și Mosbach, 1980).

c) Agarul și agaroză

În moleculele agarului și agarozei, care au caracter bazic, unitățile de agarokioză alternează cu resturi de β -D-galactopiranoză legată 1,3 și cu resturi de 3,6-anhidro- α -L-galactopiranoza

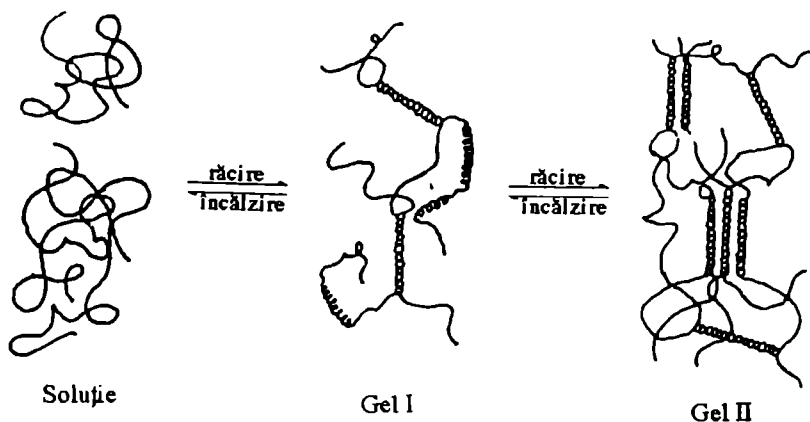
legată 1,4.

Uneori, pe lanțul agarobiozei pot apare grupările: sulfat (esterică), metoxil, cetal-piruvat și-COOH.

Formarea gelului de agar și agaroză se poate schematiza astfel (fig.nr.4).

Fig. nr. 4

Mecanismul de formare a gelului pentru agaroză și carageenan



Se pot obține varietăți de agaroză cu diferite temperaturi de gelificare, prin modificări chimice, introducând în molecula polimerului grupări hidroxietil. Asemenea preparate pot forma geluri la temperaturi de sub 15°C. Aceste geluri se folosesc la imobilizarea unor celule termolabile, dar au o stabilitate mecanică relativ mică.

Un gel stabil și cu bune calități se formează la 30-40°C.

Ca mod de lucru general, polimerul (2-5% în greutate) se dizolvă la cald într-o soluție tampon sau într-un mediu compatibil cu celulele. Soluția obținută se răcește la o temperatură cu

5-10°C deasupra temperaturii de gelificare și apoi se amestecă cu celulele. Deși cantitatea de celule inclusă poate fi considerabilă, se preferă obținerea unui aduot cu concentrația în celule de 1-5% în greutate.

Forma particulelor obținute final depinde de modul de pregătire a gelului. Astfel, Toda și Shoda (1975) au obținut particule sferice (perle) injectând suspensia caldă de celule/polimer într-un amestec cald de toluen și tetracloretan. Datorită solvenților utilizați preparatul nu este viabil.

Celulele viabile se pot imobiliza în polimeri cu temperaturi joase de gelificare.

Prezent se utilizează gelificarea în bloc, cu dispersia mecanică ulterioară a particulelor.

Particule sferice (perle) se pot obține și prin dispersarea unei suspensii de celule-polimer într-o fază inertă, hidrofobă, caldă (ulei vegetal, tributilftalat) înaintea gelificării (Nilsson și colaboratorii, 1983).

În tabelul nr.10 sunt date exemple de utilizare a gelurilor de agar și agaroză.

Tabelul Nr. 10

Exemple de celule incluse în agar și agaroză

Specia	Enzima	Substrat	Produs
1	2	3	4
Escherichia coli	Timidinfosforilază	Timidină	Timină
Escherichia coli	Penicilinacilază	Penilacetil-ADCA	7-ADCA

Tabelul nr. 10 (continuare)

1	2	3	4
<i>Escherichia coli</i>	Aspartază	Fumarat de amoniu	Acid L-aspartic
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Sistem multienzimatic	Malat	Hidrogen
<i>Rhizopus nigricans</i>	11 - α - Hidroxilaza	Progesteronă	11 - α - Hidroxipro-gesteronă
<i>Pseudomonas putida</i>	Sistem multienzimatic	Cafeină	Soluție decafe-inizată

Dezavantajul major al agarozei este prețul său de cost ridicat.

O aplicație frecventă a includerii invertazei din drojdie în perle de agaroză este invertirea zahărului în reactoare cu pat fluidizat la 47°C. După 100 ore se observă o activitate remanentă foarte bună a celulelor imobilizate.

d) Kapa-carageenan

k-Carageenanul este o polizaharidă extrasă din alge marine, formată în principal din 4-sulfatul β -D-galactozei și din 3,6-anhidro-D-galactoză.

Cu excepția sării sale de sodiu, k-carageenanul este insolubil în apă rece. Prin amestecarea cu apă rece rezultă o dispersie grosieră care necesită încălzire pentru dizolvarea polimerului. Temperatura de gelificare și calitatea gelului depind atât de concentrația polizaharidului cât și de ioni metalici prezenți în mediu (K^+ , NH_4^+ , și Ca^{2+}).

Neavând efecte toxice, k-carageenanul se utilizează în industria alimentară.

Ca și agaroză, k-carageenanul formează geluri în condiții

blânde (fig.nr.4) și în plus poate lega și unii cationi.

Dacă se înlocuiesc ionii K^+ prezenți în polimerul natural cu ionii Na^+ , temperatura de gelificare scade considerabil.

Astfel, majoritatea celulelor termolabile pot fi incluse în gel de carageenan 5% (în greutate), la 25°C. Prin includerea în k-carageenan se mențin intacte activitatea metabolică și viabilitatea celulelor microbiene, preparatele obținute putând fi utilizate pentru catalizarea unor reacții multisevențiale (tabelul nr.11).

Tabelul Nr. 11

Exemple de celule microbiene incluse în k-carageenan :

Specia	Enzima	Substrat	Produs
1	2	3	4
<i>Aspergillus oryzae</i>	Aminoacilaza	N-Acil-D,L-aminoacizi	L-Aminoacizi
<i>Aspergillus phoenicis</i>	11- β -Hidroxi-laza	Progesterona	11- β -Hidroxi-progesterona
<i>Brevibacterium flavium</i>	Fumarază	Fumarat	Acid L-Malic
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Sistem multienzimatic	Glucoză	L-Glutamat
<i>Escherichia coli</i>	Glutacionsintetaza + acetat-kinaza	Acid L- Glutamic + L-cisteină + glicerină + acetilfosfat	Glutacion

Tabelul nr. 11 (continuare)

1	2	3	4
Escherichia coli	Aspartază	Fumarat	Acid L-ăspartic
Zymomonas mobilis	Sistem multienzimatic	Glucoză	Etanol
Streptomyces griseus	Glucioizomeraza	Glucoză	Fructoză

Explicația bunei imobilizării a celulelor pe preparatele de k-carageenan constă (pe lângă includerea fizică propriu-zisă) și în formarea unor legături de tip donor-acceptor între metalul incorporat în gel și grupările nucleofile ($-\text{COOH}$ și $-\text{NH}_2$) de pe suprafața celulei.

Modul general de imobilizare a celulelor în k-carrageenan este următorul:

Se dizolvă k-carageenanul (1-2%) în ser fiziologic, la 37-50°C. Soluția obținută se amestecă cu celulele, după care se răcește amestecul celule/polimer și se amestecă cu o soluție apoasă conținând agenți de gelificare (0,1-0,3 M) ca: K^+ , NH_4^+ sau Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} sau baze organice (p-fenilendiamina, o alchilendiamină, hidrazide, hidroxamați). Se formează rapid un gel moale care se solidifică prin reticulare cu diizocianați, izotiocianați sau carbodiimidă (0,01-1 g/ml), la 30°C.

Gelului i se dau apoi forma și dimensiunile dorite (perle, cuburi, membrane).

Un mod de a proceda pentru a obține perle constă în dispersarea la cald a suspensiei apoase de k-carageenan/celule într-o

fază hidrofobă inertă, la fel ca în procedeul descris la agaroză, Perlele formate se vor trata ulterior cu cationi (K^+ , NH_4^+) pentru a le conferi stabilitate mecanică.

B. Gelificare ionotropă

Unii polimeri naturali încărcăți cu sarcini electrice pot forma geluri prin reticulare ionică, oferind condiții extrem de blânde pentru imobilizarea celulelor.

Suporturile pot fi polizaharide naturale.

a) Alginatul

Alginatul (extras din algele brune - Phaeophyta) este un copolimer liniar, natural, conținând resturi de acid β -D-manuronic legate 1-4 și resturi de acid α -L-guluronic și având câte o grupă $-COOH$ per unitate structurală de zahăr; el formează în prezența cationilor multivalenți (Ba^{2+} , Ca^{2+} sau Al^{3+}) în soluții apoase geluri insolubile, tridimensionale.

Particulele tridimensionale de gel sunt relativ inerte și pot include celulele fără a le afecta viabilitatea.

Pentru obținerea perlelor de gel cu celule incluse, se adaugă în picături o suspensie de celule/alginat de sodiu la o soluție de $CaCl_2$ (0,05-0,2 M) În fig.nr. 7 (volumul 1) am schițat structura coacervatului de alginat de calciu.

Proprietățile mecanice ale gelurilor de alginat depind de raportul dintre acizii guluronic și manuronic din lanțul polimer, de greutatea moleculară a gelului ca și de gradul de dispersie. Cele mai stabile geluri se obțin din varietăți de alginat cu conținut mare de resturi de acid guluronic. Un dezavantaj al acestor geluri este solubilizarea lor rapidă, în special în prezența unor agenți de chelatare pentru ionul Ca^{2+} (ioni de fosfat, citrat și EDTA). Pentru a menține particulele (perlele) intacte în

timp, este necesară includerea ionilor de Ca^{2+} (5-50 mM) în soluția substratului.

Stabilizarea perlelor de alginat se mai poate realiza prin tratarea lor cu o poliamină (polietilen- sau polipropilenimină) urmată de reticulare cu glutaraldehidă (Veliky și Williams, 1981; Birnbauer și colaboratorii, 1981).

În cazul suportului alginat, se observă că activitatea biochimică a celulelor de drojdie incluse în gel utilizate pentru producerea etanolului este foarte apropiată de cea a celulelor libere (neincluse). Perlele de aduct astfel obținute sunt stabile o mare perioadă de timp dacă sunt păstrate în tampon fosfat.

Firma Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (Tokio) a realizat un reactor-pilot pentru fabricarea etanolului cu celule de drojdie incluse în alginat. Reactorul are un volum total de 4000 l și o productivitate de 2.400 l/zi etanol pur. Procesul se pretează la automatizare și computerizare, productivitatea fiind de 20 de ori mai mare decât în cazul unui fermentor „batch”. Randamentul conversiei este de aproximativ 95%. Aceasta a fost prima operație pe scară mare cu celule vii incluse într-un suport.

O altă aplicație a gelurilor perlate de alginat este utilizarea lor pentru reacții catalizate de lipază în solvenți neapoși (esterificări și transesterificări).

S-a observat că utilizând lipaza inclusă în alginat de calciu pentru hidroliza trigliceridelor în sisteme apoase, are loc desprinderea enzimei de pe suport.

În schimb, lipaza din *Candida cylindracea* inclusă în alginat prezintă o activitate comparabilă cu cea a enzimei libere în solvenți neapoși (acetonă, eter, etanol, piridină, hexan).

S-a ajuns la concluzia că alginatul de calciu, în calitate de gel hidrofil, este un bun suport numai pentru substratele

relativ hidrofile.

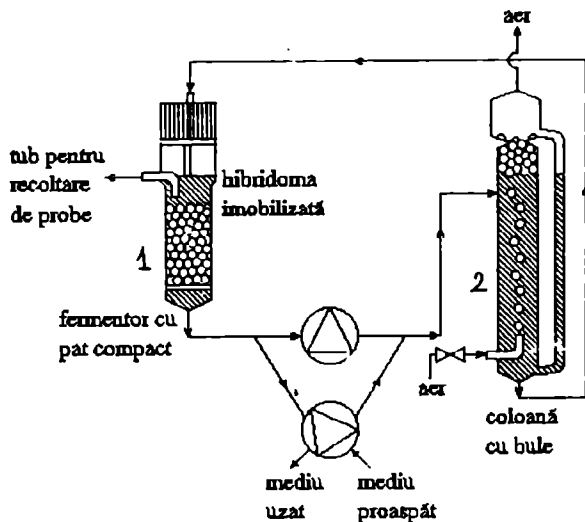
Un avantaj al gelului de alginat este și posibilitatea de a fi utilizat pentru imobilizarea celulelor animale, deosebit de sensibile la acțiunea unor compuși toxici ca și la variații de temperatură, pH, tărnie ionică etc.

Pe lângă agaroză, se recomandă pentru imobilizarea unor asemenea celule și geluri de alginat, preparate efectuate cu ușurință și fără efect de inhibare asupra culturilor de celule. Metoda servește la obținerea pe scară mare a anticorpilor monoclonali și a eritropoietinei. Un dezavantaj al metodei constă în faptul că ioni fosfat (componenti esențiali ai culturilor de celule) pot extrage cationii bivalenți din geluri (Ca^{2+}), micșorând considerabil duritatea acestora. Acest efect poate fi înlăturat folosind microcapsule de alginat acoperite cu polilisină sau cu o peliculă de polimer uretanic. De asemenea, folosind alginați de Sr și Ba (mai rezistenți decât cel de Ca la acțiunea ionilor fosfat) se poate corecta neajunsul amintit.

De exemplu, pentru a include celule de hibridoma 4411 (șoarece - om) pentru producerea anticorpului monoclonal IgA, se utilizează un gel de alginat de stronțiu. Pentru aceasta un amestec de celule vii și alginat 2% se picură cu ajutorul unei seringi, într-o soluție de SrCl_2 0,1 M. În funcție de dimensiunea acului seringii se obțin particule de diverse mărimi; se folosesc în special cele cu diametrul de 2 mm. Celulele astfel incluse se lasă să stea aproximativ 20 minute în soluția de SrCl_2 (până la solidificare), apoi se decantează și se spală. Instalația folosită este schematizată în fig. nr.5.

Fig nr. 5

Schema unui fermentor cu pat compact pentru producerea anticorpului monoclonal IgA



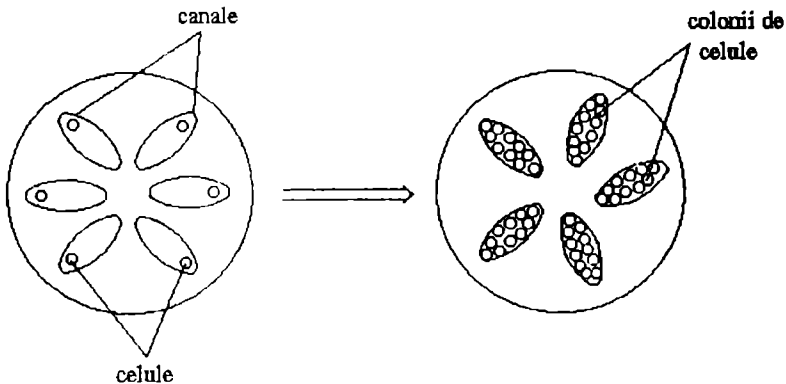
Particulele de gel conținând hibridoma se introduc într-un fermentor cu pat compact (1). Ele sunt oxigenate continuu cu un amestec de aer + CO₂ (95% + 5%) sterilizat printr-un filtru cu membrană și trecut apoi printr-o coloană cu bule (2) legată cu fermentorul.

Mediul de cultură din fermentorul (1) conține gluco-1-fosfat și ioni de Sr²⁺. Celulele imobilizate din reactor se mențin la 37°C, în contact continuu cu mediul oxigenat. Oxigenarea permanentă face ca productivitatea celulelor imobilizate să fie mai mare decât în cazul culturilor statice.

Formarea colonilor de celule în porii particulelor de gel poate fi schematizată astfel ca în fig. nr. 6.

Fig. nr. 6

Colonizarea particulelor de gel-suport



Utilizând aceeași tehnică a picăturilor se pot microencapsula în alginat și celule de pancreas sau de ficat. Pe lângă rolul de protecție oferit celulelor, microencapsularea evită respingerea lor imunologică. În acest fel se pot implanta celule hepatice de la o specie la alta.

În gelurile de alginat se mai pot microencapsula și microorganisme care servesc la îndepărtarea colesterolului din serul sanguin. Astfel, celule de *Pseudomonas pictorum* se pot folosi pentru prevenirea aterosclerozei.

Pentru aceasta, o soluție de 2% alginat de sodiu și 2% agar se agită timp de 15 minute și se încălzește la 45-50°C. *Pseudomonas pictorum* se suspendă în NaCl 0,9% și se adaugă în picături la soluția caldă de agar-alginat, sub agitare. Amestecul obținut se extrudează într-o soluție de CaCl₂ 2% răcită la 4°C, cu ajutorul unei seringi. Se obțin microcapsule (perle) cu diametrul de 2 mm. După 15 minute se îndepărtează supernatantul și se înlocuiește cu o soluție de citrat de sodiu 2% (pentru îndepărtarea alginatului și pentru a se deschide porii agarului).

Materialul obținut astfel își păstrează activitatea biochimică timp de 9 luni.

O metodă de prevenire a hepatitei B propusă în China este folosirea suprafeței antigenului hepatitei B (HBsAg) ca vaccin. O tehnică de inginerie genetică utilizată în această țară pentru producerea de HBsAg folosește celule mamare cu DNA recombinant.

Imobilizarea acestor celule trebuie să le stabilizeze și să nu împiedice proliferarea lor. Celulele mamare sunt foarte fragile necesitând tehnici de imobilizare care să le protejeze de acțiunea variațiilor mari de pH, salinitate etc. Cele mai bune rezultate le dă microencapsularea într-un sistem bazic de poli-L-lisină/alginat. Celulele cu DNA recombinant precultivate se colectează și se dispersează în alginat de sodiu (10^6 celule/ml soluție). Se formează microcapsule sferice cu diametrul de 200-500 μ m. Spre deosebire de culturile convenționale, celulele incluse produc și mențin HBsAg în interiorul capsulelor. Acumularea de celule crește în microcapsule timp de 60 de zile. Membrana semipermeabilă de poli-lisină-alginat a microcapsulelor permite difuzia adecvată la suportul ce conține celulele și reținerea simultană a HBsAg, excluzând alte molecule voluminoase din mediul de reacție.

Gelul de alginat poate fi folosit și la co-imobilizări de tip celule-enzime.

În acest fel se pot include în alginatul de calciu celule de drojdie, împreună cu β -galactozidaza. Agregatul obținut oferă un spectru mai larg de utilizare (producere de etanol dar și scindarea lactozei).

Ca mod de lucru, pentru imobilizarea drojdiei, o soluție apoasă de alginat de sodiu se amestecă până la omogenizare cu drojdie de brutărie, iar amestecul se picură (prin acul unei seringi) într-o soluție apoasă de CaCl_2 .

Amestecul se lasă în repaos 1 oră pentru întărirea gelului de alginat de calciu cu celulele de drojdie incluse. Imobilizarea este cantitativă.

Pentru co-imobilizare, se folosește β -galactozidaza reticulată în prealabil cu glutaraldehida și amestecată apoi cu o soluție apoasă de alginat de sodiu și ou drojdie, până la omogenizare. Amestecul se picură (prin injecțare) în soluția apoasă de CaCl_2 .

Preparatul cu drojdie inclusă în alginat are o productivitate (măsurată în volumul de CO_2 rezultat prin fermentația alcoolică) foarte apropiată de cea a drojdiei neimobilizate.

În ceea ce privește aductul obținut prin co-imobilizare cu β -galactozidaza, productivitatea lui crește la început și apoi scade odată cu acumularea de β -galactoză.

b) Chitosanul

Chitosanul (obținut din chitină după dezacilare) este un polizaharid care conține resturi de 2-amino-2-dezoxi-D-glucoză (cu grupări $-\text{NH}_2$ libere).

Modul de gelificare ionotropă a chitosanului se aseamănă cu cel utilizat la alginat. Ioni necesari formării gelului se aleg în funcție de compatibilitatea lor cu celulele ce urmează a fi imobilizate. Pentru gelificare (reticulare) se folosesc mai ales ferrocianura, ferrocianura, polifosfații, acizi poli-aldehido-carboxilici și poli(1-hidroxi-1-sulfonat-propena-2).

Particule sferice de gel (perle) de chitosan se pot obține în două moduri:

- O soluție de acetat de chitosan conținând celule în suspensie se picură într-o soluție de agent de reticulare, la $\text{pH} \sim 6$. Se formează un gel ionotrop; la acest pH slab acid, o mare parte din grupările $-\text{NH}_2$ din molecula chitosanului se protonează,

favorizând reticularea ionică.

- Intr-un alt procedeu, perlele de chitosan se pot forma în soluția agentului de reticulare și la pH = 7,5, dar pentru a preveni solubilizarea chitosanului este necesară (pe lângă ionii metalici) și prezența unui agent de reticulare bifuncțional (glutaraldehida).

Chitosanul oferă o variantă posibilă de imobilizare, doar un număr mic de celule putând fi incluse în acest gel.

Rezultate bune și o bună activitate reziduală se observă la includerea de *Escherichia coli* (conținând triptofansintetază) și *Pleurotus ostreatus* (conținând penicilinază) în chitosan.

Metoda este greu de standardizat, activitatea biocatalitică a agregatelor suport-celule obținute peaceastă cale depinzând nu numai de natura celulelor, dar și de cea a chitosanului (cu grade diferite de dezacetilare a chitinei).

C. Precipitarea

Tehnica precipitării printr-un mecanism de schimbare a solvențului este o variantă a includerii celulelor în geluri.

Se cunoaște astfel metoda transferului unei suspensii de polimer/celule dintr-o fază organică în faza apoasă, dar acest procedeu nu se poate aplica decât pentru imobilizarea celulelor utilizate în reacții simple, în care solvenții organici să nu afecteze celulele, activitatea reziduală a aductului suport-celule fiind mult micșorată.

Astfel, în 1975, Hackel și colaboratorii au utilizat polistiren dizolvat în tetrahidrofuran pentru a imobiliza *Candida tropicalis*.

Activitatea biocatalitică în reacția de oxidare a fenolului se reduce la 23% în comparație cu cea a suspensiei de celule

neimobilizate.

În 1979, Linko și colaboratorii propun o metodă de includere a celulelor microbiene în perle de celuloză. Celuloza a fost dizolvată într-un amestec de colorură de N-etilpiridiniu și DMF la 90°C. După răcire la 30°C se adaugă celulele microbiene, iar amestecul obținut se extrudează în apă. Activitatea reziduală monoenzimatică a microorganismelor variază între 22-85%. Prin această metodă s-au inclus în geluri de celuloză: *Saccharomyces cerevisiae* (invertază), *Actinoplanes missouriensis* (glucoizomerază), *Bacillus coagulans* (glucoizomerază), *Streptomyces fragilis* și *Kluyveromyces lactis* (β -galactozidază), *Serratia* sp. (urează)

Se poate folosi și gelul de triacetat de celuloză pentru includerea celulelor microbiene. Astfel, *Sarcina ureae* s-a imobilizat în fibre de triacetat de celuloză, studiindu-se acțiunea catalitică a agregatului asupra hidrolizei ureei.

Pentru aceasta, o suspensie apoasă de celule s-a adăugat la o soluție de triacetat de celuloză în CH_2Cl_2 (10%). Emulsia obținută se extrudează printr-o filieră în toluen. Activitatea remanentă maximă a aductului suport-celule este de 45%.

În gelul de triacetat de celuloză se mai pot include și drojdiile ce conțin β -galactozidaza, preparatele obținute fiind folosite la fabricarea laptelui dietetic, destinat persoanelor care prezintă intoleranță la lactoza din lapte.

Ca mod de lucru, în soluția triacetatului de celuloză într-un solvent nemiscibil cu apa (de exemplu, CH_2Cl_2) se emulsionează suspensia apoasă de drojdie. După o ședere de 20-30 minute, în care timp se întărește, emulsia obținută se trece printr-o filieră fină. Se obțin astfel „Hollow-fibers” în care celulele de drojdie rămân fixate pe suprafața interioară, semipermeabilă, poroasă a fibrelor. Fasciculele de fibre astfel obținute se folosesc

în reactoare (dispozitive) verticale.

Culturile de celule imobilizate pe acetați pot fi folosite în procese fermentative aerobice, în care de obicei apar mari dificultăți.

Cercetătorii chinezi au propus o aplicație cu bune rezultate a celulelor imobilizate în bioreacții aerobice fermentative.

Astfel utilizând un gel complex de acetat de celuloză și Eucheuma pentru imobilizarea unei culturi de celule de *Corynebacterium glutamicus* T6-13, se poate obține acid glutamic într-un proces continuu. Metoda implică trei etape succesive:

- Prepararea suportului

Un gel de Eucheuma 2,5% se amestecă cu o soluție de KCl 2% până la formarea unei pulberi. Pulberea se dispersează apoi într-o soluție de diacetat de celuloză în acetonă 10% și se omogenizează prin agitare. Dispersând gelul obținut în apă se formează particule de suport cu dimensiuni de aproximativ 5 mm.

- Prepararea celulelor imobilizate și proliferarea lor

După sterilizarea suportului și a mediului de cultură, se adaugă acid glutamic la *Corynebacterium glutamicus* T6-13. Celulele vor prolifera la 37°C și pH = 7, timp de 48 ore, în condiții aerobice. După trecerea perioadei de proliferare se vor obține celule viabile imobilizate, cu o bună activitate biocatalitică,

- Fermentația

Mediul de proliferare conține: 12% glucoză, 0,06% carbamidă, 0,06% MgSO₄, 0,17% Na₂HPO₄, 0,05% KCl, 0,1-0,3% melasă, Fe²⁺ și 2 ppm Mn²⁺. Fermentația are loc la 37°C, la pH = 7, timp de 36 ore în condiții aerobe.

Corynebacterium glutamicus T6-13 conținând resturi de biotină, aceasta menține controlul atât al procesului metabolic cât și al permeabilității membranei celulare, asigurând conversia

glucozei sau a glutamatului. La $\text{pH} = 7$, activitatea celulelor imobilizate este practic identică cu cea a celulelor libere. Concentrația optimă a substratului (glucoza) în mediul de fermentație este de 30 g/l. Perioada de fermentație este de 36 ore, aductul suport-celule putând fi utilizat pentru 10 cicluri fermentative, succesive. În plus, datorită structurii fine a suportului, celulele imobilizate vor avea o densitate mare și o stabilitate termică mai ridicată decât celulele libere.

I.5.2. Tehnici de imobilizare chimică a celulelor

În general, celulele se pot imobiliza și prin formare de legături covalente, ireversibile, de tip celulă-suport.

Comparativ cu tehnicile de imobilizare fizică, care decurg în condiții blânde și în care legăturile celule-suport sunt de natură fizică, reversibile, metodele chimice de imobilizare decurg în condiții mai drastice, ceea ce poate influența puternic viabilitatea și activitatea enzimatică reziduală a celulelor. De aceea tehnicile chimice de imobilizare sunt incomparabil mai puțin utilizate decât cele fizice.

Dintre metodele chimice se folosesc în cazul celulelor: rețicularea, copolimerizarea și legarea covalentă pe suporturi activate.

I.5.2.1. Reticularea

Deoarece membrana celulelor microbiene conține grupări libere $-\text{COOH}$ și $-\text{NH}_2$, acestea pot fi supuse rețiculării prin tratare cu agenți di- sau multifuncționali ca: glutaraldehida și toluendiisocianatul.

Celulele microbiene mai pot fi immobilizate și printr-o rețiculare ionică, printr-un mecanism de flooulare în prezența polielectroliților.

De exemplu, în 1982, Kokufuta și colaboratorii au immobilizat celule de *Nitrosomonas europaea* amestecându-le cu un exces de iodură de trimetilamoniu-glicol-ohitosan; după amestecare au adăugat polivinilalcool-sulfat de potasiu. Celulele se includ cu formarea unui immobilizat polionic complex.

Reticularea nu are aplicații generale în immobilizarea celulelor, iar acolo unde se aplică ea este utilizată în combinație cu tehnicile de includere fizică, ca o metodă suplimentară de „fixare” a celulelor, concomitent cu stabilizarea gelului. În majoritatea cazurilor reticularea este urmată de moartea celulelor. Metoda se recomandă pentru celule neviabile (uscate).

1.5.2.2. Copolimerizarea

Metoda copolimerizării poate fi considerată ca o extensie a rețiculării, în care se folosește ca „spacer” inert un polimer natural sau sintetic (gelatină, albumină sau polietilenimină), care se amestecă cu celulele înainte de adăugarea glutaraldehidei. Procedul se utilizează în majoritatea cazurilor pentru celule moarte.

1.5.2.3. Legarea covalentă

Principiul metodei este același care explică și immobilizarea enzimelor pure: legarea unui biocatalizator pe un suport prin intermediul unor reacții între grupări funcționale activate sau cu ajutorul unui agent care reacționează concomitent cu suportul

și cu biocatalizatorul.

Un exemplu tipic folosește celuloza activată cu BrCN sau gelatina, împreună cu glutaraldehida. Variind agenții de cuplare (aminosilan, diisocianat, carbodiimidă, glutaraldehida etc.) se pot introduce grupări reactive specifice pe suprafața suportului, care reacționează ulterior cu grupările reactive de pe suprafața celulelor. Din păcate, majoritatea agenților de cuplare sunt toxici pentru celule.

Un avantaj al imobilizării chimice a celulelor pe un suport prin legături covalente ireversibile este obținerea unui aduct necondiționat de limite difuzionale (ca în cazul includerii) și de pe care celulele nu se pot desprinde atât de ușor ca în cazul adsorbției. Câteva exemple de celule imobilizate prin legare covalentă sunt date în tabelul nr. 12.

Tabelul nr. 12

Exemple de celule microbiene legate covalent pe diferite suporturi

Specia de celule	Suportul	Agent de cuplare	Produs de reacție
1	2	3	4
Acetobacter sp.	Hidrazizi metalici	-	Acid acetic
Aspergillus niger	Glicidilmetaacrilat	Glutaraldehidă	Acid gluconic
Micrococcus luteus	CM-celulază	Carbodiimidă	Acid urocanic

Tabelul nr. 12 (continuar...)

1	2	3	4
Saccharomyces Carlsbergensis	Aminopropil- -silice	Glutaraldehidă	Etanol
Saccharomyces cerevisiae	Hidroxi-alchil- metacrilat	1,6-Diamino- hexan + glutar- aldehidă	Toxina Killer
Saccharomyces cerevisiae	Celuloză	Clorură de cânănil	Etanol
Zygosaccha- romyoes lactis	Hidroxi-alchil- metacrilat	1,6-Diamino- hexan + glutar- aldehidă	β -Galaotozidază

Utilizând carbodiimidă s-au format legături covalente între suprafețele celulelor și perle de agaroză activată cu hidrazida acidului adipic. În acest fel s-au imobilizat celule de: *Escherichia coli* B/R, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Bacillus subtilis*. Dar activarea grupărilor -COOH de pe suprafața celulelor cu carbodiimidă a micșorat viabilitatea acestora ca și activitatea lor enzimatică. O variantă a metodei (Jack și Zajic, 1977) constă în activarea inițială a grupărilor carboxil de pe suprafața agarozei cu carbodiimidă și apoi legarea celulelor, dar metoda are drept rezultat moartea celulelor.

În 1975, Shimizu și colaboratorii au fixat covalent *Brevibacterium ammoniagenes*/FO 12071 pe un copolimer de etilenă-anhidridă maleică, dar activitatea coenzimei A din celule a scăzut.

Primele imobilizări covalente ale celulelor pe celuloză au fost făcute de Jack și Zajic în 1977; ei au fixat covalent celule

de *Micrococcus luteus* ATCC 9341 pe CMC, prin activare cu carbodii-
midă.

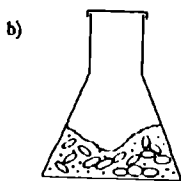
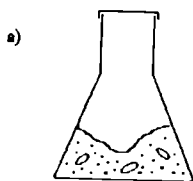
I.5.3. Autoimobilizarea celulelor

Autoimobilizarea celulelor vegetale (datorită tendinței lor de a forma agregate) este o metodă folosită la culturile de *Coffea arabica* și *Nicotina tabacum*.

Procesul autoagregării poate fi optimizat prin agitare, după schema din fig nr.7.

Fig. nr. 7

Formarea unor agregate prin autoimobilizarea celulelor



Cultură standard: suspensie fină,
agregare slabă (agregate mici)

Agitare blândă (magnetică)
la temperatura camerei și
la întuneric

Cultură cu agregate mari

Se obțin agregate stabile, care se sortează după mărimea particulelor. Particulele cu diametrul de câțiva cm având o viteză mare de sedimentare, se folosesc în reactoare cu pat fluidizat. Aerarea culturii se face separat, într-un vas care precede reactorul.

Celulele bacteriene (de dimensiuni mici) se folosesc sub formă de membrană introdusă între două straturi semipermeabile, (membrane de dializă) circulația soluției de substrat făcându-se rectiliniu, prin ultrafiltrare. În acest fel se pot folosi celulele de *Streptococcus faecalis* pentru construcția unui reactor cu membrană utilizat în obținerea continuă a acidului L-lactic.

I.6. Activitatea celulelor imobilizate

În majoritatea cazurilor activitatea biocatalitică a celulelor imobilizate este mai mică decât a celulelor libere, caracterul heterogen al biocatalizatorului fiind în mare măsură responsabil de această diminuare.

I.6.1. Fenomene de transport de masă

În cazul celulelor imobilizate intervin două tipuri de transport de masă (substrat, produs, nutrient):

- transportul de masă extern (interparticule) care este guvernat de tipul de reactor (tanc cu agitare, pat fluidizat, pat compact) și de hidrodinamica lichidelor și

- transportul de masă intern (intraparticule) care este guvernat de cinetica biocatalizatorului, densitatea încălzirii suportului cu celule și de proprietățile fizico-chimice ale suportului.

Pentru o încălzire mare cu celule a suprafeței suportului, numai o porțiune din situsul activ total este utilizată, ceea ce duce la scăderea activității biocatalitice.

I.6.2. Stabilitatea catalitică

Prin imobilizare se observă o creștere a stabilității operaționale și la stocare a celulelor.

Cel mai important factor care determină această stabilitate crescută este efectul de protejare pe care-l are imobilizarea celulelor față de condițiile externe; concomitent se creează un micromediu favorabil în apropierea celulelor. Stabilitatea celulelor imobilizate se apreciază, oa și în cazul enzimelor fixate pe suport, prin timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$), raportat la activitatea efectivă inițială a preparatului.

Deoarece descreșterea activității nu este totdeauna liniară, nu se recomandă extrapolarea pe timp scurt a lui $t_{1/2}$.

Imobilizarea celulelor viabile permite reactivarea biocatalizatorului dacă inactivarea sa atinge un nivel inacceptabil.

În tabelul nr. 13 se dau câteva exemple de celule imobilizate activate „in situ”. În general, pentru reactivare se incubează aductul un anumit timp în mediul nutritiv specific celulelor respective.

Tabelul Nr. 13

Exemple de sisteme de celule imobilizate, activate „in situ”

Specia	Suport	Reacție/ Aplicație	Timp de incubare	Creșterea activității (număr de ori)
1	2	3	4	5
Arthrobacter globiformus	Poliacril- amidă (PAA)	Conversia hidrocortizonului	24 h	5,7

Tabelul nr. 13 (continuare)

1	2	3	4	5
Arthrobacter simplex	Poliacrilamidă	Cortisonă → Prednisolonă	3x48 h	6,5
Arthrobacter simplex	Alginat	Cortisonă → Prednisolonă	3x24 h	20
Azotobacter chroococcum	Agar	Fixarea azotului	4 zile	2
Bacillus subtilis	Poliacrilamidă	Obținere de α -amilază	7x5 h	8,5
Candida tropicalis	Polimetilacrilamidă	Degradarea fenolului	13 n	14
Escherichia coli	Poliacrilamidă	Degradarea β -lactamei	peste noapte	2
Penicillium chrysogenum	Poliacrilamidă	Obținere de penicilină G	3x5 h	1,75
Pseudomonas denitrificans	Alginat	Denitrificarea apei	3x20 h	revine la activitatea inițială
Pseudomonas putida	Poliacrilamidă	Degradarea benzenului	peste noapte	3

II. APLICATII ALE BIOCATALIZATORILOR IMOBILIZATI IN BIOTEHNOLOGIE

Aduocții obținuti prin fixarea celulelor pe suporturi se pot folosi pentru o scară largă de aplicații biotehnologice ca: producerea vaccinurilor antivirale, obținerea interferonului, a hibridomilor și anticorpilor monoclonali etc., toate aceste aplicații fiind caracteristice celulelor animale și umane. Celulele vegetale imobilizate se pot folosi în: reacții de biosinteză și biotransformări, pentru conversia energiei solare, pentru biofotoliza apei, pentru purificarea apelor reziduale, pentru bioelectrocataliză ca și pentru obținerea microdispozitivelor biologice. (biotransductoare, dispozitive de interconversie a diferitelor forme de energie, biosensori etc.).

Dispozitivele cu celule imobilizate sunt mult mai ieftine și mai economice în raport cu cele construite pe baza enzimelor pure.

Din cele relatate în capitolele anterioare se poate trage concluzia că nu toate metodele de imobilizare folosite pentru enzimele pure pot da rezultate mulțumitoare în cazul culturilor de celule viabile. Metodele aplicate în acest din urmă caz trebuie să asigure o continuare a proliferării celulelor. Apar deci, atât în modul de lucru cu culturile de celule, cât și în construcția reactoarelor și a instalațiilor ce utilizează celule imobilizate, modificări substanțiale.

II.1. Surse de celule

II.1.1. Țesuturile umane și animale

Aceste țesuturi se dezvoltă cu dificultate în afara organismelor, iar de menținerea lor în viață depinde în primul rând

capacitatea lor biocatalitică. Se pot cultiva celule animale și umane pornind de la fragmente de organe, embrioni, explante tisulare fragmentate sau nu și celule rezultate din țesuturi proaspete, prin digestie enzimatică. Această din urmă metodă permite obținerea de culturi viabile și cu o bună proliferare „in vitro”.

Pe scară largă, mergând până la necesități de aplicare industrială, culturile de celule repicabile sunt cele mai indicate, având un timp de cultivare nelimitat și fiind lipsite de virusuri și de microorganismele care afectează frecvent culturile primare. Un dezavantaj al culturilor de celule repicabile este modificarea lor în timp, inclusiv apariția potențialului oncogen. Celulele se pot cultiva în două moduri: în suspensie și pe suporturi. Cea de a doua modalitate de cultivare ne interesează în mod deosebit. Creșterea celulelor se poate face pe suporturi organice sau anorganice, prin imobilizare pur fizică dar și chimică (mai rar), agregatul obținut putând avea diverse forme: perle (sfere), tuburi, hollow-fibers, spirale, inele, plăci, membrane etc. Pentru a se asigura viabilitatea și proliferarea celulelor, se perfuzează continuu în mediu lichidul de cultură.

Problema principală este deci asigurarea condițiilor optime de cultivare a celulelor pe suportul respectiv, în afara organismului.

Pentru alegerea suportului optim se fac testări prealabile cu diverse materiale și metode de imobilizare, studiindu-se cinetica creșterii celulelor pe aceste suporturi.

II.1.2. Celulele vegetale

Culturile acestui tip de celule au intrat relativ recent în practicile biotehnologice, dar a treia parte din produsele farmaceutice se obțin azi cu ajutorul lor.

Ca și celulele animale, ele pot fi cultivate în suspensie sau pe suporturi.

Pentru o bună proliferare mediul trebuie să conțină substanțe nutritive și factori de creștere, asigurându-se în același timp lumina, umiditatea, temperatura și condițiile sterile necesare.

Culturile de celule vegetale imobilizate se folosesc mai ales pentru obținerea metaboliților (peste 50 de grupe de metaboliți secundari), dar și pentru biosinteza sau semisinteza unor substanțe chimice.

Față de culturile de celule vegetale în stare liberă, la care apare agregarea, diferențierea și modificarea activității celulelor, cele imobilizate pe suport nu prezintă aceste dezavantaje. În cazul celulelor vegetale imobilizate se evidențiază o serie de avantaje ca:

- rezistență mecanică și operațională crescută;
- faza de creștere coincide cu formarea metaboliților;
- celulele imobilizate pot fi plasate cu ușurință într-un mediu nutritiv proaspăt sau într-un mediu de reacție.

În general dispozitivele tehnologice cu celule vegetale imobilizate se folosesc pentru obținerea unor cantități mici de produse scumpe.

Aplicarea pe scară industrială a dispozitivelor cu celule vegetale imobilizate este legată de necesitatea înlăturării unor neajunsuri de ordin biochimic și genetic, apărute la manipularea unor cantități mari de asemenea celule, ca și de menținerea sub control a randamentelor proceselor.

II.2. Utilizarea reacțiilor enzimatiche în biotehnologie

Pe plan mondial, creșterea prețului energiei obținută din

surse convenționale, ca și necesitatea asigurării protecției mediului înconjurător și a scăderii continue a prețului de cost a produselor duc la înlocuirea rapidă a procedeelelor chimice clasice ou cele biocatalitice, mai ales în industriile de obținere și prelucrare a compușilor biologic activi (alimente, medicamente, cosmetice etc.).

Avantajele incontestabile ale biotehnologiilor bazate pe enzime imobilizate sunt legate de următoarele considerente:

- specificitatea înaltă (de substrat și de reacție) a enzimelor;
- posibilitatea de a se lucra în condiții blânde, cu parametri ușor accesibili (temperaturi de 0-110°C, pH de 2-14 etc.);
- obținerea unor produși de înaltă puritate și a unor cantități mici de subproduși;
- simplificarea procesului de purificare a produșilor de reacție;
- nu sunt necesare materiale speciale pentru confecționare de vase rezistente la coroziune;
- posibilitatea de imobilizare nu numai a enzimelor pure, dar și a celulelor (vii sau moarte), a organitelor și extractelor celulare, ceea ce duce la scăderea prețului de cost al produselor;
- posibilitatea utilizării de preparate cu enzime multisevențiale coimobilizate și cu coenzime coimobilizate;
- posibilitatea utilizării enzimelor (libere sau imobilizate) în medii apoase sau în solvenți organici;
- optimizarea și controlarea proceselor;
- posibilitatea automatizării.

Aplicațiile de importanță industrială a biotehnologiilor sunt în linii mari:

- producția de alimente (sucuri, bere, vin, brânză, dulciuri)

- producția și modificarea aminoacizilor existenți în lanțurile proteice;
- producția și purificarea materialelor;
- producția de medicamente (peniciline, steroidi, insuline etc.) și cosmetice (creme, șampoane etc.);
- decontaminarea apei, solului și aerului.

În cazul enzimelor a căror izolare și purificare necesită un preț de cost ridicat, se lucrează cu celule sau extracte celulare imobilizate. Majoritatea enzimelor utilizate în bioreactoare sunt de origine microbiană.

Există tendința de a se înlocui enzimele izolate tradițional din țesuturile animale (tripsina, chimotripsina, pepsina, venina) sau din plante (păpaina, bromelaina, ficina) cu enzime din microorganisme, o exploatare fiind legată de creșterea cererii de produse din carne și vegetale.

Pe de altă parte, cu ajutorul microorganismelor se poate asigura o producție constantă de enzime. Astfel, cheagul utilizat în industria brânzeturilor se izolează din *Mucor mietrei* și *Mucor pusillus*, înlocuind produsul similar izolat din stomacul de vițel.

Un alt factor în sprijinul utilizării enzimelor de origine microbiană este posibilitatea manipulării genetice a microorganismelor, care poate duce la producții mari de biocatalizatori. Ingineria genetică poate combina metodele de inducere a mutațiilor și de modificare a mediului de cultură cu metodele tradiționale.

Cu cât se simplifică producerea, izolarea și purificarea enzimelor, cu atât se reduce capitalul investit în procesele fermentative.

Pentru obținerea unor enzime termostabile, se pot utiliza microorganisme termofile.

Acestate se pot plasa în reactoarele enzimatică care lucrează

la temperaturi ridicate, ceea ce prezintă o serie de avantaje ca: creșterea vitezei de reacție, diminuarea vâscozității fluidelor introduse în reactor, creșterea solubilității reactantului și produsului de reacție, reducerea risoului contaminării microbiene etc.

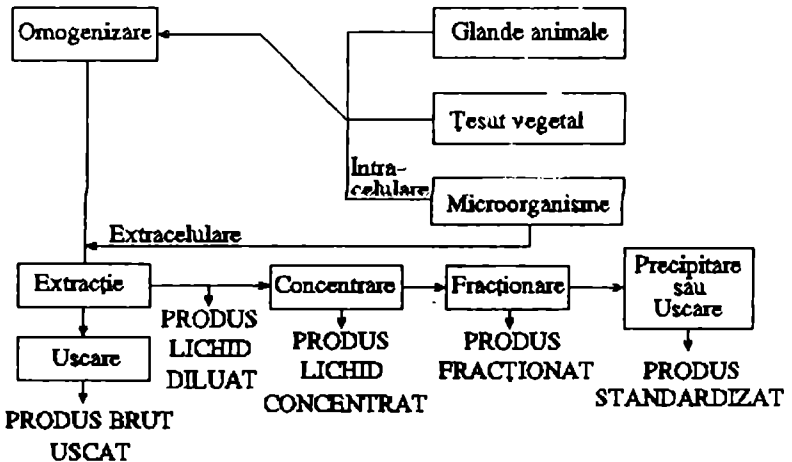
S-au pus la punct o mare varietate de metode de izolare și purificare a enzimelor.

II.2.1. Surse de biocatalizatori

Se pot folosi ca surse pentru izolarea enzimelor: microorganisme, țesuturi vegetale, glande animale. În fig.nr. 8 este schematizat fluxul tehnologic general al extracției și purificării biocatalizatorilor.

Fig. nr. 8

„Schema fluxului tehnologic general al extracției și purificării biocatalizatorilor



Purificarea, care are loc în etapa de fracționare se poate face prin: cromatografie (cu schimbători de ioni și/sau gel-filtrare), electroforeză și precipitare fracționată.

Pentru imobilizare, nu este neapărat necesar ca enzimele să aibă un grad înalt de puritate, putându-se folosi și preparate brute, sau celule microbiene. Gradul de puritate necesar este guvernat de factori ca: reacții secundare posibile, stabilitatea enzimei, costul operației etc.

II.2.2. Utilizarea preparatelor imobilizate în bioreactoare

II.2.2.1. Enzime imobilizate

Cele mai utilizate metode de imobilizare pentru scopuri biotehnologice sunt: adsorbția, includerea sau încapsularea, legarea covalentă și reticularea. În tabelul nr. 21 (pag. 202, vol. 1) se pot compara diferite metode de imobilizare, cu avantajele și dezavantajele lor, cu mențiunea că în cazul includerii și încapsulării activitatea enzimei este redusă datorită barierelor difuzionale, iar în cazul legării covalente pe sticlă poroasă, suportul poate fi regenerat.

Nici o tehnică de imobilizare nu are aplicabilitate generală, datorită marilor deosebiri dintre enzime, atât din punctul de vedere al compoziției lor cât și din cel al stabilității și specificității biocatalizatorilor.

Alegerea tehnicii de imobilizare este influențată și de proprietățile substratului și produsului de reacție.

Proprietățile unui sistem enzimatic imobilizat pot fi diferite de cele ale enzimelor native, libere (solubile), atât datori-

tă alterării moleculei enzimei cât și naturii fizice și chimice a suportului. Modificări ale proprietăților biocatalitice sunt aduse și de transformarea catalizei omogene într-o cataliză heterogenă. În vol. I (pag. 203-208, 239-243), am analizat proprietățile enzimelor imobilizate. Dintre acestea, pentru scopuri industriale este deosebit de importantă stabilitatea aducătorilor. Majoritatea enzimelor prezintă după imobilizare o stabilitate crescută față de temperatură, pH, atac microbian etc.

Un parametru tehnic deosebit de relevant este stabilitatea operațională, ale cărei valori ridicate duc la descreșterea prețului de cost al procesului, eliminând operațiile repetate de încărcare a reactorului. Stabilitatea operațională se exprimă prin timpul de înjumătățire (timpul după care activitatea inițială a enzimei se reduce la 50%).

Acuratețea determinărilor de activitate operațională crește prin introducerea în ecuația vitezei de reacție a unei constante de dezactivare.

Producția totală a unui reactor (P_t) într-o perioadă de timp (t_p) poate fi exprimată cu ajutorul vitezei de alimentare F prin ecuația (1), sau în cele mai multe cazuri, prin ecuația (2):

$$P_t = \int_0^{t_p} P F dt \quad (1)$$

$$P_t = \int_0^{t_p} F_i \exp \left[-(\ln 2)t/t_{1/2} \right] dt \quad (2) \text{ în care:}$$

F_i = viteza inițială de alimentare și

$t_{1/2}$ = perioada de înjumătățire

Prin integrare se obține expresia (3):

$$P_t = \frac{P_1 \cdot t_{1/2}}{\ln 2} \left\{ 1 - \exp \left[-(\ln 2) t_p / t_{1/2} \right] \right\} \quad (3)$$

Luorând la o conversie constantă, are loc o descreștere a vitezei de formare a produsului, pentru a se menține conversia în timp ce activitatea enzimei scade. Această modificare a vitezei de producție în cursul utilizării enzimei imobilizate este inacceptabilă pentru un proces comercial. Cea mai frecventă soluție a problemei este utilizarea unui sistem multiplu (o baterie) de reactoare, care pot opera în serie sau în paralel. Numărul de reactoare necesar pentru a menține viteza producției cu o toleranță acceptabilă este funcție de perioada de înjumătățire pentru fiecare reactor în parte, înainte de a se înlocui enzima imobilizată:

$$R_p = e^{-\frac{H \ln 2}{N}} \quad (4) \text{ în care:}$$

N = numărul de reactoare;

H = numărul de perioade de înjumătățire și

R_p = raportul dintre valorile maximă și minimă ale vitezei de producție.

Altă strategie (folosită în cazul reactoarelor coloană) constă în compensarea scăderii activității enzimaticice prin creșterea temperaturii de lucru, astfel încât să se mențină echilibrul dintre viteza conversiei și viteza inițială de producție.

Un alt factor care condiționează utilizarea în bioreactoare a enzimelor imobilizate, este stabilitatea la stocare, importantă mai ales în cazul în care preparatul enzimatic este folosit cu

intermitență.

În cazul unei stabilități ridicate la stocare, se poate reduce costul operației preparând cantități mai mari de aduct suport-enzimă.

În volumul I (pag. 228-232) am discutat problema modificării celor doi parametri esențiali pentru cinetica reacției cu enzime imobilizate (k_M și V_{max}), care capătă după imobilizare valori aparente în comparație cu cei ai enzimelor native, modificările fiind determinate de efectele sterice, difuzionale și de microvecinătate. Limitările de ordin steric se pot pune în evidență mai ales când enzima imobilizată catalizează o reacție a unui substrat cu masă moleculară înaltă. S-a observat astfel că dacă același substrat proteic se hidrolizează cu aceeași protează nativă sau imobilizată, se obțin hidrolizate peptidice diferite. De asemenea, α -amilaza solubilă și imobilizată conduc la produși de hidroliză diferiți ai amilozei și amilopectinei. α -Amilaza solubilă, o enzimă endohidrolitică, devine o exohidrolază după imobilizare.

Cinetica procesului se poate modifica atât de mult după imobilizare, încât se obțin produși total diferiți în comparație cu cei obținuți cu enzima solubilă.

Modificările sarcinilor electrice din microvecinătatea enzimei imobilizate pe suport pot duce de asemenea la modificarea condițiilor operaționale de pH ale procesului, conducând la valori aparente diferite pentru K_M , în funcție de natura suportului. Efectele electrostatice se pot reduce sau anula prin ajustarea tăriei ionice a tamponului.

Rezistența la difuzia externă (Nernst) într-un strat neagitat al fluidului care înconjoară aductul insolubil enzimă-suport, se poate reduce măbind viteza de agitare într-un reactor-tanc cu

agitator sau prin creșterea vitezei de scurgere laminară într-un reactor cu pat compact, ambele având un efect de micșorare a lui K_M .

Rezistența la difuzia internă este determinată cantitativ de un factor de eficiență, care este definit ca raportul dintre viteza de reacție observată și cea calculată. Acest factor este invers proporțional cu dimensiunile particulelor (vezi relația de la pag.237, vol.I). Reducând dimensiunile particulelor se diminuează și rezistența la difuzie internă, dar particulele foarte mici ridică probleme legate de tasare, mai ales în reactoarele cu pat compact.

Rezistența la difuzie internă mai poate fi redusă și prin mărirea porozității suportului.

II.2.2.2. Sisteme enzimatică multisevențiale co-immobilizate

În cazul unor reacții cu enzime multisevențiale, prezintă un mare interes activitatea fiecărei enzime. În capitolul II din vol. I s-a arătat că un sistem foarte eficient se obține co-immobilizând două sau mai multe enzime pe aceeași particulă de suport. Cinetica primei etape a reacției multisevențiale influențează hotărâtor eficiența întregului proces, datorită în special efectelor de microvecinătate.

Folosirea unui sistem de două sau mai multe enzime multisevențiale în același reactor, prezintă avantaje crescute față de preparatele individuale de enzime immobilizate:

- debite de alimentare mai înalte (în special în cazul reactoarelor cu pat compact);
- dacă prima reacție din secvență este termodinamic

defavorizată, prezența în microvecinătate a celei de a doua enzimă poate duce la deplasarea echilibrului în sensul dorit;

- creșterea vitezei de reacție pentru un substrat macromolecular asupra căruia acționează intermitent mai multe enzime.

Există și cazuri în care nu se recomandă preparatele de enzime co-immobilizate. Astfel, dacă în cazul unei reacții secvențiale se observă o inhibare a efectului de „feedback”, o acțiune catalitică mai eficientă se poate obține prin immobilizarea individuală a enzimelor. De asemenea, dacă enzimele multisevențiale au stabilități operaționale foarte diferite, se preferă immobilizarea lor în reactoare separate.

II.2.2.3. Sisteme celulare immobilizate

La utilizarea unor culturi de celule vegetale, țesuturi animale sau celule microbiene immobilizate apare o nouă barieră difuzională (membrana celulară). De aceea aceste preparate nu se pot folosi decât pentru substraturi cu masă moleculară joasă. În plus, în cazul culturilor viabile de celule trebuie asigurate mediul de cultură și condițiile unei proliferări celulare controlate.

Sistemele celulare pot fi utilizate atât pentru o singură reacție enzimatică, cât și ca sistem multienzimatic, sau ca sisteme intracelulare de metaboliți (coenzime).

Există câteva avantaje majore care recomandă utilizarea celulelor immobilizate în biotehnologie ca: eliminarea etapei de extracție și purificare a enzimelor cu reducerea prețului de cost al procesului, creșterea stabilității preparatelor etc.

Dintre dezavantajele sistemelor celulare immobilizate se pot enumera: dificultatea asigurării unei viteze de proliferare acceptabile (mai ales la celulele vegetale) și a mediului nutritiv

necesar, probleme legate de efecte difuzionale, apariția unor produse secundari care pot inhiba reacțiile, susceptibilitatea ridicată a unor celule (mai ales cele animale) etc.

Din aceste motive, problema biotehnologiilor bazate pe celule imobilizate va fi tratată separat de cea a preparatelor cu enzime individuale.

II.3. Tipuri de reactoare enzimatice

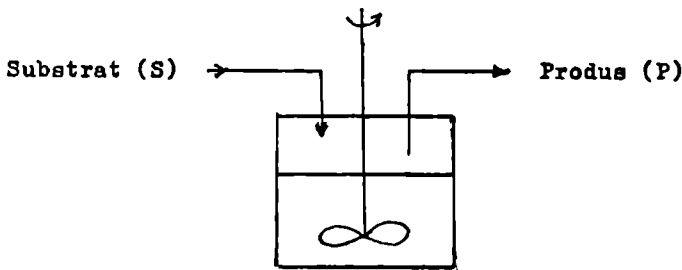
Designul unui reactor enzimatic cu enzime imobilizate nu diferă fundamental de cel al unui reactor pentru procese chimice convenționale, în cataliză heterogenă.

II.3.1. Reactoare în sistem discontinuu („batch”)

Asemenea reactoare-tanc cu agitare se folosesc și în cazul reacțiilor cu enzime solubile (native). Sistemul este format în principal dintr-un reactor-tanc (cuvă) prevăzut cu agitator mecanic, cu alimentare semicontinuă (fig.nr.9)

Fig. nr. 9

Reactor-tanc cu agitare

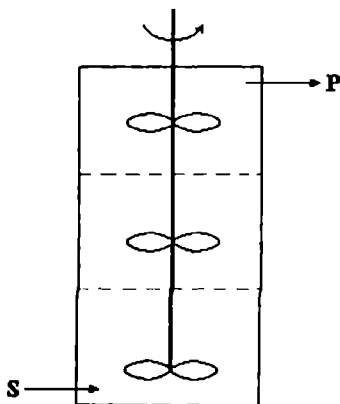


La intervale se evacuează o parte din masa de reacție și se înlocuiește cu soluție proaspătă de substrat. În cazul utilizării enzimelor imobilizate este necesară o operație suplimentară de reactivare a biocatalizatorului, care se dezactivează după un anumit număr de reacții.

Acest tip de reactor este folosit frecvent în laboratoare, dar utilizarea sa industrială este limitată de discontinuitatea operațiilor. Efectul discontinuității procesului se poate diminua printr-o modificare, folosind un reactor în trepte (fig.nr.10), care permite mărirea timpului de contact dintre substrat și biocatalizator.

Fig. nr. 10

Reactor-tanc cu agitare, în trepte



II.3.2. Reactoare cu flux continuu

Există două tipuri principale de reactoare pentru procese în flux continuu:

- a) Reactoare cu pat compact (fără agitare)

b) Reactoare cu agitare și flux continuu

Aceste două tipuri sunt complet diferite și reprezintă două cazuri extreme, ideale, între care s-a dezvoltat o gamă largă de variante constructive, urmărindu-se atât îmbinarea avantajelor ambelor extreme cât și eliminarea deficiențelor caracteristice fiecăreia dintre ele. Modificările trebuie să țină cont de: condițiile de reacție, caracteristicile aducătorilor suport-enzimă, natura substratului și produșilor de reacție.

În timp ce în reactoarele cu pat compact nu se operează în condiții uniforme, lucrându-se în general cu concentrații mari de substrat și mici de produs de reacție, în reactoarele cu agitare condițiile devin uniforme, fiind necesare concentrații mici de substrat pentru obținerea unor concentrații mari de produs.

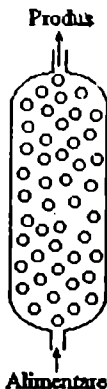
De aceea, există posibilitatea de a se obține un reaktor în flux continuu cu agitare optimă (aproape ideal), pe când un reaktor ideal cu pat compact este aproape inaccesibil, deoarece în acest din urmă caz cinetica reacției este puternic afectată de gradientii de temperatură și de viteză normali pe direcția axială a fluxului de alimentare și de difuzia soluției de substrat.

Un tip intermediar de reaktor, între cele două cazuri extreme (a și b) este reaktorul cu pat fluidizat (fig.nr.11) în care soluția substratului este pompată cu viteză mare pe la partea inferioară, producând expansiunea patului de enzimă imobilizată. Un asemenea reaktor, folosit mai ales în cazul preparatelor de enzime imobilizate pe particule (sferice) are în general caracteristici excelente de transfer de masă și de căldură.

În plus reaktorul cu pat fluidizat prezintă și avantajul unei viteze excelente pentru debitul soluției de substrat, reducând efectele de limitare a difuziei externe.

Fig. nr. 11

Schema generală a unui reactor cu pat fluidizat

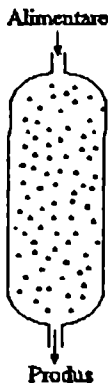


Indiferent de tipul de reactor folosit, pentru a se mări timpul de contact al substratului cu biocatalizatorul, se folosește recircularea debitului de ieșire, iar în unele cazuri se lucrează chiar cu o baterie de reactoare, legate în serie sau în paralel.

În figura nr. 12 este schematizat un reactor cu pat compact ideal.

Fig.nr. 12

Reactor „ideal” cu pat compact



Un asemenea reactor nu poate fi folosit în reacții în care enzimele sunt immobilizate pe granule de suport de dimensiuni mici, apărând fenomenul de tasare, care poate duce la scăderea dramatică a vitezei de înaintare a soluției de substrat.

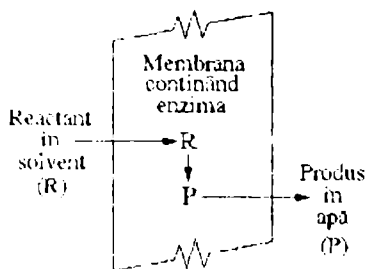
De aceea, dacă în cazul acestor particule se folosește reactorul cu pat fluidizat, în cazul în care aductul suport-enzimă se prezintă sub formă de tuburi, membrane, Hollow-fibers, s-au conceput și se utilizează tipuri constructive de reactoare, care sunt de fapt tot atâtea variante ale reactorului „ideal” cu pat compact.

II.3.2.1. Reactoarele cu membrană

Aceste reactoare (fig. nr 13) au fost aplicate de Watson și Quinn pentru scindarea enzimatică a racemicilor unor derivați ai α -aminoacizilor. Reactorul are forma unui „sandwich” de membrane de aduct suport-enzimă, separate între ele de membrane spațietoare, semipermeabile. Ele sunt folosite pentru substratele solubile în apă.

Fig. nr. 13

Modul de funcționare a unui reactor cu membrană

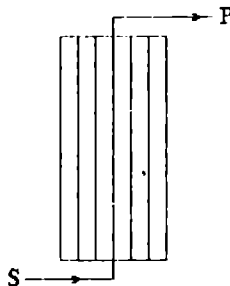


II.3.2.2. Reactoare tubulare

In general, umplutura unui asemenea reactor are o formă dictată de cea a preparatului de enzimă imobilizată, schema sa generală fiind cea din fig.nr.14.

Fig. nr. 14

Reactor tubular

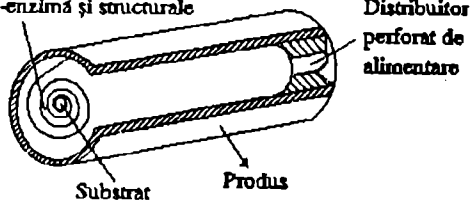


Intr-un asemenea reactor se pot introduce foi de membrane de enzime imobilizate pe colagen (fig.nr.15), separate printr-un spațietor semipermeabil și rulate în jurul unui dispozitiv coaxial perforat, de alimentare:

Fig. nr. 15

Reactor tubular ou membrane.(Venkatasubramanian și Vieth)

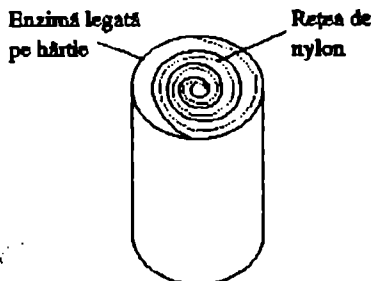
Straturi alternative de membrane de colagen-enzimă și structurale



sau foi de celuloză (hârtie) cu enzimă immobilizată înfăşurată în spirală (fig.nr.16), alternând cu un spaţietor (membrană structurală) care poate fi o pânză de nylon, în care alimentarea se face tot printr-un distribuitor central, coaxial, perforat.

Fig. nr. 16

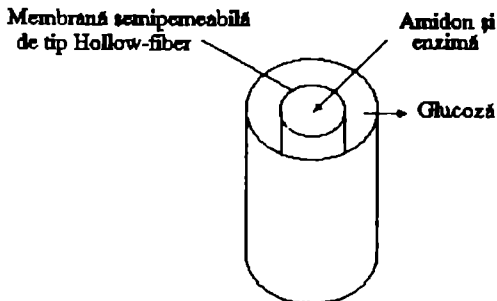
Reactor tubular cu foi de hârtie cu enzimă immobilizată
(Emery)



, sau fascicule de „Hollow-fibers” cu enzime immobilizate pe suprafaţa internă (lumen), a cărei funcţionare este ilustrată în fig. nr. 17.

Fig. nr. 17

Mod de funcţionare a unui reactor tubular cu
„Hollow-fibers” (Glosset şi colaboratorii)



În 1990 Lopez și colaboratorii au descris un bioreactor multifazic cu membrane de Hollow-fiber, utilizat la bioconversia substratelor insolubile în apă, dar solubile în solvenți nemiscibili cu apa.

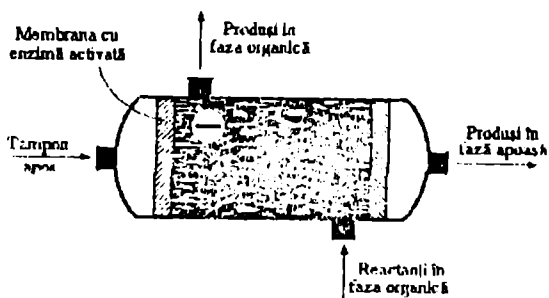
Membranele de Hollow-fibers au fost confecționate din poli-acrilonitril cu proprietăți hidrofile, dar rezistent la acțiunea solvenților organici.

Diametrul mic al fibrelor ($\sim 300\mu m$) asigură o suprafață de contact ridicată, iar dimensiunile mari ale porilor fac posibilă o bună retenție a enzimelor (fig. nr. 18).

Suprafața luminală care conține enzima face ca prin ultrafiltrare, includerea enzimei să fie ușurată.

Fig. nr. 18

„Hollow-fiber” pentru conversia substanțelor în soluții de solvenți nemiscibili cu apa



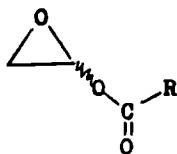
Un curent apos (soluție tampon) este pompat prin canalele lumenului fibrei. În același timp, se pompează în contracurent, prin exteriorul fibrelor, soluția substratului în solvent organic.

Sistemul este menținut în echilibru (fază organică/fază aposă) la suprafața membranei de Hallow-fiber, cu ajutorul unei presiuni ușor pozitive (2-4 psig) a fazei organice.

În condiții operaționale stabile, cele două faze (aposă și organică) se saturează fără a se amesteca.

Periodic enzima desactivată se înlocuiește prin spălarea suportului și o nouă imobilizare.

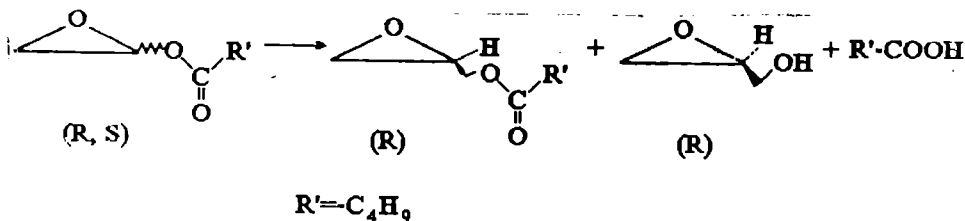
Un astfel de dispozitiv orizontal cu „Hallow-fibers” a fost utilizat la scindarea unor racemici (glicidil-esteri) de forma:



R₁S

Schema fluxului tehnologic al rezoluției racemicilor este indicată în fig. nr 19. În fig. nr. 20 este indicat modul de funcționare al reactorului (orizontal) cu Hallow-fibers.

Ecuația globală a reacției de scindare va fi:



Enzima utilizată a fost lipasa pancreatică bovină.

Fig. nr. 19

Flux tehnologic pentru scindarea într-un reactor cu Hallow-fibers a racemicilor de forma:

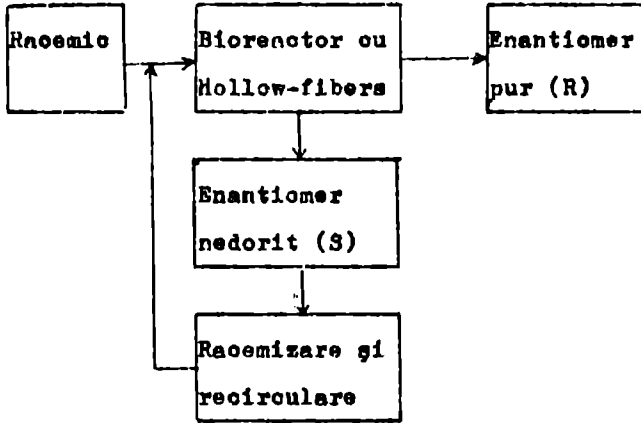
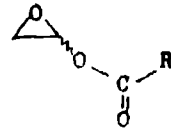
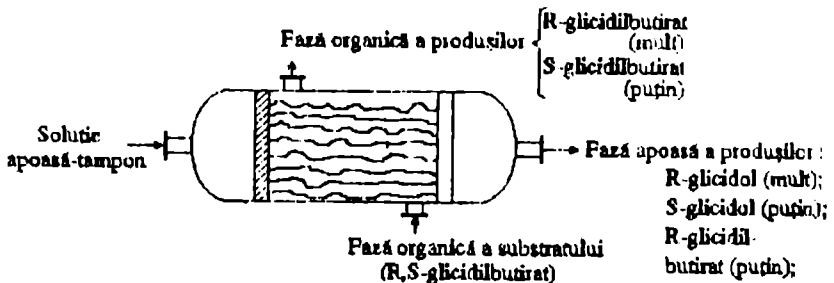


Fig. nr. 20

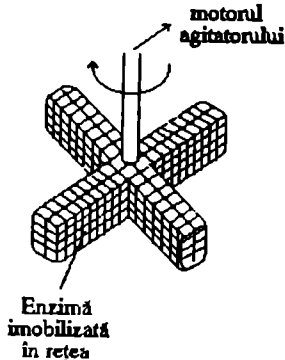
Schema de funcționare a unui reactor tubular cu Hallow-fibers pentru dedublarea amestecului de glicidil-butirat



In cazul reactoarelor discontinue cu agitare, materialul de enzimă immobilizată poate fi aplicat pe paletetele agitatorului, ca în fig. nr. 21.

Fig. nr. 21

Agitator înfășurat în pânză de nylon, pentru
reactoare-tanc cu agitare (Havewala și Weetal)



Materialul poate fi o pânză de nylon, care conține enzima immobilizată chimic. Această variantă prezintă avantajele unei bune agitări a amestecului de reacție, fără a mai fi nevoie de etapa suplimentară a eliminării aductului cu enzimă immobilizată (prin filtrare sau centrifugare) după deactivarea biocatalizatorului. Reactivarea aductului se poate face ca în cazul reactoarelor cu pat compact.

O variantă de reactor cu pat compact a fost descrisă în 1990 de către Ichijo și colaboratorii, pentru hidroliza continuă a zahărului și pentru fermentația alcoolică, folosind invertaza și, respectiv - drojdia de brutărie immobilizate prin legături ionice pe fibre de alcool polivinilic.

Invertaza astfel immobilizată capătă o mare stabilitate, iar celulele de drojdie fixate pe aceste fibre transformă miera în etanol.

Fibrele de suport se împletesc și se înfășoară în spirală în jurul unui tub coaxial perforat, de alimentare. Bobina astfel obținută se plasează într-un cartuș din hârtie de filtru.

Pentru imobilizare soluția de invertază se circulă prin fibrele de alcool polivinilic bobinate, măsurându-se scăderea concentrației enzimei din rezervorul de alimentare.

După imobilizare, soluția de substrat (zahăr) 0,5 M se circulă prin bobina ce conține invertaza imobilizată. Concentrațiile substratului și produșilor de reacție se măsoară prin cromatografie de lichide.

Procedeele este similar pentru celulele de drojdie imobilizate, lucrându-se cu soluții de miere (200 g/l).

II. 3.2.3. Alte variante de reactoare

Cercetători, firme și corporații industriale au construit și alte variante de reactoare enzimatic.

Astfel, Gelf și Boudrant au utilizat un reactor cu pat fluidizat conținând papaină imobilizată pe particule magnetice și care sunt menținute în expansiune cu ajutorul unui magnet ce înconjură reactorul.

Worthington Biochemical Corporation a construit un reactor cu enzime imobilizate pe discuri de membrană. Aceste discuri sunt fixate în interiorul reactorului pe un ax central acționat continuu de un motor electric. Alimentarea cu soluție de substrat se face direct, între discuri.

Pentru reacții în fază de aerosoli, Kirwan și colaboratorii au imaginat reactoare cu enzime fixate pe corpuri ceramice monolite și pe site de sticlă filtrantă.

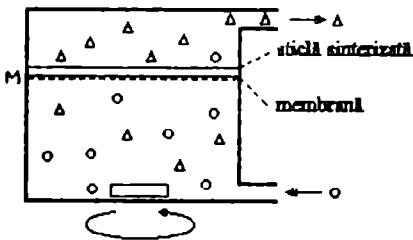
Alegerea tipului de reactor depinde de mai mulți factori:

- Reactoarele cu membrană de ultrafiltrare conțin o membrană selectivă, permeabilă pentru compuși (substrate, produși de reacție) cu mase moleculare scăzute.

In fig.nr. 22 este schematizat medul de funcționare al unui reactor cu membrană de ultrafiltrare care constă fie dintr-un imobilizat de biocatalizator pe un suport sub formă de folie semipermeabilă sau de „Hollow-fiber” (obținut prin adsorbție, includere reticulare etc), fie dintr-un film subțire de celule „autoimobilizate”.

Fig. nr. 22

Principiul de funcționare al unui bioreactor cu membrană de ultrafiltrare



M = membrană de ultrafiltrare
re ou biocatalizator imobilizat, plasată între două straturi de foi semipermeabile
o = substrat
Δ = produs de reacție

Drept suporturi pentru imobilizarea biocatalizatorilor pot fi folosiți atât compuși macromoleculari naturali (colagen, gelatină, celuloze modificate ca celofanul etc), cât și cei sintetici (nylon, polietersulfone etc).

Principiul funcționării unui asemenea bioreactor este cel al ultrafiltrării. Varietățile de membrane sintetice comerciale au porozități corespunzând unor mase de 500-300.000 Daltoni și presiuni rezonabile. Aceste reactoare pot fi folosite în procese industriale continue, automatizate.

Dezavantajul major al bioreactoarelor cu membrană de ultra-

filtrare constă în dimensiunile lor mici, ceea ce duce la o concentrare a polarității și la blocajul porilor membranei cu particule solide, grăsimi sau particule coloidale existente în substrat.

Acest dezavantaj dispăre dacă se folosesc membranele selective similare, sub formă de „Hollow-fiber” introduse într-un reactor cu pat compact, prin care substratul este recirculat rapid.

- Reactoarele cu pat compact în diversele lor variante constructive nu se pot folosi în cazurile în care cantitatea de enzimă per unitatea de volum de reactor este prea scăzută, pentru că ar necesita vase de dimensiuni foarte mari, ridicând costurile procesului de fabricație.

- Reactoarele cu pat fluidizat, mai eficiente și mai ușor adaptabile, se utilizează pe scară largă. În asemenea reactoare se operează și cu particule foarte fine care prezintă pericolul de compactare (tasare) în reactoarele cu pat compact. Viteza de expansiune a patului-catalizator poate afecta performanța acestor reactoare, micșorând timpul de contact dintre enzimă și substrat. O recirculare multiplă a soluției de substrat prin reactor poate duce la mărirea acestui timp și deci la creșterea eficienței procesului.

- Într-un reactor discontinuu, cu agitare, există riscul sporit al dezactivării aductului de enzimă immobilizată, prin dezintegrarea și (sau) dizolvarea suportului, ca rezultat al unei agitări intense și prelungite. În asemenea reactoare se recomandă a se folosi preparate de enzime immobilizate cu rezistență mecanică ridicată.

- Reactoarele bifazice sunt o descoperire relativ recentă,

în care se utilizează o fază formată din apă și alta dintr-un solvent organic nemiscibil cu apa. Avantajul acestor reactoare constă în faptul că pot utiliza substraturi insolubile în apă pură, produsul de reacție izolându-se pe baza fenomenului de partiție între cele două faze.

- Un criteriu important al alegerii bioreactorului este și reacția care se efectuează.

Astfel, un reactor discontinuu se pretează mai bine pentru reacții care necesită transfer masiv de oxigen sau un control permanent al pH-ului prin ajustare cu acizi sau cu alcalii. De asemenea, aceste reactoare discontinue se recomandă și pentru substraturi în formă de particule coloidale.

II.4. Biotehnologii bazate pe celule immobilizate

Dispozitive și preparate cu celule immobilizate se folosesc pentru obținerea unor produse alimentare (bere, băuturi alcoolice, spirt, drojdii de panificație și furajere etc.), medicamente (enzyme, aminoacizi, antibiotice, vitamine etc.), compuși chimici cu diverse întrebuințări (acizi organici, acetonă, fenol etc.), dar și pentru biosinteza unor preparate folosite în scopuri terapeutice și în cercetarea medicală.

De exemplu, din fig.nr. 23 se poate vedea că numai în urma fotosintezei se poate obține o mare diversitate de produse valoroase pentru industria alimentară, plecând de la materii prime pentru industria chimică.

Domeniile de aplicație fiind extrem de largi și multiple și nefăcând subiectul propriu-zis al prezentului studiu, în cele ce urmează vor fi amintite, în mare, tipurile de preparate cu celule immobilizate ca și tipurile principale de reactoare în care acestea se utilizează.

Cum nu există un model universal de reactoare pentru biosinteze industriale, atât forma de immobilizare a celulelor cât și tipul de reactor se aleg de la caz la caz. Materialele și reactoarele utilizate trebuie să îndeplinească mai multe condiții generale:

- o bună omogenizare a amestecului de reacție care să asigure accesul rapid și eficient al substratului la suprafețele celulelor immobilizate;

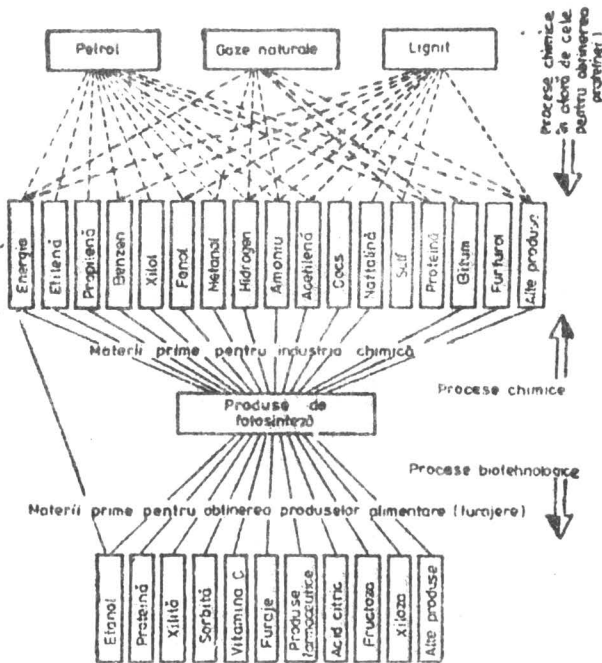
- o rezistență minimă la transferul de masă;

- performanțe în condiții operaționale blânde de: temperatură, pH, salinitate, agitare;

- posibilitatea cultivării continue a celulelor în condițiile de reacție date.

Fig. nr. 23

Materii prime pentru sinteza chimică și microbiologică



Dacă pe plan mondial s-a rezolvat problema determinării parametrilor fizici ai mediului steril de cultură, apar dificultăți mari în măsurarea concentrației substratelor și produselor, datorită duratei mari impuse de metodele analitice clasice. De aceea, deocamdată nu poate fi introdusă, la nivel industrial comanda eficientă a metabolismului în funcție de activitatea enzimelor cheie din metabolismul hidraților de carbon.

Schema tehnologică universală

Deși aparatura industrială se alege în funcție de o tehnologie determinată, în 1987, V.Viesturs, I.Šmite și A.Žileviča au elaborat o schemă generală (fig.nr.24) care grupează principalele instalații ce se pot utiliza în bioconversiile cu culturi de celule.

În schema din fig. nr. 24 componentele principale sunt:

- 1 - reactorul pentru prepararea mediilor nutritive;
- 2 - pompă turbionară;
- 3 - aparat pentru pregătirea și sterilizarea mediilor din substraturi insolubile, pentru fermentarea de suprafață și în fază solidă;
- 4 - coloană de abur pentru încălzirea mediilor nutritive la temperatura de sterilizare;
- 5 - aparat de menținere a mediilor nutritive la temperatura de sterilizare;
- 6 - schimbător de căldură, pentru răcirea mediilor nutritive sterile;
- 7 - dispozitiv de măsurare - colector de medii nutritive;
- 8 - dozator;
- 9 - fermentator anaerob;
- 10 - fermentator aerob;
- 11 - reactor biocatalitic;

- 12 - fermentator în fază solidă sau lichidă;
- 13 - extractor;
- 14 - separator pentru biomasă;
- 15 - sistem de automatizare locală pentru menținerea regimului de biosinteză;
- 16 - plasmolizator de biomasă pentru preparate furajere;
- 17 - dezagregator de biomasă;
- 18 - instalație de abur;
- 19 - dezagregatoare fracționale;
- 20 - uscător și alte aparate pentru deshidratare;
- 21 - aparatură de normalizare și ambalare;
- 22 - coloane schimbătoare de ioni, aparate cu membrană, aparate pentru extracție chimică, centrifuge, filtre, instalații de abur, cristalizoare etc.

Simboluri: pH = soluție pentru corectarea pH-ului;

P = componente și medii pentru completarea până la nivelul normal de funcționare a reactorului; P_{OS} = material de însămânțare;

V = aer comprimat steril;

PAV = antispumant steril;

Sr = mediu nutritiv steril pentru procesele de fermentare, obținerea drojdiilor furajere etc. (condiționat steril);

BA = agent biologic

După cum se vede din fig. nr. 24, aceasta este o schemă care cuprinde atât reactoare (fermentatoare) cu culturi libere de celule, (9, 10, 12) cât și reactorul biocatalitic (11) cu celule imobilizate.

Acest din urmă reactor se alege în funcție de specificul agregatului suport-celule (forma de condiționare) cât și de

reacția biocatalizată care are loc în reactor.

Designul reactorului cu celule imobilizate este în principiu similar cu cel utilizat pentru procesul chimic considerat, implicând o cataliză heterogenă în condiții sterile și aseptice reclamate de specificul metodei.

II.4.1. Reactoare „batch”

Aceste reactoare se folosesc frecvent în reacții biocatalizate de enzime libere, care nu se mai recuperează la sfârșitul bioconversiei. Utilizând același procedeu la enzime sau celule imobilizate, biocatalizatorul se poate recupera. Totuși, recuperarea (mai ales repetată de multe ori) poate duce la inactivarea biocatalizatorului.

Avantajul mare al celulelor imobilizate este că se pot folosi în procedeul „batch” în care potențialul catalitic al celulelor din agregat nu este în întregime epuizat, chiar după o utilizare prelungită.

II.4.2. Reactoare în flux continuu

După cum am mai amintit în cadrul capitolului referitor la enzimele imobilizate (pag. 78-81), reactoarele în flux continuu au două tipuri de bază:

- reactor-tanc cu agitare, cu o amestecare complexă și
- reactorul cu pat compact, dar fără agitare.

Dar un reactor ideal cu pat compact este dificil de realizat, pe când un reactor-tanc cu agitare ideal este mai ușor abordabil din punct de vedere practic.

Un compromis între aceste două tipuri este reactorul cu pat

fluidizat care asigură un nivel de amestecare (omogenizare) intermediar. Soluția de substrat este trecută prin reactor cu asemenea viteză, încât determină expandarea particulelor de celule imobilizate. Asemenea reactoare se recomandă pentru celule incluse în particule de geluri de formă sferică (perle), cu o densitate mai mică sau apropiată de cea a apei. Aceste reactoare prezintă avantajul unor debite înalte de substrat, dar consumă multă energie.

Bioreactoarele cu pat fluidizat sunt folosite pe scară largă în cazul celulelor de plante imobilizate, care prezintă o slabă capacitate de proliferare și sunt foarte sensibile la forțele exterioare de forfecare.

În aceste reactoare agitarea este moderată, dar nu este posibilă aerarea directă a celulelor care poate duce la creșterea turbulenței și a forțelor de forfecare peste limitele acceptabile. De aceea bioreactorul este plasat în instalație după un vas special de oxigenare (prin agitare blândă) a culturii de celule și cuplat cu acesta.

Pentru a preveni forțele de forfecare care pot distruge culturile de celule și pentru a contracara viteza lor redusă de creștere, se mai pot folosi și reactoare cu membrane de celule (cu o densitate mare a celulelor).

Un caz special al reactoarelor cu pat fluidizat îl reprezintă reactorul cu trei trepte (Vas și colaboratorii), folosit în cazul în care particulele de biocatalizator au o densitate suficient de diferită față de cea a mediului înconjurător.

Variante constructive ale reactorului clasic cu pat compact (fără agitare, în care nu apar forțe de forfecare) pot fi realizate în funcție de modul de condiționare a agregatelor suport-celule: particule sferice (perle) cu densitate mai mare decât cea a apei, inele de sticlă sau ceramică cu celule adsorbite pe suprafața lor.

bile sau filamente metalice, filme, plăci, „Hollow-fiber”, membrane semipermeabile. Aceste variante constructive au fost descrise și în capitolul privitor la enzimele immobilizate (pag. 77-88). Celulele „autoimmobilizate” se folosesc de obicei în reactoare cu membrane. În general, bioreactoarele cu pat fluidizat se folosesc pentru procese ca: obținerea alcoolului etilic, a ciclosporinei, epurarea apelor reziduale etc.

Bioreactoarele cu membrane rotative sau tubulare se utilizează pentru creșterea culturilor celulare și immobilizarea drojdiilor și bacteriilor, ca și pentru: obținere de virusuri, producere de vaccinuri antivirale, obținerea anticorpilor monoclonali, a etanolului, glucozei, fructozei etc.

Reactoarele - coloane cu celule immobilizate (de exemplu, pe „Hollow-fibers” sau pe particule sferice) și cu flux circulant se utilizează pe scară largă, de la obținerea etanolului și până la cea a anticorpilor monoclonali.

Deși construcția bioreactoarelor este aproape similară cu cea a reactoarelor chimice „clasice”, există o serie de factori obligatorii care condiționează atât designul cât și exploatarea lor:

- sensibilitatea fizico-mecanică a culturilor de microorganisme (în special miceli);
- realizarea simultană a proceselor de transfer de masă (lichid-celule, gaz-lichid-celule și gaz-celule-substrat solubil/puțin solubil);
- viteza mică de proliferare a culturilor;
- obligativitatea asigurării sterilității tuturor operațiilor;
- folosirea aerului ca unică sursă economică de oxigenare a culturilor;
- formarea spumei în reactor;

- componența complexă a mediilor nutritive;
- numărul mare de reacții biobchimice care decurg simultan în cursul creșterii celulelor și complexitatea reacțiilor simultane de transformare a substratului în produs;
- termolabilitatea produsilor de reacție;
- influența proprietăților genetice ale culturii de celule asupra biosintezelor realizate în reactor;
- prezența unor concentrații admisibile relativ mici ale componentelor cu efect nutritiv din cultură;
- modificarea în timp a unor caracteristici biotehnologice ale bioreactoarelor (necesarul de oxigen, disiparea căldurii, nivelul și proprietățile spumei, nivelul lichidului în reactor etc.);
- materiale speciale necesare suprafețelor interioare ale aparatelor (în special pentru culturile tisulare);
- necesitatea traductoarelor sterilizate chimic (termic) pentru măsurarea pH-ului, presiunii O_2 etc;
- separarea, purificarea și concentrarea produselor.

Toate acestea limitează viteza de reacție a proceselor din bioreactoare.

O influență deosebită asupra vitezei de reacție o are transferul de masă între diferite faze.

În tabelul nr. 14 sunt indicați pe scurt parametrii care guvernează alegerea și proiectarea reactoarelor pentru procesele de fermentație.

Se pot construi și bioreactoare în care celulele se co-immobilizează cu: enzime pure, coenzime, organite celulare, realizându-se reacții multisevențiale sau „simbioze” induse. Pentru reacțiile cu o singură etapă viabilitatea celulelor nu este obligatorie, deși celulele viabile prezintă avantajul reactivării „in situ”.

Tabelul Nr. 14

Principalele mărimi și parametri de calcul utilizați în proiectarea bioreactoarelor cu celule imobilizate

Măsurări analoage cu cele din tehnologia chimică, industria alimentară etc.	Măsurări specifice pentru procese biotehnologice	Parametri calculați pe baza valorilor măsurate
<ul style="list-style-type: none"> - temperatura de fermentație și a diferitelor fluxuri productive; - pH (traductoare sterilizate); - potențial redox; - presiunea din reactor, din aparate auxiliare etc.; - nivelul și masa (tensometria) mediilor, substratelor și produselor; - consumuri de lichide și gaze; - turația agitatoarelor; - puterea consumată de electromotor; - concentrația de gaze (O_2, CO_2, CH_4, H_2 și alte gaze) în aer; - concentrația de ioni din lichide; 	<ul style="list-style-type: none"> - concentrația principalelor substanțe (zaharuri, acizi organici, alcooli etc.) și produse în lichidul de cultură; - concentrația principalilor indicatori intracelulari (fermenții metabolismului glucidelor, metaboliti cheie, ATP, NADP etc.); - concentrația de biomasă; - inexistența microflorei străine; - concentrația O_2 și CO_2 dizolvați în lichidul de cultură; - nivelul și starea spumei; - concentrația parțială și finală a produsului; 	<ul style="list-style-type: none"> - productivitatea sistemului; - viteza specifică de creștere; - viteza specifică de consum a substratului; - viteza specifică de formare a produsului; - coeficientul volumic al transferului de masă, după oxigen; - randamentul energetic al procesului de sinteză/creștere; - producția de căldură; - indicatori tehnologici specifici procesului; - consumul specific total de materii prime.

In comparație cu preparatele pe bază de enzime pure imobilizate, aducții obținuți prin imobilizarea celulelor oferă perspective mult mai largi atât pentru biosinteza propriu-zisă (extinderea utilizării preparatelor la realizarea unor reacții polisacaridice și chiar a unor cicluri metabolice complete), cât și prin abordarea unei palete extinse de utilizări a culturilor de celule animale, umane și vegetale în cercetarea biologică, în general, în terapia medicală, în farmacologie, agricultură, zootehnie etc. In tabelul nr. 15 sunt date câteva exemple de utilizare industrială a unor microorganisme imobilizate.

Tabelul Nr. 15

Exemple de aplicații industriale ale unor celule imobilizate

Specia de celule	Metoda de imobilizare	Enzima utilizată	Aplicații	Industrializate de:
1	2	3	4	5
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Includere în gelatină reticulată cu glutaraldehidă	Glucosizomerasa	Izomerizarea glucozei la fructoză	Gist-Brocades Olanda
<i>Bacillus coagulans</i>	Reticulare cu glutaraldehidă	Glucosizomerasa	Glucosă → Fructoză	NOVO Industri, Danemarca
<i>Bacillus sp.</i>	Reticulare cu glutaraldehidă	β -Galactozidază	Hidroliza lactozei	NOVO Industri, Danemarca

Tabelul Nr. 15 (continuare)

1	2	3	4	5
Brevibacterium flavium	Includere în carageenan:	Fumaraza	Conversia fumaratului la acid L-malic	Tanabe, Seiyaku CoLtd Japonia
Escherichia coli	Includere în carageenan:	Aspartaza	Conversia fumaratului de amoniu la acid L-aspartic	Tanabe Seiyaku CoLtd Japonia
Escherichia coli	Includere în poliacrilamidă (PAA)	Penicilinază	Obținerea 6-APA din penicilină	Tanabe Seiyaku CoLtd Japonia
Escherichia coli + Pseudomonas ducunhae	Includere în carageenan:	Aspartază+ L-aspartat- β -decarboxilaza	Obținere de L-alanină din iumarat	Tanabe Seiyaku CoLtd Japonia
Mortierella vinacea	Reticulare cu glutaraldehidă	α -Galactozidaza	Hidroliza rafinozel	Great Western Sugar Co. SUA
Proteus rettgeri	Legare de glicidilmetaacrilat și glutaraldehidă	Penicilinaza	Obținere de 6-APA din peniciline	Pfizer Inc. SUA

Tabelul Nr. 15 (continuare)

1	2	3	4	5
Streptomyces albus	Tratare la cald în reactor de filtrare	Glucocizomeraza	Isomerizarea glucozei la fructoză	Clinton Corn. Proc. Co., SUA
Streptomyces atraceus	Reticulare cu glutaraldehydă	Glucocizomeraza	Glucoză → → Fructoză	Miles Laboratories Inc., USA

Extinderea biotehnologiei poate elimina o serie de tehnologii chimice convenționale, caracterizate prin gigantismul instalațiilor, consum ridicat de energie și efecte poluante de durată și uneori ireversibile, cu consecințe nefaste pentru mediul înconjurător.

Un număr mare de sinteze petrochimice sunt astăzi realizate prin metode biotehnologice, care folosesc mai ales biocatalizatori sub formă imobilizată.

III. ALTE APLICATII ALE BIOCATALIZATORILOR IMOBILIZATI

III.1. Aplicații în studii biochimice

III.1.1. Studiul structurii cuaternare a enzimelor

Imobilizarea pe suport a moleculelor enzimelor conduce la o modificare parțială a conformației acestora, ceea ce oferă perspective legate de studiul unor interacții moleculare. Chiar din 1970, derivați imobilizați au fost folosiți pentru a se preveni asocierea spontană dintre subunitățile unei proteine oligomere.

Imobilizarea oferă astfel posibilitatea de a se determina care din subunitățile structurii cuaternare a enzimei este activă catalitic.

Dacă subunitatea este activă, compararea proprietăților sale enzimatoice cu cele ale oligomerului corespunzător imobilizat poate oferi informații asupra legăturii dintre interacțiile subunitare și funcția biocatalitică a enzimei. Asemenea informații nu sunt accesibile pentru toate enzimele, pentru că se folosesc tehnici în care structurile oligomere native trebuie să rămână suficient de stabile chiar în condițiile care determină disocierea lor. Pentru asemenea enzime este posibil procesul invers de reasociere spontană în structura nativă cu o bună recuperare a activității lor.

III.1.1.1. Alegerea condițiilor experimentale

Un bun suport pentru studiul subunităților structurale ale enzimelor se dovedește a fi Sepharoza 4B. Natura hidrofilă și neionică a acestui polizaharid - suport poate conduce la derivați imobilizați ale căror proprietăți să nu fie afectate considerabil de prezența suportului. Aducții obținuți sunt

operaționali în condiții normale, în soluții tampon obișnuite.

Porozitatea ridicată a suportului de Sepharoză ușurează difuzia macromoleculilor în interiorul și în exteriorul gelului, în cursul imobilizării.

Dacă gelurile nu sunt poroase, macromoleculele rămân fixate doar pe suprafață; în asemenea cazuri este mult mai greu să se obțină o cantitate suficientă de subunități legate per unitatea de volum a gelului. În plus, pentru oă structura gelului de Sepharoză nu este complet rigidă aducții obținuți nu rezistă la stocare și la temperaturi moderate. Pentru obținerea unor subunități imobilizate, cu stabilitate mare, se recomandă Sepharoza reticulată cu divinilsulfonă.

Unul dintre procedeele folosite este cuplarea inițială a formei oligomere a enzimei pe suport (prin intermediul numai a uneia dintre subunitățile sale), după care se generează monomerul prin spălare exhaustivă, în condiții favorabile disocierii. Metoda oferă multe avantaje în comparație cu cea care constă în cuplarea directă a formei monomere în condiții de disociere a oligomerilor. Principalul impediment în acest din urmă caz este posibilitatea alterării structurii terțiare a subunităților disociate în condiții prea energice. În plus, în monomerul cuplat în condiții disociative, legătura polipeptidică devine instabilă în timp. Apoi, monomerii cuplați direct în aceste condiții nu se pot reasocia prin adăugarea unor subunități solubile, pentru a reveni la forma oligomeră, între subunitățile fixate pe suport nerămânând suficient spațiu disponibil.

În schimb, monomerul imobilizat prin cuplarea inițială a oligomerului și disocierea lui ulterioară interacționează ușor cu subunitățile din soluție.

Pentru imobilizarea oligomerului este necesară activarea

suportului, ceea ce prezintă risoul unei reticulări între moleculele proteinei sau între subunitățile structurale (monomeri).

Folosind ca agent de activare a Sepharozei BrCN, legăturile formate între proteină și suport pot fi rupte în condiții blânde.

Pentru a preveni cuplarea pe Sepharoză a oligomerilor prin mai mult decât o singură subunitate structurală, este necesar să se limiteze densitatea punctelor activate de pe suport. În acest scop, cel mai acceptabil este un raport de 1-5 mg BrCN per ml Sepharoză, când riscul contaminării prin imobilizarea dimerilor este redus la minimum.

Densitatea redusă a moleculelor imobilizate mai prezintă și avantajul de a diminua efectul caracteristic de microvecinătate a suportului care ar duce la creșterea lui K_M datorită limitării vitezei de difuzie a substratului.

În acest fel, pe Sepharoză 4B, au fost imobilizate subunități ale aldolazei din mușchiul de iepure sau ale transaldolazei din drojdie.

III.1.1.2. Criterii de control al prezenței subunităților imobilizate

După imobilizare trebuie să existe asigurarea prezenței subunităților structurale în aductul obținut. Criteriile de control sunt sumarizate în tabelul Nr. 16.

Tabelul Nr. 16

Criterii de control ale prezenței subunităților imobilizate

Testul	Tipul de subunități imobilizate la care este aplicabil testul	Rezultate previzibile dacă subunitățile sunt prezente
Conținut în proteină	active sau inactive	$1/n \times$ conținut de oligomer imobilizat (n=nr. de subunități)

Tabelul Nr. 16 (continuare)

1	2	3
Stabilitate la denaturare	Active	Inactivarea decurge la o concentrație scăzută de agent denaturant
Stabilitate la încoțzire sau la proteoliză	Active	Inactivarea poate avea loc cu o viteză diferită.
Evaluarea modificărilor chimice	Active sau inactive	Posibile modificări ale unor reziduuri cu structură previzibilă
Viteza modificării chimice	Active	Inactivarea poate avea loc cu viteze diferite
Interacții cu subunități solubile	Active sau inactive	Creșterea activității până la cea a oligomerului imobilizat; reconstituirea proprietăților formei oligomere.
Interacții cu subunități solubile inactive la situsul activ	Active	Activitate neschimbată dacă subunitățile acționează independent, proprietățile revenind la cele ale formei oligomere.

Tabelul Nr. 16 (continuare)

1	2	3
	Inactive în afară de interacțiile subuni- tare Inactive datorită modificării restului esențial în cursul imobilizării	Activitate aparentă Nu apare nici o activi- tate

*Se poate determina numai dacă imobilizarea este reversibilă și modificările datorate imobilizării pot fi înlăturate ulterior.

a) Conținutul în proteină

Conținutul în proteină al oligomerului imobilizat se compară cu cel al subunității imobilizate obținute ulterior din acesta. În acest scop aductul se hidrolizează cu HCl 6N și se analizează aminoacizii rezultați.

Rendamentul cuplării cu suportul depinde în primul rând de natura proteinei, de cantitatea de BrCN utilizată la activarea suportului, ca și de pH. Astfel se observă în cazul aldolazei (tetramer) din mușchiul de iepure că preparatul cu cel mai înalt conținut de monomer imobilizat este obținut la pH = 8,0, cu o cantitate de BrCN (mg/ml Sepharoză) de 5,0. Pentru transaldolaza (dimer) din drojdie, conținutul optim de monomer imobilizat se atinge la pH = 8,5 și 5,0 mg BrCN/ml Sepharoză.

b) Stabilitate

În cazul în care subunitățile imobilizate sunt active, acestea vor avea proprietăți distincte față de ale oligomerului imobilizat.

Utilizând un agent de denaturare ca ureea se pot deosebi formele monomere de cele oligomere ale aceluiași enzimă.

Când o enzimă există sub formă oligomerică, interacțiile pe subunitatea de suprafață contribuie la stabilitatea structurii în ansamblul ei. Așadar, pentru inactivarea oligomerului este necesară o cantitate mai mare de uree decât pentru monomer. Instabilitatea mare a monomerului se poate explica prin posibilitatea de a lega mai ușor ureea pe suprafața sa. Inactivarea este influențată de asemenea de natura enzimei, ca și de pH.

c) Interacții specifice cu subunități solubile generate „in situ”

Monomerii imobilizați au o abilitate specifică de a lega subunitățile din soluție, așa cum subunitățile disociate dintr-o enzimă prin denaturare, tind să reface asocierea în soluție, după îndepărtarea agentului de denaturare (de exemplu, clorhidrat de guanidină).

Rezultatele experimentale au arătat că fiecare din monomerii imobilizați tind să lege atâtea subunități câte corespund structurii cuaternare originară a enzimei.

d) Interacții cu subunități solubile inactivate, la situsul activ

Este posibil ca subunitățile imobilizate să se dezactiveze în urma legării de suport prin resturile de aminoacizi din situsul activ. Acest lucru este improbabil dacă se utilizează pentru cuplare Sepharoză activată cu BrCN, deoarece legarea are loc relativ nespecific, cu unul sau mai multe resturi de lizină de pe suprafața proteinelor. Oricum, această posibilitate poate fi predominantă în experiențele în care se utilizează subunități solubile care pot fi inactivate previzibil, prin modificarea situsului activ. Dacă adăugarea unor subunități inactive, reactivitate

(prin renaturarea enzimei denaturate cu uree) la subunitățile in-
activatizate immobilizate duce la o creștere a interacțiilor dintre
ele, se poate trage concluzia că subunitățile immobilizate au de-
venit inactive prin modificarea unei grupări esențiale din situs
în urma cuplării cu Sepharoza. În acest fel s-au pus în evidență
monomerii inactivi, immobilizați ai glicogen-fosforilazei.

III.1.2. Investigarea structurii terțiare a proteinelor

Structura terțiară, tridimensională a proteinelor este deter-
minată de existența unor legături specifice (ionice, van der Waals,
punți de hidrogen, punți disulfurice) dintre structurile polipep-
tidice secundare.

Activitatea enzimatică este direct legată de acest tip de
structură. Astfel, s-a observat că denaturarea completă a molecu-
lei de ribonuclează A prin scindare reductivă sau ruperea punților
disulfurice din structura sa terțiară în prezență de uree 8M,
este însoțită de anularea activității sale enzimatică. Dacă agen-
tul reducător și ureea se îndepărtează, proteina redusă, inactivă,
suferă o oxidare spontană în soluție la pH slab alcalin, în aer,
cu reapariția activității enzimatică și a structurii cristalogra-
fice native.

Rezultate similare s-au obținut și cu alte proteine ce conțin
punți disulfurice (lizozimul din albușul de ou, fosfatasa din
Escherichia coli, Taka-amilaza A etc.).

S-au întâmpinat însă greutăți la încercarea de reoxidare a
unor proteaze denaturate prin reducere (tripsina, chimotripsina,
pepsina). S-a observat astfel că prin activarea proteolitică a
zimogenilor, proteazele rezultate nu au în mod obligatoriu
structura terțiară formată prin reoxidarea enzimelor denaturate
reductiv.

Ambele proteine pancreatice, chimotripsina și insulina există sub forma unui lanț proteic multiplu în starea lor biologică funcțională, ca rezultat al scindării proteolitice a precursorilor cu lanț simplu.

Lanțurile reduse de insulină nu se pot combina pentru a conduce la molecule funcționale în condițiile optime pentru reoxidarea grupelor -SH la legături -S-S-, pe când proinsulina denaturată reductiv se poate reoxida cu randament bun la asemenea structuri.

α - Chimotripsina denaturată, după diluare într-un mediu ce conține β -mercaptoetanol și o enzimă ce catalizează schimbul dintre grupele -SH și -S-S-, își recapătă activitatea foarte repede.

În mod analog cu cazul insulinei și proinsulinei s-a pus problema dacă zimogenul denaturat reductiv, chimotripsinogenul A, conține în secvența sa primară o informație, care explică reapariția activității enzimatice prin oxidarea sa spontană.

Pentru a demonstra această ipoteză, chimotripsinogenul A s-a denaturat reductiv cu β -mercaptoetanol în uree 8M, obținându-se o proteină ce conține 10 grupe SH per lanț polipeptidic. Soluția diluată a chimotripsinogenului redus s-a expus la aer după îndepărtarea agentului denaturant prin gelfiltrare sau dializă sau prin diluare. Probe luate din timp în timp s-au tratat cu tripsină și s-a determinat activitatea chimotripsinică. Maximul de activitate recuperată a fost de 1,4%. Prin contrast, denaturarea reductivă a chimotripsinogenului în condiții similare este complet reversibilă, recuperându-se activitatea chimotripsinică (prin activare cu tripsină) de 100%.

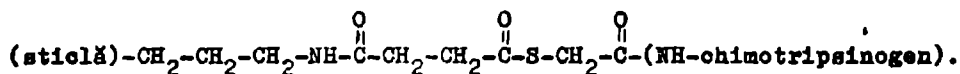
Imobilizând chimotripsinogenul prin legare covalentă pe un suport insolubil, s-a observat că după denaturarea reductivă a zimogenului urmată de oxidare, activitatea enzimatică se

recuperează în bună parte.

Aceste observații arată că zimogenul neimobilizat, denaturat reductiv și apoi reoxidat capătă o structură terțiară nespecifică, cu recuperarea doar a 1,4% din activitatea chimotripsinică.

În schimb, zimogenul immobilizat și tratat identic își recapătă activitatea enzimatică, deoarece immobilizarea împiedică apariția unor structuri terțiare nespecifice, efectele de microveșnicitate ale suportului neafectând interacțiile structurale din lanțul polipeptidic.

Pentru aceste determinări a fost ales ca suport sticla (perle) activată cu grupări succinamidopropilice și care s-a condensat cu chimotripsinogen A în prezența unei carbohidimide, obținându-se un aduct de forma:

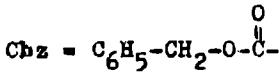
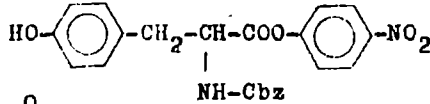


După immobilizare, s-a folosit ca agent reducător β -mercapto-
etanol, în soluție tampon (pH=8,6) în prezență de uree. Aductul
suport-chimotripsinogen A a fost folosit pentru umplerea unei co-
loane, peste care s-a trecut soluția reducătoare, în atmosferă de
N₂, la temperatura camerei. Sfârșitul reducerii se determină prin
titrarea grupelor -SH ale proteinei immobilizate.

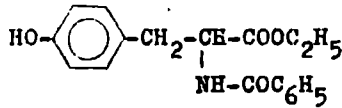
Reoxidarea chimotripsinogenului immobilizat, denaturat reduc-
tiv, s-a făcut în aer, prin spălarea coloanei cu o soluție tampon
cu pH = 8,6, 24 ore, la temperatura camerei, iar activarea cu o
soluție tamponată (pH = 7,8) de tripsină, timp de 2 ore. Activi-
tatea chimotripsinică a preparatului se determină față de diverse
substrate.

Se observă (în comparație cu activitatea zimogenului legat
pe suport și nedenaturat reductiv), o recuperare a activității
esterolitice de 76-80% față de esterul p-nitrofenolic al

N-Cbz-L-tirozinei:



și de 53% față de esterul etilic al N-benzoil-L-tirozinei:



Reactivarea prin oxidarea în aer are ca rezultat o activitate specifică față de oazeină de 30% față de enzima imobilizată, nedenaturată reductiv.

În concluzie, imobilizarea chimotripsinogenului A a permis studierea problemelor legate de regenerarea structurii terțiare, esențială pentru activitatea biocatalitică a enzimelor.

III.1.3. Metode de investigare a modificărilor conformaționale ale proteazelor imobilizate

Tehnica imobilizării enzimelor a permis investigarea modificărilor conformaționale reversibile ale proteinelor, determinate de agenți fizici (lumină, căldură), foarte importante pentru sistemele biologice, dat fiindcă activitatea fiziologică este legată de diferite structuri conformaționale posibile.

Modificările conformaționale reversibile ale proteinelor imobilizate au fost investigate din două puncte de vedere:

a) Studiul însemnătății lor funcționale (mecanismul modificărilor conformaționale, relația dintre structura terțiară și activitatea biologică, importanța acestor modificări în reglarea proceselor biologice). Aceste studii trebuie să ia în considerare

și posibilele perturbări ale parametrilor proteinelor și enzimelor ca rezultat al imobilizării.

b) Studul importanței lor aplicative (care dintre conformațiile active sau inactive ale enzimei sunt mai mult sau mai puțin stabilizate prin imobilizare, în comparație cu enzimele libere).

Aceste studii au folosit ca model proteazele.

Pentru investigații se pot folosi:

- metode statice de determinare a conformațiilor (studii de echilibru a unor sisteme complexe binare sau ternare de proteină cu molecule mici sau mari, spectroscopia de fluorescență, RES etc) care oferă informații asupra proteinelor legate, în condiții statice, dar nu și asupra proprietăților enzimatică ale aducătorilor;

- metode cinetice, care măsoară viteza unei reacții catalizate de enzimele imobilizate și denaturate în comparație cu cea a enzimelor libere, valorile K_m aparente fiind mult modificate prin imobilizare (vol.I, pag. 228).

Ca suporturi se folosesc diverse varietăți de Sephadex activat cu BrCN; s-au făcut studii ale modificărilor aduse de variația temperaturii asupra activității tripsinei și chimotripsinei.

Un domeniu atractiv îl constituie și hemoproteinele (mioglobina, hemoglobina, citocromii) care prezintă absorbții în spectrele electronice (UV și VIS), astfel încât modificarea conformației acestor proteine imobilizate poate fi urmărită spectrofotometric.

III.2. Aplicații în Chimia Analitică

Specificitatea enzimelor, ca și proprietatea lor de a cataliza reacții ale unor concentrații joase de substrat, le-au făcut atractive pentru Chimia Analitică.

Reacțiile catalizate de enzime se pot folosi în scopuri analitice pentru dozarea de substrat, activatori sau inhibitori. Totuși, utilizarea enzimelor pune și probleme specifice, care le limitează aplicabilitatea (instabilitatea, costul ridicat al separării și purificării etc.).

Instabilitatea enzimelor este un factor ce poate fi minimizat prin modificarea condițiilor de lucru. Procesele analitice continue sau semicontinue necesită mari cantități de enzime; dacă însă se folosesc enzime imobilizate, se pot realiza asemenea metode de analiză. Ca și enzimele native, solubile, biocatalizatorii imobilizați pot fi folosiți în condiții asemănătoare pentru determinarea și dozarea unor substrat, a inhibitorilor sau a activităților enzimatică.

Sensori enzimatici

Sensorii enzimatici reprezintă o aplicație importantă a biocatalizatorilor în potențiometrie.

Termenul de „electrod enzimatic” a fost introdus de către Ūpdike și Hicks (1967), care au acoperit un electrod polarografic de oxigen cu un strat de glucozoxidază inclusă fizic într-un gel de poliacrilamidă. Dispozitivul a fost folosit la măsurarea descreșterii presiunii oxigenului, care indică conținutul în glucoză din sânge și plasmă, termenul de răspuns al sensorului fiind de sub un minut.

Termenul (mai corect) de „sensor enzimatic” se referă la o combinație între un electrod ion-selectiv și o enzimă, liberă sau imobilizată fizic (prin includere) sau chimic.

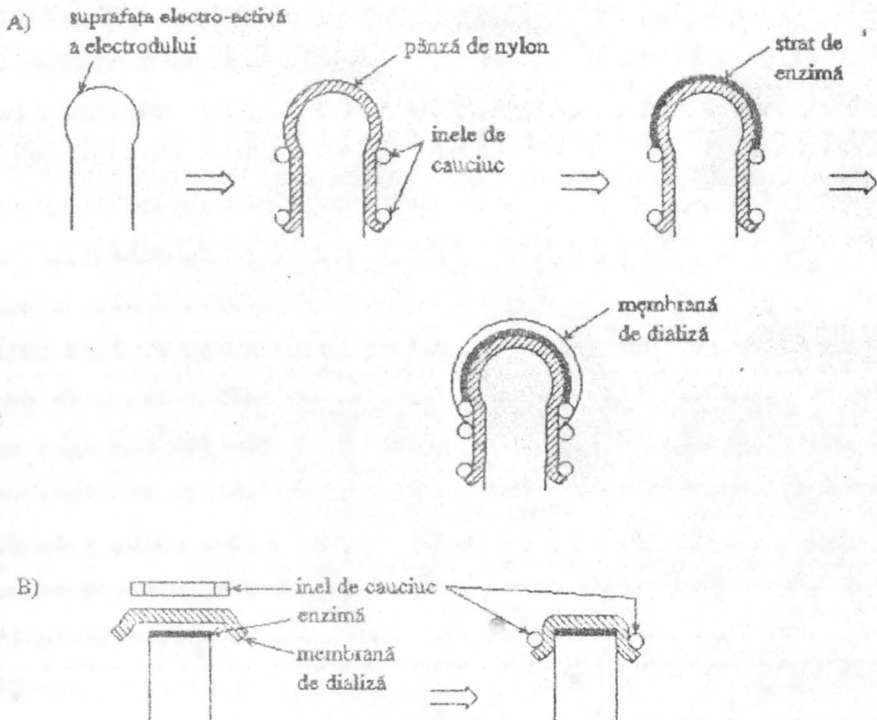
III.2.1. Variante constructive ale senzorilor enzimatici

Principiul constructiv al unui asemenea sensor este foarte simplu: se alege o enzimă care prezintă o mare specificitate sau

selectivitate în raport cu compusul (substratul) ce urmează a fi analizat. Această enzimă este apoi imobilizată (insolubilizată) pe un suport, după care este depusă pe un electrod ion-selectiv, care va măsura fie produsul de reacție (NH_3 din uree sau acidul dintr-o penicilină), fie reactantul consumat (oxigenul pentru oxidarea glucozei sau a acidului uric). În fig. nr. 25 sunt reprezentate două variante constructive pentru obținerea senzorilor enzimatici cu enzime incluse fizic (A) sau cu enzime solubile sau imobilizate chimic (B).

Fig. nr. 25

Schema unor senzori enzimatici



Tipul A (fig. nr. 25. se folosește pentru enzime incluse fizic pe suprafața unor polimeri sintetici. Suprafața electroactivă a electrodului se acoperă cu o pânză de nylon (cu grosime de aproximativ $90 \mu\text{m}$), care se fixează cu un inel de cauciuc pe corpul electrodului.

Aductul enzimă-suport se prepară sub formă de gel, amestecând 0,1 g enzimă (de puritate 10-15 unități/mg) cu 1,0 ml soluție de gel preparat din: 1,15 g N,N'-metilenbisaorilamidă + 6,06 g acrilamidă + 5,5 g persulfat de potasiu + 5,5 mg riboflavină în 50 ml apă.

Gelul omogen astfel obținut se pulverizează în strat subțire, peste pânza de nylon, în așa fel încât interstițiile acestuia să fie acoperite. 1 ml din acest amestec se poate folosi pentru a acoperi șase electrozi. Electrocul se plasează apoi într-o celulă spălată cu azot și răcită la $0-5^{\circ}\text{C}$ cu ajutorul unei mantale de apă.

În tot cursul polimerizării se circulează prin celulă azot, pentru îndepărtarea oxigenului (inhibitor de polimerizare). Pentru ca polimerizarea să fie completă, se iradiază electrocul timp de 1 oră, cu un proiector Westinghouse de 150 W. După polimerizare stratul enzimatic se întărește. Se aplică deasupra o membrană de dializă (celofan cu grosimea de 20-30 μm) care se fixează pe corpul electrodului cu al doilea inel de cauciuc.

Senzorul obținut se lasă peste noapte într-o soluție tampon pentru îmbibarea stratului enzimatic și pentru eliminarea bulelor de aer. Între două determinări, senzorul se păstrează în soluție tampon.

Tipul B (fig. nr. 25.) este un electrod cu membrană de dializă, care poate fi folosit fie pentru enzime libere, fie imobilizate fizic (prin includere) sau chimic.

Enzima liberă sau în prealabil imobilizată se usucă și se transformă în pulbere. Se poate aplica direct pulberea pe suprafața electrodului; o altă variantă folosește un gel enzimatic apos pulverizat sau aplicat în strat subțire, cu spatula, pe electrod, după care se acoperă cu o membrană de dializă (celofan) asigurată cu un inel de cauciuc. Electrocul obținut se plasează peste noapte într-o soluție tampon. Intre două întrebuințări, se păstrează de asemenea în soluție tampon.

Se cunosc și tipul C de senzor enzimatic, care se bazează pe polimerizarea directă pe un electrod cu membrană de difuzie a gazelor. Asemenea dispozitive se pot obține plasând direct enzima pe suprafața electrodului, prin legare fizică (pe electrodul de sticlă) sau chimică cu formare de legături covalente electrod-enzimă. De exemplu, un electrod de NH_3 se poate obține prin plasarea a 0,1 ml soluție de urează (0,5%) pe suprafața unei membrane de difuzie a gazului. Membrana se lasă să stea 12 ore la 4°C pentru evaporarea solventului, după care se adaugă o soluție de glutaraldehidă (2,5% în tampon fosfat, pH = 6,2). Are loc o rețiculare a enzimei pe suprafața electrodului.

După un repaos de 1,5 ore la 4°C , membrana se spală cu apă pentru a îndepărta enzima liberă și tamponul.

Dintre cele trei tipuri descrise, cel mai frecvent se folosește tipul (A) de senzor enzimatic, pentru care enzimele imobilizate chimic prezintă o mare termostabilitate. Tipul (B) de membrană este ușor de obținut, dar necesită un timp mai îndelungat de pregătire. Are o stabilitate maximă de 3-4 săptămâni, la 50-100 determinări succesive. Tipul (C) de senzor este mai puțin utilizat. În cazul senzorilor de tip (A) și (B), stratul enzimatic poate fi ușor înlocuit după dezactivare, păstrând electrodul, în timp ce în cazul tipului (C) electrodul rămâne

blocat prin legarea directă ou enzima.

Așadar, un sensor enzimatic implică o enzimă cuplată cu un electrod ion-selectiv. In cele ce urmează se vor face unele considerații generale asupra celor două componente ale senzorului.

III.2.1.1. Electrozi ion-selectivi

Una dintre determinările analitice cele mai frecvente este cea a pH-ului. Un dispozitiv banal pentru acest scop este format dintr-un electrod de sticlă, selectiv pentru H^+ , un electrod de referință și un pH-metru.

Se cunosc și electrozi selectivi pentru alți ioni sau specii moleculare, a căror aplicabilitate analitică generală este de 10^{-1} - 10^{-5} M și chiar pentru concentrații mai mici. Deoarece răspunsul electrozilor ion-selectivi este logaritmice, precizia măsurătorilor este constantă în tot intervalul de aplicabilitate.

In tabelul Nr. 17 sunt indicați cei mai importanți electrozi comerciali.

Tabelul Nr. 17

Electrozi comerciali uzuali

Cationi	Anioni	Gaze
1	2	3
NH_4^+ G, S, L ^{xx}	Brom S	CO_2
Hidrogen G	Clor S, L	NH_3
Cadmium S	Cian S	NO_2
Calciu L	Fluoroborat L	SO_2
Cupru S	Hidroxid G	H_2S

Tabelul nr. 17 (continuare)

1		2		3
Ioni divalenți	L	Iod	S	HCN
Plumb	S	Azotat	L	HP
Ioni monovalenți	G	Perclorat	L	O ₂
Potasiu	G, S, L	Sulfură	S	
Argint	G, S	Tiocianat	S	
Sodiu	G, L			
Rubidiu	L			

* G = sticlă; S = membrane solide; L = membrane lichide

Cu excepția electrodului de F^- în monocristal și a electrozilor de sticlă, toți ceilalți electrozi pot fi preparați cu ușurință, cu minimum de timp și efort.

Un electrod ion-selectiv poate fi definit ca un dispozitiv care dezvoltă un potențial de electrod proporțional cu logaritmul activității unui ion în soluție. Termenul „specific” indică faptul că electrodul corespunde strict unui singur ion.

Dacă răspunsul electrodului nu este legat de un singur ion ci de mai mulți, termenul corect este „ion-selectiv”.

În general, pentru construirea senzorilor enzimatici pot fi folosiți:

- Electrozi de sticlă (pentru ionul H^+ și cationi monovalenți)
- Electrozi de gaz (pentru: NH_3 , CO_2 sau O_2 consumați sau degajați într-o reacție)
- Electrozi solizi cu membrane solid-lichid (pentru: NH_4^+ , S^{2-} , CN^- , I^-).
- Electrozi de platină (pentru determinarea O_2 , NH_3 sau CO_2)

III:2.1.2. Alegerea biocatalizatorului și a metodei de imobilizare

Pentru obținerea senzorilor enzimatici se preferă două dintre metodele de imobilizare a enzimelor:

a) Legarea covalentă pe suport prin intermediul unor grăpări reactive insolubilizante.

Principalul dezavantaj al metodei este posibilitatea blocării ireversibile a unei părți a situsului reactiv al enzimei, cu scăderea corespunzătoare a activității sale biocatalitice. Metoda imobilizării chimice se va folosi în cazul substratelor cu masă moleculară mare (proteine).

b) Includerea fizică a enzimelor într-un suport inert, ca amidonul sau gelurile polimere sintetice (mai ales pe bază de poliorilamidă).

Această metodă prezintă avantajul unei preparări mai ușoare în comparație cu metodele chimice (excepând reticularea cu glutaraldehida). În cazul includerii se vor obține în general molecule mari, pe când în cazul imobilizării covalente se obțin molecule de toate mărimile. Metoda includerii în geluri este folosită pentru substrat sau molecule mici (ca ureea).

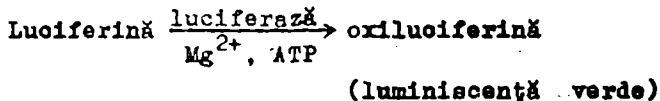
În ceea ce privește stabilitatea operațională a preparatelor, se observă că enzimele imobilizate chimic pot fi folosite la câteva mii de determinări succesive, pe când cele imobilizate fizic de la o sută la câteva sute de determinări.

III-2.1.3. Enzima ca reactiv analitic

Enzimele pot prezenta o specificitate de substrat și de reacție diferită.

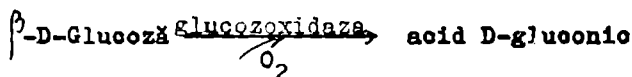
Un exemplu de specificitate a enzimei pentru un anumit substrat este luciferaza, care catalizează oxidarea luciferinei

la oxiluciferină:



Modificând chimic substratul (luciferina) nu se mai observă apariția luminiscentei verzi, ceea ce denotă că luciferaza catalizează numai conversia luciferinei.

Alt exemplu de specificitate este glucozoxidaza, care catalizează oxidarea β -D-glucozei:



Un studiu complet făcut asupra a 60 zaharuri oxidabile și a unor derivați ai acestora a arătat că numai 2-dezoxi-D-glucoza se oxidează cu o viteză comparabilă cu cea a β -D-glucozei: α -D-Glucoza este oxidată în proporție de sub 1% în comparație cu anomerul β .

O specificitate absolută de substrat o prezintă ureaza, care catalizează doar hidroliza ureei.

Pentru construcția sensorilor enzimatici comerciali se folosește un număr relativ redus de enzime immobilizate, printre care mai ales: catalaza, chimotripsina, glucozoxidaza, papaia, tripsina, ribonucleaza, ureaza.

Condițiile generale pe care trebuie să le îndeplinească enzimele pentru a fi folosite la obținerea unor senzori enzimatici sunt:

- să aibă specificitate pentru substanțele care trebuie analizate;

- să fie izolate într-o stare de puritate analitică (se utilizează o sursă comercială sau se izolează și se purifică în laborator);

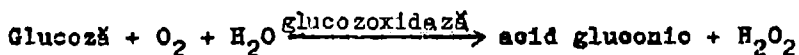
- tehnica de imobilizare să fie standardizată sau cât mai ușor realizabilă;

- să se plaseze fiecare enzimă imobilizată pe un electrod corespunzător reacției care are loc.

III.2.2. Exemple de utilizare a sensorilor enzimatici

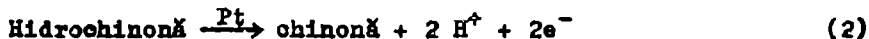
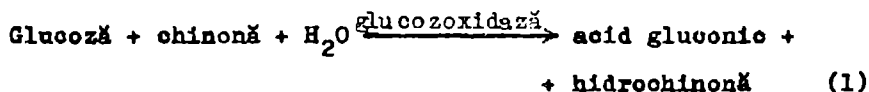
III.2.2.1. Sensori pentru glucoză

După cum am amintit mai sus (pag.116) primul sensor enzimatic a fost folosit în 1967 de S.J.Updike și G.P.Hicks, care au acoperit un electrod de oxigen polarografic cu un polimer gelatinos de poliacrilamidă având inclusă fizic glucozoxidaza. Acest sensor a fost folosit la studiul reacției de oxidare a glucozei:



Descreșterea presiunii O_2 este echivalentă cu conținutul în glucoză al probei de sânge sau plasmă. Ei au găsit că relația lineară dintre concentrația glucozei și consumul de oxigen se plasează sub valoarea K_m a enzimei.

Williams, Doig și Korosi utilizează chinona ca acceptor de hidrogen în locul oxigenului pentru un electrod ce servește la dozarea glucozei din sânge:



($E = 0,4 \text{ V}$ față de electrodul standard de calomel)

Utilizând glucozoxidaza inclusă într-un strat poros sau gelificat (acoperit cu o membrană de dializă) depus pe un electrod

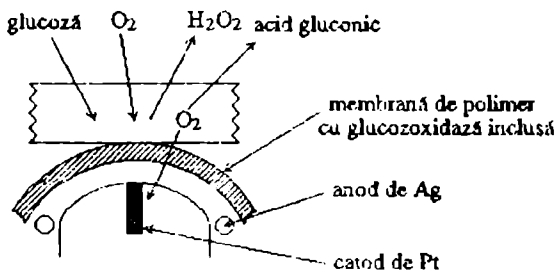
de platină, se poate determina glucoza monitorizând electrooxidarea hidrochinonei.

Un sensor simplu și cu răspuns rapid pentru glucoză, a fost construit de Guilbault și Lubrano. Sensorul este format dintr-un strat metalic (Pt sau Pt pe sticlă) acoperit cu un film subțire de glucozoxidază imobilizată, protejat de un strat de celofan. Aplicând un potențial corect, curentul produs este proporțional cu concentrația glucozei. Timpul de determinare este de sub 12 secunde. Sensorul rămâne operațional timp de un an, dacă este păstrat la temperatura camerei.

În fig. nr. 26 este schematizat un asemenea sensor enzimatic pentru determinarea glucozei.

Fig. nr. 26

Mod de funcționare a unui sensor enzimatic cu catod de Pt pentru dozarea glucozei



O variantă constructivă a senzorilor cu membrane de glucozoxidază imobilizată într-un film de polimer a fost propusă în 1990 de Almeida, Wingard și Malmros. Se pot folosi electrozi

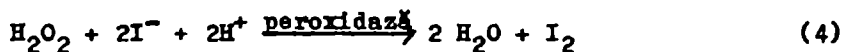
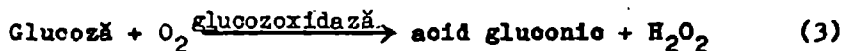
confeționați din sticlă și acoperiți cu un strat de crom (cu grosimea de 100 Å) sau de aur (cu grosimea de 2000 Å).

Glucozoxidaza se imobilizează în filme de poli-m-fenilendiamină, formate prin electropolimerizarea potențiostatică a monomerului pe suprafața sticlei acoperită cu aur, agitând moderat soluția de glucozoxidază dezoxigenată în tampon fosfat.

Potențialul de electrod se menține la +0,622 V [(față de Ag/AgCl (1 M KCl) - electrod de referință)] timp de 15 minute.

După electropolimerizare, filmele se clătesc prin introducerea într-o soluție tampon fosfat (pH=6) și agitare blândă, 15 minute, pentru îndepărtarea enzimei nelegate și a monomerului nereacționat. Filmele astfel obținute se păstrează în tampon fosfat (pH=6), la 25°C. Se observă oă activitatea enzimei imobilizate crește cu creșterea concentrației enzimei din soluția utilizată la electropolimerizare.

Nagy, von Storp și Guilbault descriu un sensor pentru glucoză bazat pe un electrod cu membrană de iod.



Determinarea glucozei se face cu un substrat staționar și cu un debit continuu de glucoză. Proba de sânge se tratează în prealabil, pentru a se îndepărta agenții de reducere competitivă (acid ascorbic, acid uric, acid tirazinic).

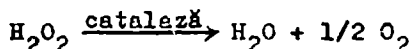
III.2.2.2. Sensori enzimatici de pH

În 1973 Nilsson, Åkerlund și Mosbach au propus utilizarea unui electrod de sticlă obișnuit pentru ioni de hidrogen la

prepararea senzorilor enzimatici de pH, prin depunerea pe electrod a unui strat de enzimă inclusă în gel de poliacrilamidă sau a unui strat lichid protejat de o membrană de celofan. Se măsoară astfel cantitatea de acid gluconic rezultată din oxidarea glucozei, variația pH-ului fiind aproape lineară la concentrații de 10^{-4} - 10^{-3} M în glucoză.

Pe acest principiu se construiesc și senzorii pentru uree și penicilină.

Pentru determinarea glucozei se poate utiliza și un electrod de sticlă (electrod de pH) cu glucozoxidază și catalază; aceasta din urmă catalizând descompunerea apei oxigenate rezultate din oxidarea glucozei (reacția 3, pag.126):

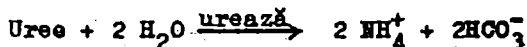


Pentru obținerea sensorului se impregnează cu un amestec de glucozoxidază și catalază în apă o membrană de filtrare care se tratează apoi cu glutaraldehidă.

După spălare, membrana cu enzimele immobilizate se înfășoară pe bulbul electrodului de sticlă și se asigură cu un inel de cauciuc, după care se introduce într-o soluție tampon 0,1 M Na_2SO_4 cu pH = 6,9.

III.2.2.3. Senzori pentru uree

În 1969 și 1970 Guilbault și Montalvo au preparat senzori pentru uree prin includerea fizică a urezei în gel de poliacrilamidă, după care membrana obținută s-a aplicat pe suprafața unui electrod de cation monovalent și s-a acoperit cu un film de celofan.



Ureea difuzează în stratul de urează și se formează ionul NH_4^+ care este determinat de electrod. Sensorul astfel obținut rămâne operațional timp de 3 săptămâni fără a-și diminua activitatea și are un răspuns pentru un interval de concentrații de $5 \cdot 10^{-5}$ - $1,6 \cdot 10^{-1}$ M, în timp de 35 secunde.

Inconvenientul acestei metode este posibilitatea ionilor K^+ și Na^+ de a interfera în cursul determinărilor. De aceea, Guibault și Hrabankova au utilizat un electrod de NH_4^+ neacooperit ca electrod de referință față de electrodul de NH_4^+ acoperit cu membrana suport-enzimă și au adăugat o rășină schimbătoare de ioni. Se obține un sensor de mare precizie și acuratețe, folosit pentru dozarea ureei din sânge și urină.

Pentru a mări selectivitatea determinării ureei, se poate folosi și un electrod ion-selectiv pentru NH_4^+ bazat pe cauciuc siliconic (inert). Coeficientul de selectivitate pentru acest electrod este de 6,5 pentru NH_4^+ față de K^+ și de $7,5 \cdot 10^2$ pentru KH_4^+ față de Na^+ .

Folosind urează legată chimic de un gel poliacrilic, Guibault, Nagy și Xuan au construit un sistem format din trei electrozi, care diminuează mult efectul de interferență cu alți cationi monovalenți. Sensorul enzimatic este stabil patru luni la 4°C și dă rezultate bune (comparabile cu cele obținute prin metodele spectrofotometrice).

Tot în scopul măririi selectivității acestui tip de sensor, Anfalt, Granelli și Jagner au reticulat ureaza direct pe suprafața unui electrod de sticlă Orion pentru amoniac gazos, cu ajutorul glutaraldehidei. Cantități suficiente de NH_3 se formează în urma reacției ce are loc în stratul enzimatic la pH sub 7-8,

timpul de răspuns fiind de 2-4 minute în prezența unor concentrații înalte de ioni Na^+ și K^+ .

Cel mai bun sensor , total lipsit de efecte de interferență se poate obține dintr-un strat fin de urează immobilizată chimic pe acid poliacriliic depus pe un electrod cu perforații pentru aer. Ureca difuzează în gel, iar NH_3 format difuzează la suprafața electrodului perforat, care-l măsoară. Sensorul poate fi folosit continuu timp de o lună (pentru cel puțin 500 probe) la determinarea ureei din serul sanguin. Durata determinării este de 2-4 minute la $\text{pH} = 6,5$. Nu interferează absolut de loc cu alți componenți ai sângelui (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , acid ascorbic etc.).

Mosbach și colaboratorii au descris un sensor cu urează pentru determinarea pH -ului și a tăriei ionice în soluție. Ureaza este inclusă fizic și cupiată cu un electrod de sticlă. Timpul de răspuns este de 5-10 minute. Sensorul poate fi păstrat la temperatura camerei 2-3 săptămâni.

O altă variantă a unui sensor pentru uree folosește un electrod de CO_2 pentru a măsura produsul secundar al reacției uree-urează (HCO_3^-).

Utilizând un sensor de uree, preparat prin combinarea unui strat de urează acoperită cu o membrană de dializă cu un electrod de CO_2 , se obțin bune rezultate pentru dozarea unor concentrații de 10^{-4} - 10^{-1} M uree, cu un timp de răspuns de 1-3 minute și cu un slab efect al acidului acetic, Na^+ și K^+ care nu interferează.

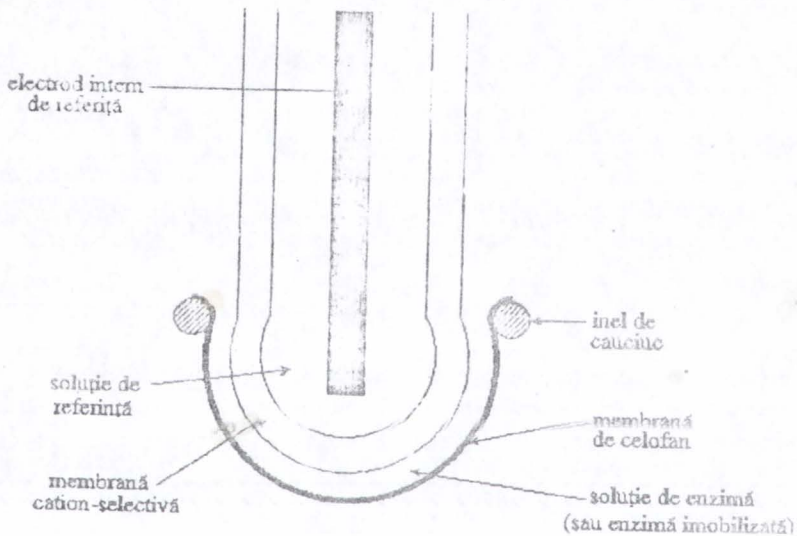
III.2.2.4. Sensori pentru aminoacizi

Sensorul pentru CO_2 construit de Guilbault și Shu poate fi utilizat pentru dozarea tirozinei, dacă se folosește tirozin-decarboxilaza immobilizată pe o membrană de dializă.

Senzorii enzimatici pentru α -aminoacizi au fost studiați și perfecționați de Guilbault și Hrabankova, care au plasat un strat de L-aminoacid-oxidază pe un electrod pentru cationi monovalenți, pentru a determina ionul NH_4^+ format prin oxidarea enzimatică a aminoacizilor (fig. nr. 27). Acești senzori sunt stabili două săptămâni, cu un timp de determinare de 1-2 minute.

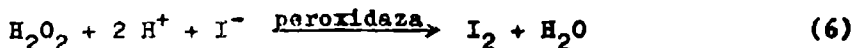
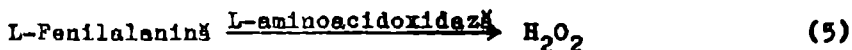
Fig. nr. 27

Senzor cu L-aminoacidoxidază și membrană de celofan



Astfel, pentru L-fenilalanină s-au preparat două variante de senzori enzimatici:

— Un tip de sensor folosește două straturi de enzime (L-aminoacid-oxidaza și peroxidaza din hreșn) incluse în două straturi de gel de poliacrilamidă și depuse pe un electrod ion-selectiv, care răspunde la scăderea activității ionului I^- de la suprafața electrodului, datorită oxidării sale enzimatică ulterioară:

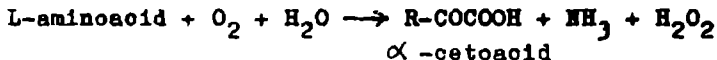


— Alt sensor este bazat pe un electrod ion-selectiv de amoniu din cauciuc-siliconic, acoperit cu L-aminoacidoxidază inclusă în gel poliacrilic.

Substratul difuzează în stratul de gel unde are loc reacția cu eliminare de NH_4^+ .

Se pot determina L-leucina și L-metionina în concentrații de 10^{-4} - 10^{-3} M.

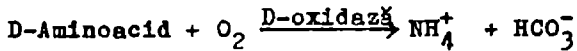
Un sensor enzimatic pentru L-aminoacizi a fost obținut și prin depunerea pe un electrod de Pt a unui strat de L-aminoacid-oxidază cuplată chimic pe un suport (fig. nr. 27). Se determină H_2O_2 format din reacție:



În acest fel s-au dozat: cisteina, leucina, tirozina, fenilalanina, triptofanul și metionina.

D-aminoacizii se pot determina cu ajutorul unor senzori specifici, care folosesc D-aminoacid-oxidazele.

Ionul NH_4^+ se dozează cu ajutorul unui electrod de cationi:

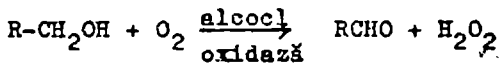


Stabilitatea acestor senzori poate fi menținută 21 de zile dacă sunt păstrați într-o soluție tamponată de flavin-adenin-dinuucleotidă (FAD) care se leagă la situsul activ al enzimei, protejându-l. Asemenea senzori se folosesc pentru determinarea D-fenilalaninei, D-alaninei, D-valinei, D-metioninei, D-leucinei, D-norleucinei și D-izoleucinei.

Pentru asparagină se utilizează un sensor cu asparaginază, nefiind necesar un cofactor.

III.2.2.5. Senzori pentru alcooli

Alcool-oxidaza catalizează oxidarea alcoolilor alifatici inferiori:



H_2O_2 rezultată din reacție se poate determina amperometric cu un electrod de platină asemănător cu cel descris mai sus pentru glucoză. Metoda a fost aplicată pentru determinarea alcoolului etilic din sânge. Metanolul produce o interferență puternică, alcooloxidaza reacționând mai rapid cu acesta decât cu etanolul. Un sensor cu înaltă selectivitate, descris de Guibault și Naujo măsoară descreșterea concentrației de oxigen din soluție.

III.2.2.6. Sensori pentru acid uric

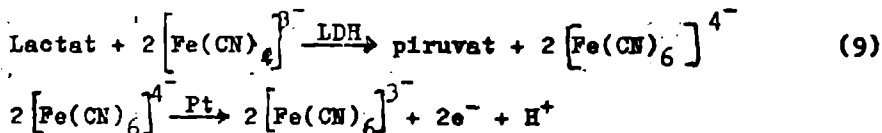
Un sensor cu răspuns rapid pentru acidul uric se prepară prin plasarea unui strat de uricoază reticulată cu glutaraldehidă pe un electrod de Pt Beckman; stratul enzimatic este protejat cu o membrană de dializă. Se măsoară desoreșterea concentrației de O_2 din soluție:



Curentul înregistrat este proporțional cu cantitatea de acid uric pentru concentrații de 10^{-5} - 10^{-1} M. Timp de răspuns = 30 secunda.

III.2.2.7. Sensori pentru acid lactic

Williams, Doig și Korcsi au folosit fericianura ca acceptor de hidrogen pentru determinarea acidului lactic, cu un sensor bazat pe următoarele ecuații:



Se folosește un electrod de Pt acoperit cu un strat poros sau gelificat de lactatdehidrogenază și o membrană de dializă.

Durata determinării este de 3-10 minute. Pentru că această enzimă are o valoare K_m scăzută ($K_m = 1,2 \cdot 10^{-3}$ M), este necesară diluarea probei cu fericianură tamponată. Se obține o variație liniară a curentului măsurat pentru concentrații de 10^{-4} - 10^{-3} M acid lactic.

III.2.2.8. Sensori pentru amigdalină

Un sensor enzimatic specific pentru dozarea amigdalinei este compus dintr-un electrod solid pentru ionul CN^- peste care se depune un strat de gel de poliacrilamidă cu β -glucozidază inclusă fizic:



Durata determinării este de 10 minute pentru concentrații de substrat de 10^{-2} - 10^{-3} M și de 30 minute pentru concentrații de 10^{-4} - 10^{-5} M la pH = 10,4, la care enzima are o activitate redusă.

O modificare care permite o îmbunătățire a sensibilității metodei folosește un sensor preparat prin pulverizarea enzimei direct pe suprafețele membranei de polimer urmată de scoaperea acesteia cu o membrană de dializă.

Enzima nefiind imobilizată stabilitatea sensorului este mai mică, dar durata determinării se reduce la 1-2 minute pentru concentrații de 10^{-1} - 10^{-3} M și la 6 minute pentru concentrații de amigdalină mai mici (10^{-4} M).

III.2.2.9. Sensori pentru penicilină

Primul design al unui biosensor pentru penicilină aparține lui Papariello, Mukherji și Shearer (1973). Sensorul a fost preparat prin imobilizarea penicilin- β -lactamazei (penicilinazei) într-o membrană subțire de gel de poliacrilamidă aplicată în jurul unui electrod de sticlă pentru ioni H^+ . Se măsoară creșterea concentrației în ioni H^+ rezultați prin formarea acidului 6-aminopenicililic:

Penicilina $\xrightarrow[H_2O]{\text{penicilinază}}$ acid 6-aminopenicilanic

Durata determinării este de < 30 secunde pentru o concentrație de $5 \cdot 10^{-2} - 10^{-4} M$ ampicilină sodică. Reproducibilitatea sensorului este redusă.

Kosbach și colaboratorii propun pentru penicilină un sensor obținut prin includerea penicilinazei într-un strat lichid protejat cu o membrană de celofan și aplicat pe un electrod de sticlă (de H^+). Tăria ionică se controlează în soluție tampon-fosfat (pH= 6,8), conținând NaCl. Sensorul poate rămâne operațional timp de 3 săptămâni.

Acest model de sensor a fost îmbunătățit ulterior, prin plasarea unei membrane între stratul enzimatic și electrodul de sticlă.

III.2.3. Sensori cu substrat pentru dozarea enzimelor

Sensorii pentru dozarea enzimelor folosesc substrat „imobilizate”. Asemenea senzori prezintă două mari dezavantaje:

- substratul se folosește doar pentru o singură determinare;
- enzima neconsumată din soluție, continuă să acționeze asupra substratului.

J.G.Montalvo a pus primul la punct un sensor pentru urează, obținut prin trecerea continuă a substratului de uree solubilă peste un electrod selectiv pentru cationul NH_4^+ și printr-o membrană de dializă. Ureea difuzează prin membrană și este hidrolizată de ureaza aflată într-o soluție apoasă diluată. Ionul NH_4^+ traversează în sens invers membrane spre electrod.

În alte studii s-a propus un sensor pentru dozarea colin-esterazei din ser, prin cuplarea unui electrod de pH cu o

membrană subțire formată dintr-un polimer cu masă moleculară scăzută. Sensorul utilizează două straturi subțiri de soluții, care formează o celulă microelectrochimică.

Unul din straturi conține serul de analizat iar al doilea substratul de acetilcolină în prezența unui tampon cu masă moleculară mare.

Un dispozitiv mai practic cu substrat pentru colinesterază a fost realizat de Gibson și Guilbault (1974) care au plasat acetilcolina pe un electrod de pH acoperit cu o pânză de nylon permeabilă pentru enzimă. Enzima difuzează la stratul de acetilcolină care se transformă în acid acetic:

Acetilcolină Colinesterază → Acid acetic + Colină

III. 2.4. Tendințe și orientări în utilizarea biosensibilizatorilor în biochimie

Majoritatea dispozitivelor cu biosensibilizatori pot fi clasificate în două categorii, în funcție de scopurile în care sunt folosite:

- pentru identificarea unor structuri moleculare și
- pentru transformarea rezultatului analizei într-un semnal măsurabil (traducție).

Materiale biologice ca: enzime, anticorpi, porțiuni de țesuturi sau grupe de celule și mai recent bioreceptori se utilizează ca elemente de legare (liganzi) pentru moleculele analizate.

Legarea selectivă a compușilor de analizat de către liganzii biologici se bazează pe selectivitatea acestora din urmă.

Elementul de traducție nu include de obicei materiale biologice, dar utilizează conversia reacției selective a compusului

analizat în modificări chimice sau fizice, transpuse într-un semnal proporțional cu intensitatea acestora.

Cele două elemente care caracterizează asemenea biosenzori sunt sumarizate în tabelul nr. 18.

Tabelul Nr. 18

Elementele principale ale biosenzorilor

Materiale biologice pentru identificarea unor structuri moleculare
Enzime Anticorpi Receptori Organite celulare Fragmente de țesuturi
Traductori
Electrochimici Optici Termici Piezoelectriici

Majoritatea tipurilor de biosenzori enzimatici bazați pe traducție electrochimică și o parte din biosenzorii optici cu enzime, anticorpi sau lecitină au cunoscut o mare dezvoltare și aplicare în practică. Tendințele actuale propun utilizarea receptorilor de proteine ca liganzi biologici pentru construcția biosenzorilor.

În tabelul nr. 19 sunt sumarizate principalele tipuri de

biosensori folosiți astăzi pe cale largă.

Tabelul Nr. 19

Principalele tipuri de biosensori

Tipul	Traductor bazat pe:
Cu înaltă sensibilitate (pentru concentrații de $\leq 10^{-12}$ - 10^{-10} M)	Fluorescență Luminiscentă Electrochimic/Electronic
Electrochimic/Electric	Amperometric Piezoelectric (modifi- Potențiometric care de fază sau de Conductivitate frecvență) Capacitanță Tranzistor cu efect de câmp
Optic	Absorbantă (VIS sau UV) Tehnici cu fibre optice Fluorescență sau luminiscentă
Termic	Termistori (diferențe de temperatură de $\sim 10^{-5}$ grade)

Tendențele actuale sunt de extindere pentru metodele bazate pe traductori de tip amperometric, electric (efectul de câmp), piezoelectric și fibre optice combinate cu tehnicile de fluorescență.

III.2.4.1. Tipuri moderne de traductori

A. Una din tendințele utilizate foarte mult se bazează pe înalta selectivitate și sensibilitate ale senzorilor enzimatici amperometrici. Este cel mai frecvent mod de traducție.

Cele mai eficiente rămân tehnicile bazate pe transferul de electroni cu ajutorul oxidoreductazelor care permit utilizarea unor transportori de hidrogen solubili. În această categorie se înscriu cu succes biosenzorii cu glucozoxidază.

În 1988, cercetările de laborator au arătat o diminuare a vitezei de transfer a electronilor pentru glucozoxidaza imobilizată, în prezența unei sări anorganice bună conducătoare- tetra-cianochino-dimetan (TCNQ) pe un electrod metalic, propunându-se astfel un nou suport, conducător de electroni, pentru enzimă. S-a constatat că efectul TCNQ este determinat de acțiunea sa asupra mediatorului (transportorul de hidrogen, cofactorul). S-a anticipat astfel ideea utilizării ca suport pentru imobilizarea enzimei a unor polimeri conducători de electroni ca polipirol sau polianilină care ar putea încetini viteza transferului de electroni. Dacă cofactorul este și el imobilizat, diminuarea vitezei de transfer a electronilor de la substrat la electrod via cofactor, decurge prin același mecanism ca și în cazul în care cofactorul este folosit în soluție.

În acest fel se pot construi biosenzorii cu enzime și cofactori co-imobilizați, deosebit de eficienți.

B. O altă cale modernă de construcție a unor biosenzorii extrem de sensibili se bazează pe tranzistorii cu efect de câmp în care o enzimă sau o altă proteină modulează potențialul sau o altă variabilă a tranzistorului.

Problemele puse de utilizarea acestei metode sunt legate de mărimea (nivelul) măsurătorii și de dificultatea de a se atinge un grad înalt al reproductibilității măsurătorilor.

Dispozitivele de acest tip cu enzime sau enzime-anticorpi se utilizează doar o singură dată. Fiecare dispozitiv cu enzimă sau cu anticorp trebuie testat și calibrat în prealabil; metoda

nu poate fi extinsă datorită costului ridicat și al reproductibilității reduse. Ea se aplică mai ales în scopuri clinice, pentru cazuri critice și de urgență.

C. Efectul piezoelectric reprezintă altă cale de conversie a reacției selective a compusului de analizat într-un semnal, fiind cea de a treia tendință modernă de utilizare a biosensurilor. În acest scop, compusul biologic (substratul) este imobilizat pe un cristal de cuarț care este apoi stimulat electric pentru a se produce oscilația cristalului. O modificare a masei materialului imobilizat pe cristal (în urma unor reacții) determină deplasări măsurabile ale frecvenței de oscilație. Mărimea deplasării frecvenței depinde de concentrația analizatului din soluția testată.

Un dispozitiv modificat, cu sensibilitate crescută, care se poate folosi pentru analizarea unor probe de gaz sau lichid se bazează pe conversia semnalului într-unul acustic. Totuși dispozitivele rămân prohibitive deoarece se folosesc doar pentru o singură determinare, nefiind regenerabile.

D. Metodele care utilizează fibrele optice operează după principiul reflectanței interne combinate cu detecția în fluorescență. Un asemenea biosensor optic are o sensibilitate de $6 \cdot 10^{-12} M$ pentru feritina din ser.

III.2.4.2. Bioreceptori

O metodă cu o înaltă sensibilitate, care nu se poate atinge cu dispozitivele bazate pe relația dintre reacția chimică (biocatalizată) a analizatului și răspunsurile traductorilor folosește neuroreceptorii.

În tabelul nr. 20 sunt sumarizate o parte din tipurile și subtipurile de neuroreceptori. Neuroreceptorii sunt proteine

din membranele celulare, extinse atât în spațiile intra- cât și extracelulare. Ei acționează în transmiterea comunicării de la celulă la celulă. Impulsurile necesare (ca și alte semnale) se petrec printr-o transmisie endogenă la terminația celulei.

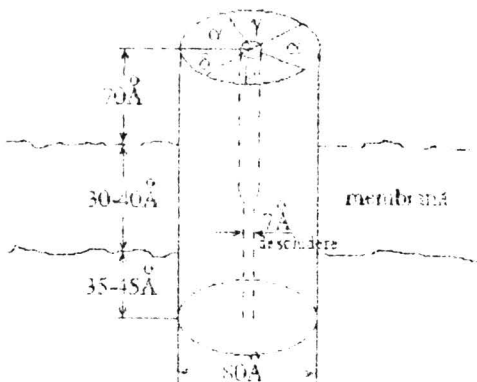
Transmițătorii difuzează impulsul din punctul de lansare, la celulele învecinate prin sinapsă. Legarea transmițătorului chimic de centrul receptorilor următori de pe partea extracelulară a membranei celulei trimite un mesaj prin membrana celulară pentru a iniția sau diminua acțiunea semnalului celular. În acest fel are loc comunicarea celulară.

Receptorii din membrană au configurația unor canale ce conțin 1-5 subunități, fiecare subunitate având dimensiuni cuprinse între 50.000 și 100.000 daltoni. O subunitate este formată dintr-un singur lanț de aminoacizi care traversează membrana într-o anumită perioadă de timp.

În figura nr. 28 este schematizat un neuron receptor colinergic nicotinic (acetilcolină).

Fig. Nr. 28

Reprezentarea schematică a unui receptor colinergic nicotinic (acetilcolină)



Din fig. nr.28' se observă că receptorul conține în total 5 subunități ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) cu o prezență dublă a subunităților α . Centrul de legare a acetilcolinei este localizat pe subunitățile α ; astfel, deschiderea canalului necesită două molecule de acetilcolină, câte una pentru fiecare subunitate α . Fiecare subunitate este un lanț singular ce conține \sim 500 aminoacizi.

Tabelul nr. 20

Câteva tipuri și subtipuri de neuroreceptori

Tipul de receptor	Subtipuri	Transmițătorul normal	Ioni din canalul receptorului
α -Adrenergic	α_1, α_2	noradrenalină.	-
β -Adrenergic	β_1 β_2	noradrenalină adrenalină	- -
Colinergic	nicotinic muscarină M_1 sau M_2	acetilcolină acetilcolină	Na^+, K^+ Na^+, K^+
Acid gamma-aminobutiric (GABA)	A, B	GABA	Cl^-
Calciu	L, N, T	-	Ca^{2+}
Glicină	-	glicină	Cl^-
Dopamină	D_1, D_2	dopamina	
Opioid	$\mu_1, \mu_2, \kappa, \delta$ ϵ, σ	variați	
Serotonină	5-HT ₁ ; 5-HT ₂ 5-HT ₃	5-HT [±]	

Tabelul nr. 20 (continuare)

Tipul de receptor	Subtipuri	Transmițătorul normal	Ionii din canalul receptorului
Adenozină	A ₁ , A ₂	Adenozină	
Sodiu	-	-	Na ⁺ , K ⁺

5-HT = 5-hidroxitriptamină

Legarea transmițătorului cu partea extracelulară are loc pe două căi:

- 1) cu ajutorul unui ion metalic din canalul receptorului și
- 2) prin activarea sau inhibarea enzimelor membranei care generează compuși mesageri secundari.

Mesagerii secundari controlează modificările ionilor de calciu intracelulari sau activarea ori inhibarea enzimelor-cheie intracelulare, fosforilate, din unele procese intracelulare.

O astfel de enzimă-cheie este adenilat-ciclaza.

Ambel mecanisme sunt adaptabile la traducțiile în semnale ale biosensurilor.

Sursele de neuroreceptori sunt diverse: celule de Torpeda Californica [ce conțin neuroreceptori similari cu cei umani pentru subtipul colinergic nicotinic (acetilcolină)], cortexul de vite cornute (care conține receptori proteicici GABA), celule de drojdie [ce conțin trei din cele patru subunități ale receptorului nicotinic(acetilcolină)] baculovirusi (virusi ai insectelor, ce conțin subunități ale receptorului GABA de tip A) etc.

Neuroreceptorii specifici se încorporează în biosensuri după imobilizare.

Receptorul se poate imobiliza prin adsorbție pe un suport

sau prin reticulare cu glutaraldehidă și se cuplează cu un electrod ion-selectiv; se obțin biosenșori pentru varianta constructivă cu tranzistori cu efect de câmp, iar potențialele se determină prin referire la un electrod similar, care nu conține receptorul. Un asemenea biosenșor s-a construit cu receptor nicotinic (acetilcolină).

Stabilitatea este problema majoră a utilizării neuroreceptorilor ca elemente ale biosenșorilor, deoarece aceștia devin instabili în timp prin îndepărtarea lor din vecinătatea naturală a membranelor de lipide. O alternativă ar putea fi biosenșorii cu fragmente de țesuturi sau cu părți anatomice specifice pentru organisme inferioare. În asemenea cazuri însă selectivitatea senșorului este serios perturbată datorită degradabilității enzimatică și microbiene a acestor materiale biologice.

III.3. Aplicații în cromatografia de afinitate

Cromatografia de afinitate (afină) reprezintă o variantă a cromatografiei de adsorbție, în care purificarea unor substanțe ca și izolarea componentelor unui amestec are loc pe baza interacției specifice, reversibile dintre faza staționară (ligand) și componenții amestecului de separat. După adsorbție, compușii reținuți pe faza staționară se desorb prin eluare. Metoda este folosită pentru purificarea și izolarea substanțelor biologice active, datorită marii lor afinități față de moleculele specifice.

Interacțiile au loc în faza staționară, solidă, adsorbția fiind de natură pur fizică (prin legături de hidrogen, ionice, forțe hidrofobe, forțe van der Waals etc).

Fiecare adsorbent cromatografic se caracterizează prin anumiți centri activi care pot interacționa cu substanța de analizat.

Cantitatea de substanță adsorbită (q) în funcție de concentrația sa (c) se poate exprima prin izoterma de adsorbție Langmuir, pentru care:

$$q = \frac{k_1 c}{1 + k_2 c}$$

în care: q = cantitatea de solut adsorbit (x) pe unitatea de masă de adsorbent (m);

c = concentrația de echilibru a solutului;

k_1 și k_2 = constante

Dacă solutul este în concentrație suficient de mică ($k_2 c \ll 1$), ecuația devine expresia unei izoterme lineare de adsorbție:

$$q = k_1 c$$

Deci cantitatea adsorbită este direct proporțională cu concentrația solutului.

La concentrații foarte mari de solut ($k_2 c \gg 1$) relația devine:

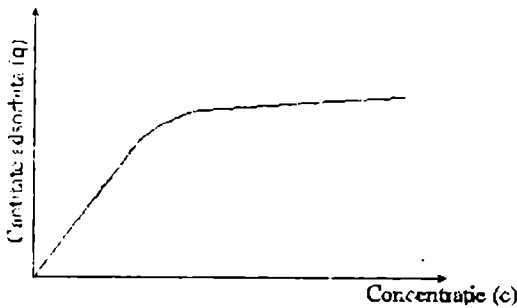
$$q = \frac{k_1}{k_2}$$

iar cantitatea adsorbită (q) tinde către o valoare limită (fig. nr. 29) care reprezintă cantitatea maximă de solut ce se poate adsorbi pe unitate de masă de adsorbent (capacitatea adsorbentului).

Cu cât adsorbția este mai puternică, izoterma tinde să aibă o curbură mai puțin pronunțată, curbura depinzând de numărul de centri de pe adsorbent, capabili de a lega moleculele solutului.

Fig. Nr. 29

Izoterma de adsorbție Langmuir



Tehnica cromatografiei afine este bazată pe specificitatea biologică a unui ligand de a interacționa cu alte molecule prin legături necovalente, reversibile.

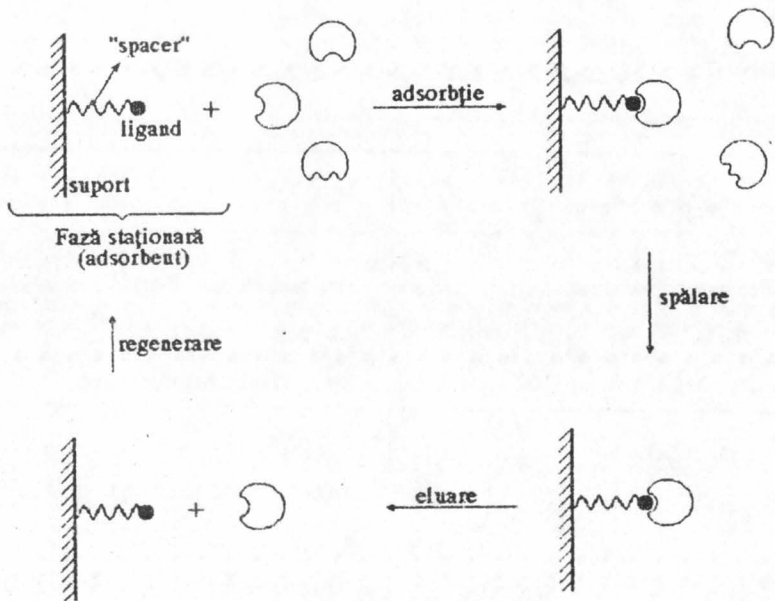
Termenul de „ligand” se referă la un substrat, produs, inhibitor, enzimă, coenzimă, efector alosteric care interacționează specific și reversibil cu o proteină sau cu altă macromoleculă ce trebuie separată sau purificată.

Astfel, enzimele au o mare specificitate în tendința lor de a lega substrat, produși, coenzime, inhibitori, modulatori alosterici etc. Hormonii formează complexe de înaltă afinitate și specificitate cu proteine și cu receptorii celulari, genele interacționează cu acizii nucleici, anticorpii se cuplează cu antigenii complementari, lectinele din plante se leagă specific de suprafața celulelor antigenelor, eritrocitelor, limfocitelor sau a unor polizaharide etc.

Principiul general al cromatografiei afine (fig.nr. 30) se bazează pe legarea (imobilizarea) covalentă a ligandului pe un suport insolubil, care va fi folosit ca adsorbant (faza staționară cromatografică).

Fig. Nr. 30

Principiul cromatografiei afine



Astfel, de exemplu, un amestec conținând diverse proteine se trece printr-o coloană umplută cu adsorbent specific ce conține un ligand cu afinitate pentru una din ele, ce va fi reținută. Restul moleculelor (proteine inerte) se îndepărtează prin spălare.

Proteina adsorbită specific se eluează, utilizând de exemplu un solvent care solubilizează moleculele reținute, regenerându-se adsorbentul.

Tehnica cromatografiei afine poate folosi și la purificarea și separarea unor structuri biologice supramoleculare (celule, viruși, organite celulare), sau pentru concentrarea unor soluții diluate de proteine.

În tabelul nr. 21 sunt indicate aplicațiile generale ale

romatografiei afine.

Tabelul nr. 21

Aplicații ale cromatografiei de afinitate

Purificarea proteinelor	Enzime Anticorpi Proteine de legătură, transport și receptoare Proteine represoare
Tehnici de separare	Celule și viruși Acizi nucleici și nucleotide complementare Izoenzime Proteine denaturate și modificate chimic și proteine sintetice obținute din proteine naturale Proteine mutante Peptide cu afinitate caracteristică
Concentrarea soluțiilor diluate de proteine	
Investigarea etapelor cinetice și a mecanismelor de legare	
Determinarea constantelor de disociere și de echilibru	

De o deosebită importanță sunt în ultimul timp metodele cromatografiei afine bazată pe enzime sau alte proteine ca liganzi de înaltă specificitate pentru substrat macromoleculare naturale și de semisinteză, inhibitori etc.

Pentru obținerea unor suporturi afine (adsorbenți) cu enzime ca liganzi, se utilizează metodele de imobilizare fizică și chimică pe suporturi organice și anorganice, naturale și sintetice, care au fost tratate în volumul I.

III.3.1. Suporturi

În general, ca și în cazul altor utilizări ale enzimelor imobilizate, suporturile pentru cromatografia afină trebuie să îndeplinească mai multe condiții:

- să aibă o rețea de pori liberi pe suprafață, care să permită accesul uniform al macromoleculilor de proteine;

- particulele de gel să fie rigide, sferice, uniforme ca dimensiuni. În cazul unor solute cu molecule voluminoase (ca proteinele), cu viteză mică de difuzie, un gel cu particule mari va întârzia atingerea echilibrului de difuzie. Totuși, un gel cu particule mari va opune o rezistență mai mică la trecerea lichidului (solvent + solut), viteza de scurgere prin patul adsorbant fiind mai mare.

Forma de perle (sferică) a gelului-suport conferă acestuia o rigiditate mai mare, particulele nefiind deformate de presiunea hidrodinamică generată de scurgerea lichidului prin suport.

Perlele flexibile, ușor deformabile, tind să se compactizeze, crescând rezistența la scurgere a soluției și limitând viteza de scurgere;

- gelul-suport trebuie să fie chimic inert în condițiile în care este folosit. Suportul care reacționează cu enzimele sau cu alte proteine din mediul de reacție, le poate denatura. Pentru a se restrânge la maximum efectul de schimb de ioni, este esențial ca suportul să aibă un conținut scăzut de grupări ionice, mai

ales când se lucrează la tărie ionică mică;

- gelul-suport trebuie să fie fizic (mai ales mecanic) și chimic stabil în condițiile de imobilizare a ligandului, de adsorbție, spălare și eluție a macromoleculilor ce se separă. De asemenea, gelul-suport trebuie să aibă mare stabilitate în timp (luni sau chiar ani), să fie nebiodegradabil și să nu impună restricții severe de stabilitate în condițiile de pH și temperatură în care urmează a fi folosit adsorbentul;

- gelul-suport trebuie să fie capabil de activare (funcționalizare) cu grupări reactive care să rețină liganzii pe suprafața suportului.

III. 3.1.1. Polizaharide

a) Celuloza

Folosirea celulozei este limitată de structura sa fibroasă neuniformă, care împiedică accesul unor molecule mari. În schimb, modificând chimic regiunile amorfe ale celulozei se pot obține macromolecule acceptabile pentru cromatografia afină.

În 1953, Lerman a folosit primul un derivat fenilazofenolic al celulozei pentru purificarea tirozinazei din ciuperă.

Ulterior, derivații celulozei s-au utilizat pentru separarea și caracterizarea DNA și RNA legate de proteine, din nucleotide.

Utilizarea celulozei nu oferă posibilități vaste pentru cromatografia afină, fibrele sale compactându-se ușor și necesitând coloane de mari dimensiuni. Totodată, heterogenitatea celulozei face ca adsorbția pe asemenea preparate să fie nespecifică.

b) Dextrani reticulați

Se utilizează mai ales Sephadexul (dextran - polimer α -1,6-glucozidic-) reticulat cu epilorhidrină. Datorită conținutului ridicat de grupe OH, acest suport este puternic hidrofil, se

gonflează în apă și în soluții de electroliți. Imbibarea și uscare perlelor de Sephadex sunt procese reversibile, proprietățile cromatografice ale suportului rămânând nemodificate după repetate cicluri de uscare-îmbibare. Este foarte stabil chimic dar se alterează la 110°C și la acțiunea prelungită a oxidanților și are un grad redus de porozitate.

Varietățile de Sephadex utilizate mai mult în cromatografia afină sunt: Sephadex G-10 (cu masa moleculară sub 700) și G-200 (cu masa moleculară 5.000-800.000).

Un dextran cu grad înalt de reticulare va fi ineficient pentru purificarea enzimelor și altor proteine cu molecule mari prin cromatografie afină. Datorită porozității reduse a particulelor de gel, organitele celulare, celulele sau fragmentele de membrane nu pot penetra porii suportului. În aceste cazuri, pe suprafața perlelor de gel se atașează grupări ce pot interacționa cu complexe supramoleculare din spațiul înconjurător. Astfel, β - și T-linfocitele se pot separa pe o coloană cu un imunoadsorbent, conținând anti-globulină atașată pe Sephadex G-2000 (Schlossman și Undson, 1973). Celulele adsorbite se recuperează prin digestia complexului cu dextranază.

c) Agaroză

Gelurile de agaroză reticulată cunosco o paletă largă de utilizări în cromatografia afină, pentru că se pot combina cu compuși cu masă moleculară foarte mare, au proprietăți mecanice excelente și sunt stabile în condițiile operaționale.

Agaroză se poate extrage din agaropectină (improprie pentru cromatografia afină deoarece conține grupe libere sulfat și carboxilat) prin acetilare, extracție cu cloroform și precipitare fracționată cu polietilenglicol (PEG) sau cu clorură de oetilpiridiniu.

Lanțurile lineare de agaroză, cu stabilitate mecanică, termică și chimică scăzută, se reticulează (de exemplu cu epilorhidrină). Pentru că nu se pretează la uscare și reîmbibare, între două utilizări suportul se păstrează în stare umedă (îmbibată) și se protejează cu un bacteriostatic (azidă de sodiu, butanol, toluen etc). Nu se folosește la temperaturi de sub 0°C și de peste 40°C și nici în afara intervalului de pH = 4-9.

Cu toate limitele, suporturile de agaroză reticulată cu structura lor neocompactată permit accesul unor molecule mari; în plus gelul este neutru electric și puternic hidrofil, utilizabil pentru substanțe biochimice sensibile.

Comercial se folosesc varietăți perlata de agaroză reticulată pentru cromatografie afină. Astfel variantele comerciale de Sepharoză (Pharmacia Fine Chemicals--Suedia) reprezintă agaroză reticulată cu o porozitate nemodificată față de cea a gelului inițial, dar cu stabilitate chimică și termică mai mică.

De exemplu, Sepharoză CL se obține prin tratarea agaroză cu 2,3-dibromopropanol în condiții puternic alcaline.

III.3.1.2. Polimeri sintetici

Se folosesc pentru cromatografia afină toate varietățile de polimeri sintetici poliacrilici (hidrofobi și hidrofilii), polivinilici sau poliamidici de tip nylon amintiți în vol. I.

a) Poliacrilamidă

Gelul de poliacrilamidă reticulată cu BIS (sub formă de preparate comerciale de tip Bio-Rad, Bio-Gel P etc.) se livrează sub formă perlata și uscată.

Înainte de utilizare acestea se îmbibă cu apă sau cu soluții tampon, pentru eliberarea porilor de resturile de monomeri ne-

reacționați.

Aceste geluri sunt stabile la influența majorității eluenților (inclusiv soluții de electroliți, detergenți, uree, clorhidrat de guanidină, cu concentrații mai mici de 10%) și la pH = 2-10. Nu se recomandă a se utiliza în prezența unor oxidanți (hipocloriți, H_2O_2).

Perlele de poliacrilamidă sunt superioare celor de polizaharide (ne)modificate, fiind mai poroase, mai inerte și mai stabile.

b) Gelurile de copolimeri poliacrilamidă-agaroză prezintă avantajele celor doi componenți și în plus disponibilitatea grupărilor amidice și -OH pentru activare.

Astfel, preparatele comerciale LKB-Ultrigel se prezintă în mai multe varietăți constituite din poliacrilamidă reticulată conținând în interstiții gelul de agaroză. Dimensiunile particulelor variază între 60 și 140 μm ; având rigiditate crescută și compresibilitate redusă, aceste suporturi permit viteze mari de scurgere hidrodinamică a soluțiilor.

III.3.1.3. Suporturi anorganice (sticlă, ceramică)

Stiolele cu pori controlați utilizate în cromatografia afină se obțin din unele varietăți de sticlă borosilicioasă activate termic la 700-800°C și tratate cu acizi. În cursul tratamentului termic se separă două faze ce se interpătrund: una bogată în silice și rezistentă la acizi și alta formată în principal din acid boric și ușor atacată de acizi. Faza de acid boric, solubilă, se îndepărtează prin filtrare, obținându-se o structură cu porozitate înaltă, cu pori ce au diametrul de 30-60 Å. O tratare ulterioară cu soluție diluată de NaOH îndepărtează materialul silicios din interiorul porilor, mărindu-le diametrul. Se pot obține materiale cu o

redistribuiție a dimensiunilor porilor între 45-2500 Å, care pot include majoritatea agenților biologici activi: enzime, celule, viruși.

Materialul obținut este rigid, insolubil și rezistent la acțiunea eluenților, a presiunii și variațiilor de temperatură, a pH-ului și tăriei ionice. În plus, sferile de sticlă poroasă sunt necompresibile, rezistente la atacuri microbiene și ușor sterilizabile termic sau cu dezinfectanți. De aceea, ele pot fi folosite cu succes la purificarea enzimelor destinate studiilor clinice sau „in vivo”.

Un dezavantaj al acestor suporturi este adsorbția nespecifică a proteinelor. Sticla nativă reține (prin adsorbție fizică) majoritatea enzimelor (mai ales cele puternic bazice) dar și unele proteine neutre, ca și unii viruși.

Adsorbția nespecifică se datorează grupărilor silanol ($-\overset{|}{\text{Si}}-\text{OH}$) de pe suprafața sticlei, încărcată astfel negativ. În cazul sticlei borosilicioase, prezența borului pe suprafață (acid Lewis) îi mărește capacitatea de adsorbție fizică nespecifică.

Pentru a se elimina acest neajuns, se folosesc perle de sticlă acoperite cu dextran (Regnier și colab., 1974). Aceste materiale se pot activa ușor cu BrCN sau prin alte tehnici caracteristice polizaharidelor.

Perle de sticlă acoperite cu un antigen se pot folosi pentru separarea celulelor imunolimfoide, sau pentru purificarea unor enzime.

Astfel DNA și RNA-polimeraza din *Escherichia coli* se purifică pe sticlă legată de DNA, iar β -galactozidaza pe sticlă acoperită cu galactozid.

Un dezavantaj al suporturilor perlate de sticlă este

posibilitatea înfundării porilor, care scade viteza de scurgere a soluțiilor prin patul de adsorbent. În aceste cazuri se recomandă ca particulele să aibă dimensiuni de 40-80 mesh sau 80-120 mesh, pentru fiecare caz în parte alegându-se particule cu pori controlați, de anumite diametre.

Dimensiunile porilor pot mări capacitatea de funcționalizare (activare) a suportului. Astfel, o sticlă cu pori cu diametrul de 2500 Å are o capacitate considerabil mai mică de activare decât cea cu pori cu diametrul de 1750-550 Å.

Particulele de cuarț având pori controlați cu diametre de 40-3000 Å și diverse dimensiuni sunt foarte rezistente la presare, pH, temperatură și pot servi la separarea unor compuși cu mase moleculare de ordinul 10^3 - 10^9 .

III.3.1.4. Alte tipuri de suporturi

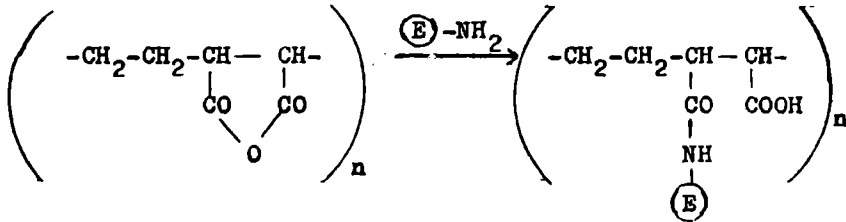
-O varietate de suport este sticla cu pori controlați, cu suprafața acoperită cu o peliculă hidrofilă, neionică (polipropilenglicol), care se poate activa cu bromcian sau prin alte metode utilizate la suporturile de polizaharide. Aceasta este un suport neionic, inert.

- Varietăți de (co)polimeri acrilici hidrofilii ca Spheronul (gel de polihidroxiclorometacrilat) oferă posibilități multiple, legate de variația porozității, a numărului de grupări reactive, a dimensiunilor particulelor sferice, pentru un spectru larg de aplicabilitate, putând fi ușor activate cu BrCN. Au efecte de adsorbție nespecifice.

- Gelurile de polistiren reticulat cu divinilbenzen, hidrofobe, au o bună capacitate de gonflare dar porozitate mai mică decât cele poliacrilice și în plus, cu efecte de adsorbție

nespecific.

- Copolimerii vinilici oa etenă-anhidridă maleică pot lega enzimele și alte proteine prin gruparea $-NH_2$, lăsând libere grupele $-COOH$, iar suportul capătă caracter polianionic:



Un asemenea suport de copolimer vinilic servește la prepararea imunoabsorbentilor.

Astfel, un mare număr de antigeni legați de majoritatea proteinelor, devin accesibili dacă asemenea proteine legate se ouplează pe suport, pe baza afinității antigen-anticorp. In acest fel purificarea anticorpilor din ser se face trecând serul printr-o coloană ce conține antigenii respectivi imobilizați.

III.3.2. Metode de imobilizare a enzimelor

Enzimele folosite în cromatografia afină se leagă de suport prin metode chimice (covalente). Metoda de activare (funcționalizare) a suportului și reacția suportului cu enzimele au fost trecute în revistă în vol. I, capitolul referitor la imobilizarea covalentă a enzimelor pe suporturi anorganice sau organice, naturale sau sintetice.

In cazul suporturilor polihidroxiice (sticlă, ceramică, polisaharide, polimeri de tip polihidroxil-(met)acrilati), metoda de activare cea mai bună a suportului este tratarea acestuia cu $BrCN$.

In cazul imobilizării proteinelor biologic-actieve, acestea

vor fi legate de suport printr-un număr cât mai mic de legături covalente, pentru a-și păstra structura terțiară, care determină activitatea lor specifică. Condițiile de lucru vor ține cont întotdeauna de structura proteinei ce se imobilizează. Astfel o proteină care are la suprafață o mare cantitate de resturi lizil (cu multe grupări $-NH_2$) se va lega pe suport printr-un număr mare de puncte dacă pH-ul este $\geq 9,5$. În acest caz se vor folosi pH-uri mai joase.

O concentrație prea mare de enzimă pe suprafața adsorbentului poate duce la aberații dacă enzima are sarcini electrice, fiind posibilă o interacție nespecifică cu unele proteine.

III.3.3. Metode de lucru în cromatografia afină cu enzime imobilizate

Materialele adsorbante având ca liganzi enzime imobilizate se suspendă în soluții tampon și se utilizează în coloane.

Proba de analizat (proteină sau extract celular) se dializează în prealabil, după care dializatului se trece în flux constant prin coloana cu patul de adsorbent umectat cu soluție tampon. Compusul inert neadsorbit se îndepărtează prin spălarea coloanei. Apoi are loc dezvoltarea (eluarea compusului adsorbit).

Pentru cantități mici de compuși ce trebuie purificați sau separați se poate folosi și procedeul „batch” cu agitare moderată, în care adsorbentul cu enzima imobilizată este dispersat într-o soluție diluată de substrat (compus de purificat). Separarea de componentele inerte ale amestecului de analizat se face prin decantare, ultrafiltrare sau centrifugare, după care materialul obținut este introdus într-o coloană cromatografică pentru eluare.

III.3.3.1. Factorii care influențează determinările în cromatografia afină

A. Alegerea tamponului de echilibru trebuie să asigure pH-ul optim, tăria ionică, temperatura și compoziția chimică necesară unei puternice interacțiuni între ligandul insolubilizat și compusul ce se va separa.

B. Volumul probei, viteza debitului de alimentare, timp de echilibru

Doacă substanța de purificat (izolat) are o afinitate mare pentru ligandul imobilizat, volumul probei nu este un factor decisiv. Echilibrul de adsorbție dintre ligandul imobilizat și substanța de purificat este atins repede la o viteză redusă de trecere a fluidului prin coloană.

Timpul de interacție ligand-substanță este reflectat în timpul de incubare.

C. Efectul concentrației proteinelor inerte

Cu excepția utilizării unor viteze mari de traversare a coloanei (debit mare de alimentare), interacția dintre ligand și substratul complementar este aproape în întregime independentă de concentrația proteinelor inerte din probă.

D. Efectul temperaturii

În general, tăria forțelor de adsorbție pe gelul afin descrește cu creșterea temperaturii, de aceea temperatura se va ține sub control, eventual aplicându-se o oămașă exterioară de răcire pentru coloana cromatografică. Temperatura poate fi un factor de adsorbție la $+4^{\circ}\text{C}$ și de eluție la 25°C și mai sus.

E. Efectul adsorbentilor selectivi

Un adsorbent selectiv se poate obține ținând cont de mai

mulți factori:

- o corectă alegere a suportului, a „spacer”-ului și ligandului, astfel încât interacția ligand-substrat să fie optimă;
- factori dinamici ca: viteza debitului de alimentare, viteza de scurgere hidrodinamică a soluției prin coloana cu adsorbent, timpul de atingere a echilibrului adsorbției, tehnica de adsorbție

Volumul eluentului trebuie reglat ținând cont de faptul că concentrația moleculelor complementare adsorbitului crește rapid la volume mici. Notând cu V_e volumul de eluție, acesta se poate exprima prin relația:

$$V_e = V_0 + V$$

în care: V_0 = volumul interstițial și

V = volumul soluției din care adsorbatul a fost îndepărtat prin legare afină cu adsorbentul

La viteze relativ mari ale debitelor de probă aplicate pe coloană echilibrul de afinitate nu este atins, observându-se o emergență prematură a adsorbatului.

Capacitatea efectivă a unui adsorbent se poate deduce prin incubarea unei cantități cunoscute (m) de adsorbent cu un volum dat de soluție de concentrație C_0 ; după stabilirea echilibrului, se măsoară concentrația $C < C_0$. Astfel, capacitatea adsorbentului (q) se va exprima prin relația:

$$q = (C_0 - C)/m$$

S-a observat că valoarea capacității efective a adsorbentului este considerabil mai mică decât cea calculată pe baza concentrației ligandului, datorită apariției unor interacții cu moleculele complementare (proteinele) din soluția de purificat.

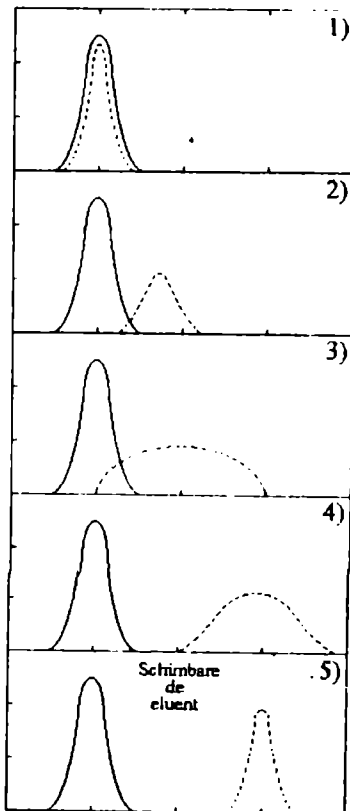
F. Eluarea proteinelor adsorbite specific

Dacă o probă ce conține substanța (proteina) de purificat

este aplicată pe o coloană cu un adsorbent selectiv iar coloana este spălată cu soluția tampon de echilibru, este posibil să apară mai multe cazuri ce depind de efectivitatea adsorbentului în condițiile experimentale (fig. nr. 31).

Fig. nr. 31

Cazuri de eluare pentru purificarea unei enzime specifice (----) dintr-un amestec de proteine brute, prin cromatografie afină



Din figura nr. 31 se observă că există mai multe posibilități la eluarea unui amestec de proteine în scopul purificării unei enzime specifice:

- enzima specifică este eluată împreună cu proteinele nespecifice, fie simultan (cazul 1), fie întârziat (cazurile 2 și 3);
- o separare efectivă este ilustrată în cazul 4);
- schimbând eluentul se efectuează eluția separată a proteinei specifice, adsorbite (cazul 5).

Cazul 1) din fig. nr. 31 corespunde unui suport neactivat sau unui adsorbent ineficient (nespecific).

Eluentul are efect de întârziere (2, 3) atunci când adsorbentul are o afinitate mai mare pentru proteina specifică, ce se dorește a fi purificată.

Dacă adsorbentul este ales corect, iar proteina care se purifică se adsoarbe puternic pe o zonă bine delimitată de pe coloană (4), atunci schimbând tamponul (sau eluentul) se pot izola perfect cele două componente (5).

Tehnica eluției în trepte este utilizată în mod frecvent. Astfel, după ce proteinele inerte (neadsorbite) au fost spălate fiind îndepărtate din coloană, se schimbă pH-ul, tăria ionică sau temperatura soluției-tampon, efectuându-se eluția prin percolare cu noul tampon.

În tehnica „eluției în puls”, eluentul se aplică pe coloană în volum mic și se spală apoi cu tamponul de echilibru. „Pulsul” eluentului migrează prin patul cromatografic ca o zonă compactă, transportând cu el și proteina eluată. Apoi, introducând un nou tampon sau alt mediu de eluție se poate fracționa întregul volum al patului cromatografic. Această tehnică de eluție se aplică în situații în care costul eluentului (de exemplu o coenzimă) este un

factor restrictiv.

G. Tehnici de eluție nespecifice

Alegerea eluentului și a condițiilor de eluție sunt determinate de : costul eluentului, stabilitatea proteinei specifice și a adsorbentului, tăria interacției ligand-proteină specifică și specificitatea adsorbentului.

Tehnicile de eluție nespecifice constau în schimbarea pH-ului, a tăriei ionice, a constantei dielectrice a tamponului sau a temperaturii acestuia.

În cele mai multe cazuri, modificarea pH-ului este suficientă pentru desorbția (eluarea) proteinei adsorbite. Stabilitatea substanței (proteina) care se purifică, alături de stabilitatea suportului, restrâng în bună măsură intervalul în care poate fi modificată valoarea pH-ului.

O altă metodă de eluție nespecifică este modificarea tăriei ionice a tamponului. De exemplu, proteinele adsorbite biospecifice sunt eluate prin adăugarea unei soluții de NaCl 0,5 M sau 1 M la soluția tampon inițială. Se mai poate utiliza NH_4Cl 0,5 M sau Tris.HCl 1 M.

O metodă de recuperare a complexului ligand-proteină constă în scindarea selectivă a legăturii suport-ligand. Tehnica este aplicabilă în cazurile în care ligandul este fixat de suport prin legături sensibile (azo, esteri ai alcoolilor, tiol-esteri, disulfuri). Metoda se folosește pentru sisteme cu afinitate înaltă, în care macromoleculele ce se purifică se pot denatura ireversibil la variații de pH sau în prezența altor agenți de denaturare. În acest caz, complexul ligand-moleculă specifică se poate detașa de exemplu prin reducerea grupării -N=N- din azoagaroză cu ditioniți.

H. Tehnici de eluție specifice

În cazul în care ligandul de pe adsorbentul afin prezintă afinitate simultană pentru mai multe macromoleculi, este necesar să se crească selectivitatea condițiilor de lucru.

Astfel, orice ligand liber care este competitiv cu ligandul imobilizat pentru o enzimă, este potențial capabil de a efectua eluția enzimei adsorbite. De exemplu, concentrații înalte ale aceluiași ligand ca și cel imobilizat pot elua enzima adsorbită.

Astfel, în cazul ribonucleotid-reductazei s-a găsit că anumite concentrații proporționale de dATP, ATP și dAMP pot elua enzima din analogii imobilizați.

În general, se pot folosi concentrații de eluent de 20 ori mai mari decât valorile corespunzătoare lui K_M din soluția inițială. Dacă afinitatea enzimei pentru ligandul imobilizat este înaltă, se utilizează concentrații cu ordine superioare de mărime față de valorile K_M din soluțiile inițiale.

Pentru sisteme ligand-enzimă cu afinitate mică se utilizează concentrații scăzute de eluent.

În majoritatea cazurilor se preferă un eluent (ligand) diferit de cel imobilizat pe suport, sistemul căpătând dublă specificitate:

- pentru ligandul imobilizat;
- pentru ligandul-eluent.

Ligandul eluent se alege astfel încât să aibă o înaltă afinitate pentru enzima care trebuie purificată, dar structural să fie deosebit de ligandul imobilizat.

III.3.4. Utilizări ale cromatografiei afine în separarea și purificarea proteinelor

Suporturile afine pot fi folosite pentru izolarea și purificarea enzimelor pe bază de interacții ligand (substrat)-enzimă dar și pentru izolarea unor inhibitori prin interacții enzimă (ligand) - inhibitor specific.

În 1971, Steers și colab., au descoperit un adsorbent format dintr-un β -tiogalactozid (ligand) imobilizat pe agaroză printr-un „spacer”, dar interacția dintre β -galactozidază și adsorbent este nespecifică.

În 1977, Hamazaki și Hotta au propus utilizarea unui suport de poliacrilamidă (Biogel P-300) funcționalizat cu grupări hidrazidice, pe care s-a imobilizat lactoza. Adsorbentul afin astfel obținut a fost utilizat pentru purificarea β -galactozidasei din germeni de grâu.

Uneori enzimele trebuie purificate de impurități; astfel pentru a se obține o protează pură trebuie să se îndepărteze urmele de zimogen sau de alte enzime.

De exemplu, majoritatea probelor de tripsină cristalină conțin sub formă de impuritate chimotripsina. Trataând tripsina cu un inhibitor ireversibil de chimotripsină [L-(1-tosilamido-fenil)-etilolormetilcetoxă] se reduce activitatea chimotripsinei, dar nu până la eliminarea sa totală. Metoda de purificare avansată se bazează pe cromatografia afină și folosește adsorbenți biospecifici pentru tripsină și chimotripsină.

III.3.4.1. Strategii de obținere a adsorbenților specifci pentru proteaze

În cele ce urmează se vor da câteva exemple de adsorbenți specifici ai unor enzime.

A) Se pot utiliza inhibitori de proteine cu masă moleculară înaltă în calitate de liganzi imobilizați pe agaroză activată cu BrCN.

Astfel, legarea ovomucoidului de pui (proteină capabilă de a inhiba numai tripsina) pe agaroză-BrCN are ca rezultat adsorbția afină a tripsinei, la pH slab alcalin (Feinstein, 1970). Eluția se face prin scăderea pH-ului.

Adsorbentul poate separa α și β tripsina, dar nu leagă tripsinogenul bovin sau chimotripsina.

Se poate folosi și inhibitorul de tripsină din fasole soia, imobilizat pe agaroză, pentru a izola tripsina de chimotripsină (Porath și Sundberg, 1971).

Adsorbentul leagă ambele enzime la pH = 7,5, dar scăzând pH-ul sau aplicând eluarea specifică a chimotripsinei cu triptamină și a tripsinei cu benzamidină, cele două enzime se pot separa.

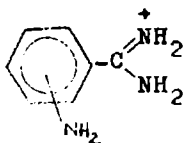
B) Pentru a purifica o enzimă se pot prepara adsorbenți prin imobilizarea pe suporturi de oligopeptide a unor liganzi având aminoacizi complementari specificității enzimei.

De exemplu, imobilizând pe agaroză tripeptida glicil-alanil-arginină, se poate adsorbi tripsina la pH = 7,3-5,0. Eluarea se face cu soluție de HCl sau de benzamidină.

C) Agaroză cu glicil-glicil-O-benzoil-tirosil-L-arginină imobilizată, adsorbe specific papaina.

O altă metodă de obținere a unor adsorbenți specifici pentru tripsină utilizează ca liganzi inhibitori cu masă moleculară mică.

Astfel, meta- și para-aminobenzamidina:



imobilizată pe agaroză, adsorbe tripsina la pH = 8-5,5

Eluarea se face cu o soluție tampon de benzamidină. Acest adsorbent reține și proteine asemănătoare cu tripsina (acrozina, trombina, calicreina) dar nu chimotripsina sau chimotripsinogenul.

O chimotripsină pură se obține cu ajutorul unui adsorbent format din esterul metilic al ϵ -aminocaproil -D-triptofanului imobilizat pe agaroză, ligandul având specificitate totală pentru proteaze chimotripsinice.

Un adsorbent specific pentru ϵ -chimotripsină este format din 4-fenilbutilamină $C_6H_5-(CH_2)_4-NH_2$ imobilizată pe agaroză activată cu BrCN. Nu adsorbe tripsina și nici chimotripsinogenul.

Un ligand specific pentru tripsina pancreatică bovină este aprotinina imobilizată pe alcool polivinilic reticulat cu epilorhidrină.

Inversând datele experienței se pot prepara imobilizate de tripsină pe alcool polivinilic reticulat pentru purificarea aprotininei din extractele de plămâni de mamifere.

III.4. Aplicații medicale și în imunochimie ale enzimelor imobilizate.

Aria extrem de vastă a aplicabilității biomedicale a enzimelor imobilizate include utilizări în terapie, analiză clinică, medicina preventivă ca și cercetări biochimice și biofizice; de aceea în cele ce urmează se vor da doar câteva exemple de asemenea aplicații.

Studii de laborator (pe animale) pentru folosirea enzimelor imobilizate în terapia medicală au început după 1957.

III.4.1. Utilizarea enzimelor imobilizate „in vivo”

Introducerea unei enzime „in vivo” poate duce la reacții de

hipersensibilitate, imunologice, ca și la o rapidă inactivare și eliminare a lor. În plus, enzimele solubile sunt instabile la temperatura corpului de $\sim 37^{\circ}\text{C}$.

Aceste inconveniente sunt îndepărtate dacă se lucrează cu enzime imobilizate, mai ales sub formă microencapsulată.

În general, utilizarea enzimelor în scopuri medicale are două mari direcții de dezvoltare:

- înlocuirea unor enzime pierdute (sau inexistente) în organism, ca urmare a unor dereglări metabolice sau genetice și
- aplicații medicale diverse (terapia unor maladii, fabricare de seruri și vaccinuri etc).

Pentru implantări „in vivo”, enzimele imobilizate se folosesc sub mai multe forme:

1. Implantarea prin injecție locală (intravenos, intrarterial, intramuscular, subcutanat, intraperitoneal).
2. Perfuzii extracorporale de sânge sau ser sanguin.
3. Administrare gastrointestinală (orală)
4. Aplicații locale (pe răni sau țesuturi)

III.4.1.1. Injecția locală

Enzimele imobilizate sub formă de suspensii pot fi implantate prin injecție. Metoda (calea) de injecție este decisivă de cantitatea totală de enzimă injectată și de afinitatea substratului pentru enzima respectivă la centrul implantării.

Echilibrul substratelor se stabilește mult mai încet în injecțiile subcutanate, decât în cele intravenoase. Reacții mai rapide se obțin și în injecția intramusculară.

Majoritatea substratelor prezintă schimburi rapide în circulația sângelui și în cavitatea peritoneală.

Particule mici, cu dimensiuni de 7-8 μm (ca ale celulelor

roşii din sânge) trec prin sistemul limfatic direct în sistemul circulator, pe când particulele mai mari ($>20 \mu\text{m}$), mai ales dacă sunt rigide, nu trec prin sistemul limfatic, dar pot rămâne în cavitatea peritoneală chiar mai multe luni, fiind (ou timpul) împresurate de fagocite.

În cazul enzimelor imobilizate pe suport se pune problema biocompatibilităţii materialelor -suport. O biocompatibilitate redusă poate face imposibilă testarea „in vivo”.

Nu este posibilă o generalizare a tipurilor de materiale şi de metode de imobilizare, fiecare caz în parte necesitând anumite condiţii specifice.

Totuşi, în bună parte enzimele încapsulate în nylon sau ocoliu (nitrat de celuloză) pot fi injectate intraperitoneal fără a produce efecte adverse la animale. Metoda injectării intraperitoneale a fost calea principală de estimare şi testare „in vivo” a enzimelor imobilizate la animale. În acest fel au fost studiate: ureaza, catalaza, asparaginaza.

Administrarea directă în sânge (injecţii intravenoase şi intraarteriale), este mult mai dificilă deoarece necesită particule de dimensiuni mult mai mici. În acest scop se pot folosi enzime imobilizate prin încapsulare în lipozomi.

III.4.1.2. Perfuzii extracorporale

În dispozitivele de perfuzie extracorporale, enzima acţionează asupra substratului prezent în sânge sau în ser sanguin, într-un aparat exterior. Asemenea dispozitive evită introducerea de materiale străine în circulaţia sângelui.

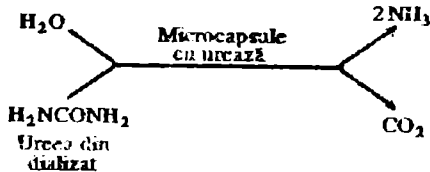
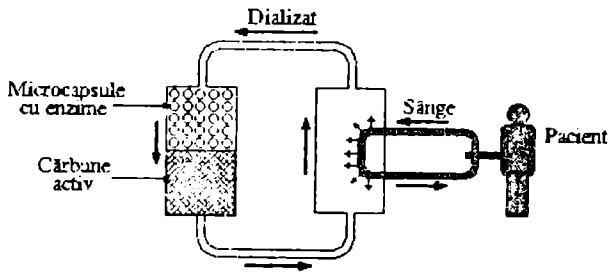
În principiu, aceste dispozitive se obţin prin plasarea

enzimei imobilizate într-un sistem închis prin care circulă sângele sau serul sanguin, care vin în contact cu enzima imobilizată și apoi se reîntorc în corp.

Primul sistem de acest fel a fost obținut cu urează microencapsulată, în scopul îndepărtării ureei din sânge. Sângele conținând mari cantități de uree este trecut printr-un dispozitiv care conține urează microencapsulată, asociată cu heparină (anti-coagulant). În fig. nr. 32 este schematizat un asemenea dispozitiv.

Fig. nr. 32

Dispozitiv extracorporeal pentru îndepărtarea ureei din sânge cu ajutorul urezei imobilizate



Prođuşii de reacţie (CO_2 şi NH_3) rămân adsorbiţi pe cărbune activ sau pe răşini, iar sângele purificat este recirculat în corp.

Datorită avantajelor pe care le prezintă enzimele imobilizate în dispozitive extracorporale (se evită introducerea unor substanţe străine în sânge), s-au testat şi aplicat „in vivo” enzime fixate pe: sticlă, plăcuţe de polimetacrilat, tuburi de nylon, spirale de colagen poros, membrane de dializă, fibre etc.

Astfel, Hyden şi colab. au realizat un sistem de tratament extracorporal, cu plăci de sticlă sablate cu asparaginază imobilizată, care poate controla presiunea sângelui şi hemoliza globulelor roşii.

Dezavantajul principal al unui asemenea sistem este că plăcile de sticlă au tendinţa de a se acoperi cu cheaguri, chiar şi atunci când pacientul este tratat cu anticoagulante.

Utilizând plăcuţe de polimetilmetaacrilat cu asparaginază imobilizată, se observă o reducere substanţială a cantităţii de L-asparagină din plasmă şi o activitate imunosupresivă la oameni şi câini.

Un alt exemplu de utilizare a sistemelor de perfuzii extracorporale pentru suplinirea unor deficienţe enzimatiche ale organismului este catalaza microencapsulată introdusă într-o cameră extracorporală de mici dimensiuni, prin care se recirculă fluidul intraperitoneal, în care s-a injectat o cantitate mică de perborat. Se observă scăderea concentraţiei de perborat injectată în corp.

III.4.1.3. Administrare gastrointestinală

Ureaza microencapsulată introdusă per oral în intestinele animalelor, a fost prima enzimă imobilizată testată pe această cale.

Trecerea prin tractul intestinal fiind foarte lentă metoda este limitată la puținele cazuri în care poate avea loc o echilibrare rapidă a substratelor în aceste condiții, sau este necesară administrarea unui volum mare de soluție diluată de enzimă.

III.4.1.4. Aplicații locale

Aplicarea locală repetată a enzimei solubile pe răni sau țesuturi nu este de dorit, deoarece absorbția sa în sânge poate duce la reacții imunologice. În acest caz se aplică pansamente cu enzimă imobilizată. De exemplu, se utilizează catalaza microencapsulată în tratarea acatalazemiei umane (în care rezultă leziuni locale datorită apei oxigenate produse de bacterii, ceea ce duce la cangrenarea răni). Pentru a se evita reacțiile alergice care pot apărea prin aplicarea directă a catalazei solubile, enzima se imobilizează prin encapsulare. Acesta este un exemplu de tratare a deficiențelor enzimatico ereditare.

III.4.2. Mecanismul acțiunii enzimelor incluse în lipozomi

În tratamentul „in vivo” al unor dereglări metabolice cu enzime imobilizate se alege un suport netoxic, fără acțiune antagonică și care să rețină agentul terapeutic fără a permite contactul său direct cu organismul. În plus, suportul trebuie să fie ușor manipulabil, să fie biodegradabil și să poată elibera cu ușurință conținutul său.

Suporturi ideale pentru asemenea scopuri s-au dovedit a fi lipozomii, bule de lipide formate din două sau mai multe straturi duble monomoleculare concentrice, de fosfolipide, alternând cu

straturi apoase în care pot fi incluse enzimele sau alte materiale biologic-actiue.

După injectarea lor în circulația sângelui, enzimele incluse în lipozomi își păstrează activitatea latentă, iar conținutul lor poate trece prin țesuturi ca cele ale ficatului și splinei.

Sub acțiunea fosfolipazelor, lipozomi își eliberează conținutul (enzimele) care poate acționa local, sau asupra altor compartimente celulare.

O enzimă inclusă în lipozomi poate acționa în două moduri asupra substratului specific:

- prin eliberarea imediată a enzimei din lipozomi;
- substratul cu masă moleculară mică poate penetra straturile duble de fosfolipidă, întâlnind enzima în spațiul apos.

Ambele căi pot fi aplicate în terapie.

III.4.2.1. Tratarea deficiențelor enzimatice

Lipsa unor enzime din organism poate duce la acumularea substratelor corespunzătoare în diverse țesuturi. Astfel, insuficiența organismului în hidrolaze ale zaharurilor poate determina acumularea hidraților de carbon în ficat sau splină.

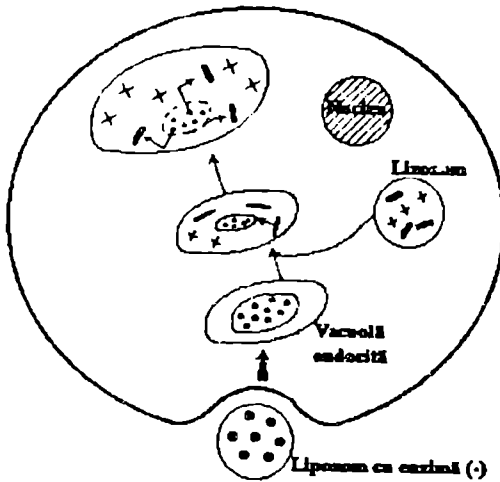
Deficiența se poate corecta prin introducerea în aceste țesuturi a lipozomilor ce pot elibera enzimele respective.

În fig. nr. 33 este schițat modul de acțiune al lipozomilor cu enzime immobilizate asupra celulelor.

Astfel, un lipozom ce conține molecule de enzime (•) penetrează celula prin endocitoză. Vacuola endocită formată fuzionează cu un lipozom ce conține moleculele substratului (-). Enzimele lipozomiale (+) desfac straturile lipidice duble ale lipozomului și eliberează enzima inclusă care acționează asupra substratului.

Fig. nr. 33

Schema acțiunii enzimei imobilizate în lipozomi asupra
unei celule



Atacul substratului de către enzimele incluse în lipozomi nu implică neapărat prezența enzimelor lizozomiale, ruperea lipozomilor nefiind obligatorie în cazul substratelor cu masă moleculară joasă.

Asemenea substraturi pot penetra straturile duble fosfolipidice rămase intacte, pentru a interacționa cu enzima specifică.

În cazul fenilacetoniuriei și galactozemiei, fenilalanina și respectiv galacto-1-fosfatul pot fi transformați în tirozină și gluco-1-fosfat chiar în absența celor două enzime (fenilalanin-hidroxilaza și galacto-1-fosfaturidil-transferaza). Utilizarea

lipozomilor ca „vehicule” pentru administrarea enzimelor capabile de a degrada sau de a transforma fenilalanina și galacto-1-fosfatul în produși metabolic-acceptabili de către organism, poate fi benefică datorită difuziei rapide a substratului din spațiul extralipozomial (sânge) în spațiul apos intralipozomial care conține enzima specifică.

III.4.2.2. Terapia neoplasmelor

Supraviețuirea unor celule maligne se datorează formării exogene continue a asparaginei, ca rezultat al contactului celulelor canceroase cu celulele normale.

De aceea în cazul leucemiilor limfocitice acute, se poate face un tratament cu asparaginază. Problema este complicată de acțiunea imunologică a enzimei care este de origine bacteriană, ca și de reacțiile toxice ce pot avea loc (modificarea grăsimilor din ficat, pancreatite, depresiuni ale sistemului nervos central).

Pentru evitarea reacțiilor anafilactice, se utilizează asparaginaza inclusă în lipozomi, enzima fiind astfel izolată de imunoglobulinele sangvine prin straturi lipidice duble. Aceste straturi lipidice sunt penetrate rapid de asparagină.

În timp ce administrarea intravenoasă a enzimei libere (solubile) duce la șoc anafilactic și moarte, injectarea asparaginazei inclusă în lipozomi reduce acest risc.

Pentru a se elimina neajunsurile tratamentului leucemiei limfoblastice acute cu asparaginază s-a propus legarea sa covalentă pe polietilenglicol activat. Prin această modificare s-au realizat:

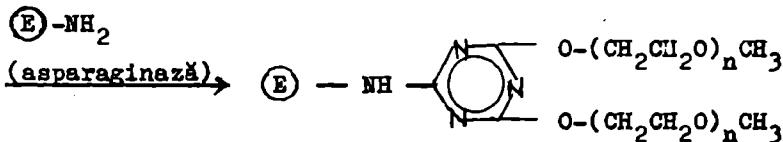
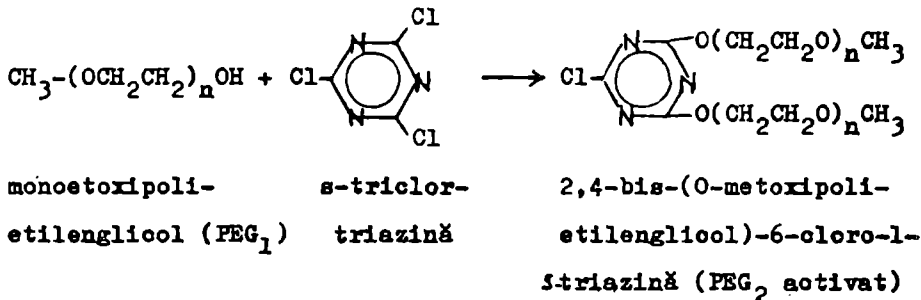
- reducerea imunoreactivității enzimei față de anticorpii anti-asparaginazici;

- reducerea imunogenității enzimei;
- prelungirea timpului de purificare a sângelui;
- îmbunătățirea activității antitumorale;
- retenția activității enzimatice.

Polietilenglicolul (PEG) este un polimer sintetic neimunogen care nu generează răspunsuri fiziologice adverse, chiar după o injectare intravenoasă repetată.

S-a observat că prin includerea asparaginazei în PEG este anulată imunoreactivitatea enzimei, dar moleculele celor doi compuși fiind interpătrunse are loc o reducere substanțială a activității biocatalizatorului.

Matsushima și colab. au propus modificarea PEG cu masă moleculară 500 (PEG₁) prin tratarea cu s-triclorotriazină. Se obține 2,4-bis-(O-metoxipolietilenglicol)-6-cloro-1-triazină (PEG₂ activat, funcționalizat cu Cl reactiv) care leagă covalent enzima:



asparaginază immobilizată pe PEG₂ activat

Reacția imunologică a asparaginazei astfel immobilizată este anulată, aductul având o activitate biocatalitică apropiată de

cea a enzimei native.

Modificarea urioazei cu PEG₂ activat conduce de asemenea la completa anulare a imunoreactivității sale față de anticorpii antiurioazici, concomitent cu retenția unei înalte activități enzimaticke.

Față de enzima nativă, asparaginaza immobilizată pe PEG₂ capătă o mare rezistență la digestia cu tripsină, ceea ce explică durata mai mare în timp a activității sale biocatalitice în comparație cu cea a enzimei native.

Testările cu asparaginază nativă și immobilizată s-au făcut „in vivo” prin injectarea intraperitoneală a șobolanilor. Creșterea timpului de remanență în circulația sângelui a asparaginazei modificate se atribuie rezistenței la sistemul reticuloendotelial, responsabil de eliminarea proteinelor străine organismului.

Asparaginaza immobilizată este de 100 de ori mai eficientă în reducerea conținutului de asparagină din țesuturi față de enzima nativă, probabil datorită liposolubilității crescute a aductului suport-enzimă.

Deși mecanismul acestei acțiuni n-a fost elucidat în întregime, este cert că asparaginaza immobilizată este mult mai eficientă decât cea nativă, fiind recomandată pentru tratarea pacienților alergici la enzima liberă.

III.4.3. Sisteme enzimaticke multisevențiale și regenerarea cofactorilor

Sistemele enzimaticke multisevențiale immobilizate, ca și sistemele cu co-factori immobilizați pot fi folosite adesea în medicină

Pentru studiul reacțiilor multisevențiale, în trepte, se fo-

losește metoda microencapsulării, prin care se pot imobiliza ușor oricât de multe enzime sau (și) alți compuși în orice concentrații.

Astfel, hexokinaza și piruvat-kinaza co-imobilizate în microcapsule semipermeabile pot servi la regenerarea atât a ATP cât și a ADP.

Pentru regenerarea NAD liber sau imobilizat s-a folosit un sistem de enzime microencapsulate, utilizabil pentru terapia de înlocuirea a enzimelor sau pentru transplant de organe.

Astfel, un complex enzimatic microencapsulat conținând galactokinază și sistemul regenerator de ATP format din hexokinază și piruvat-kinază poate fi folosit pentru conversia galactozei la 1-fosfatul-D-galactozei, pentru a suplini deficiențele în galactokinază.

III.4.4. Biodegradabilitatea preparatelor de enzime imobilizate

În scopuri medicale, după injectare, este absolut necesar ca aducții să devină operaționali în organism. De aceea trebuie folosite membrane ușor biodegradabile, Astfel, acidul polilactic s-a dovedit un suport excelent pentru enzime specifice, membrana degradându-se ușor în organism, cu formare de CO_2 și H_2O , produși netoxici.

III.4.5. Utilizarea enzimelor imobilizate în imunochimie

III.4.5.1. Imunosupresive

S-a observat că tratarea animalelor cu L-asparaginază, glutaminază sau L-arginin-iminohidrolază din *Escherichia coli* conduce

la o soădere marcată a răspunsului imunologic. Reacția antigen-anticorp se diminuează considerabil dacă enzimele sunt incluse în lipozomi. Un efect puternic se obține prin co-immobilizarea în același lipozom a asparaginazei și a antigenului specific.

III.4.5.2. Adjuvanți imunologici

Pentru a împiedica reacția adițională a anticorpilor în vaccinarea experimentală a animalelor cu o mare varietate de proteine majoritatea de natură enzimatică, se utilizează adjuvanți incluși în lipozomi.

Metoda poate fi folosită și la oameni.

S-a observat de exemplu, că răspunsul anticorpilor din ser față de difteria toxică inclusă în lipozomi este cu mult mai mare decât în cazul în care antigenul este introdus în stare liberă.

Utilizarea lipozomilor ca adjuvanți nu numai că reduce cantitatea de antigen necesară pentru imunizare, dar poate exclude și reacțiile alergice periculoase față de vaccinul respectiv.

III.4.5.3. Tehnici imuno-enzimatice pentru analize biomedicale

Testele imunohimice includ tehnici de înaltă selectivitate și sensibilitate, care utilizează anticorpi, proteine produse datorită răspunsului imunologic al organismului animal la introducerea unei proteine străine.

Anticorpii produși de celulele normale în urma divizării unora dintre ele pot fi cultivați (clonați) pentru a produce o singură specie de anticorpi (anticorpi monoclonali), în cantități mari. Acest lucru se realizează prin fuzionarea unei celule producătoare de anticorpi dorit cu o celulă canceroasă (ca mieloma).

Celulele hibridoma astfel obținute au o capacitate nelimitată de divizare, iar într-un mediu de cultură corespunzător produc cantități mari de anticorpi monoclonali.

În general, o proteină poate fi determinată pe două căi:

- o metodă directă constă în precipitarea proteinei de analizat cu anticorpii corespunzători

- pe cale indirectă, cantități mici de proteine pot fi determinate prin:

1^o) tehnica marcării fluorescente și radiomarcării, în care se determină gradul de legare a proteinei cu un standard imunologic marcat;

2^o) metoda ELISA cu o enzimă legată de un imunosorbent.

1^o) Tehnici de marcarea fluorescență sau cu izotopi

Un număr apreciabil de tehnici imunologice, care utilizează enzime legate cu antigen sau anticorp marcat, pot fi folosite în scopuri analitice biomedicale.

Se disting două direcții principale de aplicare:

a) pentru marcarea fluorescentă a anticorpilor sau a antigenelor, aceștia se leagă de enzime marcate cu coloranți fluorescenți. În acest mod se pot detecta prin microscopie electronică atât antigenele cât și anticorpii, în teste citochimice specifice.

b) Enzimele radiomarcate și legate de anticorpi și antigene servesc la determinarea constituenților umorali în procedee cantitative de radioimunanaliză.

Principiul general al metodei constă în determinarea concentrației necunoscute a unei proteine $[P]$ măsurând cât dintr-o cantitate cunoscută de proteină radiomarcată P^H se leagă de o cantitate fixă de anticorp anti-P în prezența P. Are loc o reacție competitivă care se apreciază prin construirea unei curbe standard

oare indică ce cantitate de proteină P^{E} se leagă de anticorp, în prezența unor cantități crescătoare de $[P]$. Pe această cale se determină antigenii intracelulari.

Cuplarea enzimelor marcate cu proteine de tip antigen sau anticorp se poate face prin reticulare cu glutaraldehidă într-o etapă simultană (se obțin produși cu utilizare generală) sau în două etape (pentru legarea peroxidazei de proteine). În tehnica imunodifuziei radiale procedeul poate servi la dozarea unor cantități de 20-1000 ng proteine/ml.

În majoritatea cazurilor, cele mai bune rezultate se obțin cu anticorpii legați de glucozooxidază. De exemplu, plăcuțe cu gel de agaroză conținând antiser din mușchi de iepure diluat (cu aproximativ 0,5% IgG) și serum albumină bovină se folosesc în tehnica imunodifuziei radiale, dezvoltarea făcându-se prin incubare cu glucozooxidază cuplată cu anticorpul specific imunoglobulinelor din mușchiul de iepure. Se dozează astfel conținutul de IgG din mușchi.

2^o) Testul ELISA

Este o metodă generală indirectă de determinare a unor cantități mici de proteine. Etapele acestui test sunt prezentate în fig.nr. 34.

1) Se utilizează un anticorp specific proteinei de analizat imobilizat pe un suport solid (polistiren)

2) Soluția ce conține proteina de analizat se aplică pe suprafața suportului cu anticorp imobilizat, în condiții în care anticorpul să lege proteina respectivă

3) Se adaugă al doilea anticorp specific proteinei, legat de o enzimă a cărei activitate urmează a fi determinată.

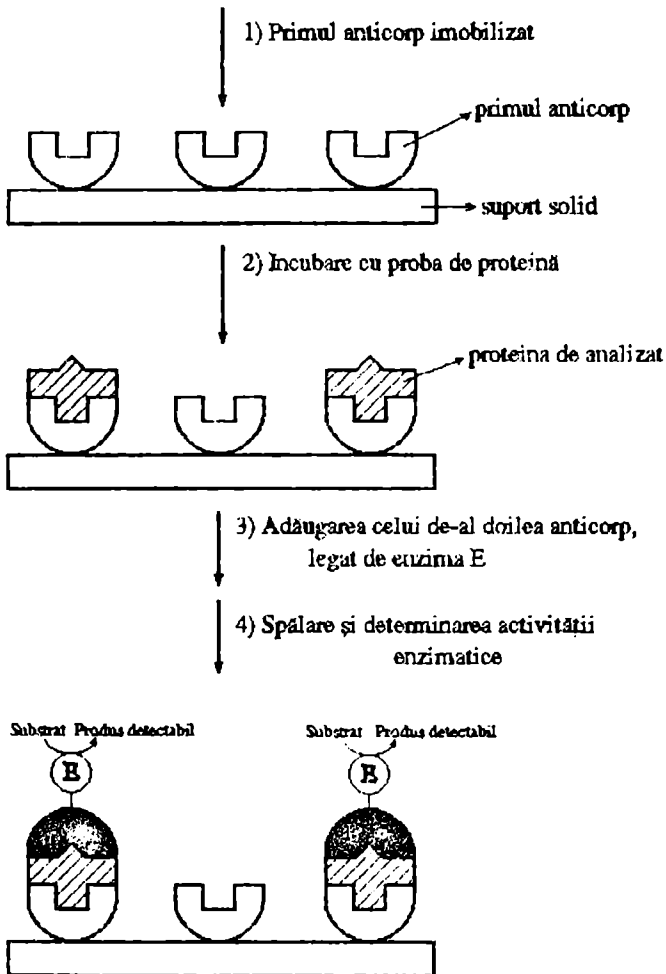
4) Se spală complexul obținut, pentru îndepărtarea compo-

lui enzimă anticorp nelegat.

Se analizează complexul anticorp-proteină-enzimă, pentru a se determina cantitatea de proteină prezentă.

Fig. nr. 34

Testul ELISA



III.5. Aplicații ale enzimelor immobilizate în sinteza și semisinteza organică

Enzimele immobilizate au căpătat o vastă utilizare în obținerea unor compuși de semisinteză utilizați fie ca produse finite (L-aminoacizi, hormoni steroizi, edulcoranți sintetici etc.), fie ca intermediari în obținerea unor medicamente (vitamine, antibiotice etc.) sau în scopuri legate de cercetări biochimice sau medicale (nucleotide, intermediari în glicoliză și fermentația alcoolică etc).

Aplicațiile tehnologice în industria farmaceutică ale enzimelor immobilizate au evoluat mult mai lent decât cele din industria alimentară, din două motive principale:

- majoritatea procedeele de immobilizare a enzimelor sunt aplicabile în industria alimentară în care tehnologiile industriale se aseamănă cu procesele degradative naturale, relativ simple;

- în industria farmaceutică majoritatea proceselor sunt sintetice, complicate, greu de aplicat. Sunt și unele procese degradative care interesează companiile farmaceutice; totuși, prezentul și viitorul enzimelor immobilizate în tehnologia produselor medicamentoase este în procesele sintetice care prin metode clasice nu pot decurge cu randamente acceptabile, sau care necesită multe etape intermediare de reacție.

Din punctul de vedere al chimistului organician sintetist atractibilitatea enzimelor în calitate de catalizatori este legată de marea lor specificitate de substrat și de reacție. Astfel, enzimele pot discerne între formele enantiomere ale unei molecule distingând grupele enantiotopice ca și moleculele ce posedă centri prochirali, ceea ce le face în special atractive pentru

sinteza asimetrică.

În sinteza organică pe bază de enzime, se disting două tipuri de strategii:

A). Situații în care cataliza unei reacții specifice conduce la unul sau mai mulți produși bine determinați. Majoritatea aplicațiilor industriale ale enzimelor immobilizate fac parte din această categorie. Astfel, este cazul unor enzime ca: amilaza, acilaza, lactaza, penicilin-amidaza, fumaraza, aspartaza, asparaginaza, tirozinaza, triptofanaza, glucoizomeraza etc. În toate aceste cazuri se pot elabora procese viabile în care factorul economic joacă un rol important. Multe din tehnologiile cu aceste enzime immobilizate sunt astăzi considerate ca procese de rutină.

B). Aplicații în cercetările de laborator

Sinteticienii, în special cei angajați în obținerea unor molecule biologic-active (inclusiv produși naturali) și în studii biosintetice și stereochimice trebuie să recurgă la reacții stereospecifice. Acestea pun probleme legate de utilizarea enzimelor în calitate de catalizatori.

Enzimele acceptate în general în calitate de catalizatori de rutină pentru reacții organice stereospecifice trebuie să îndeplinească mai multe criterii, indiferent dacă sunt enzime libere (solubile) sau immobilizate:

1. Enzimele trebuie să catalizeze o reacție de interes preparativ general. Sunt cele mai indicate enzimele cu specificitate largă constituțională și cu o stereospecificitate îngustă.

2. Preparatele de enzime immobilizate trebuie să fie relativ stabile, deoarece unele reacții necesită câteva zile, mai ales dacă substratele sunt deficitare. Reacțiile ce decurg cu viteze mici trebuie anticipate, deoarece dacă substratele nu sunt cores-

punzătoare natural sau biochimic enzimelor folosite, produşii de reacţie s-ar putea să nu intereseze chimistul organician.

3. Enzima trebuie să fie accesibilă comercial, iar procedeele de imobilizare să fie uşoare şi convenabile.

4. Trebuie să existe date privitoare la specificitatea mulţumitoare pentru a se putea prevedea potenţialul de reacţie al unor substraturi. Chimistul poate studia mersul şi viteza reacţiei utilizând un reactiv chimic, pentru a se obţine informaţii asupra limitelor metodei aplicate, astfel încât calea enzimatică să conducă la rezultate similare.

5. Dacă preţul unei enzime sau coenzime este ridicat, atunci trebuie să se lucreze în condiţii de reacţie blânde, ou o înaltă stereo- sau regiospecificitate, fiind justificabil în acest fel şi un sistem costisitor.

6. Procedurul experimental trebuie să fie convenabil şi accesibil.

Numai un număr mic de enzime îndeplinesc concomitent toate aceste criterii.

Chimistul organician va alege enzima şi procedurul cel mai convenabil pentru fiecare sinteză în parte. Toate datele experimentale se vor studia mai întâi cu enzima solubilă şi abia apoi cu enzima imobilizată, în aceleaşi condiţii de reacţie. Prin compararea avantajelor şi dezavantajelor utilizării biocatalizatorului imobilizat se pot trage concluzii asupra aplicabilităţii în sinteza organică a preparatului respectiv.

III.5.1. Obţinere de enantiomeri optic puri

α -L-aminoacizii, componente de bază ale proteinelor vegetale şi animale, sunt substanţe valoroase atât pentru cercetare,

de laborator, cât și pentru utilizarea lor ca aditivi alimentari, în terapeutică, farmacie etc.

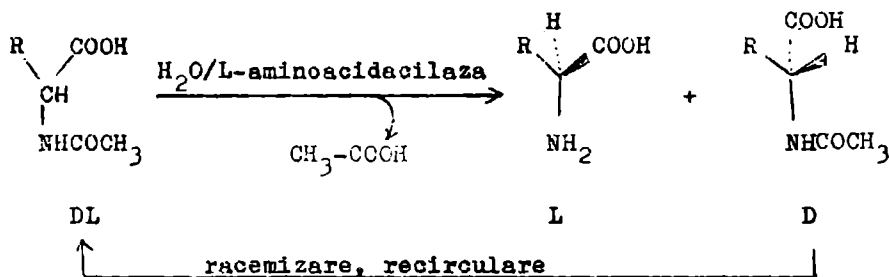
Aminoacizii se pot obține pe cale enzimatică prin trei procedee principale: prin scindarea racemicilor obținuți în sinteza organică, prin sinteza asimetrică și prin hidroliza proteinelor.

III.5.1.1. Scindarea amestecurilor racemice

În procedeele de sinteză de laborator sau industriale, care decurg în condiții achirale, moleculele chirale se obțin sub formă de amestecuri racemice (amestecuri în părți egale din enantiomerul dextrogir și cel levogir). Deoarece cei doi enantiomeri componenți ai racemicului nu se pot deosebi prin proprietățile lor chimice și fizice, singurul criteriu de diferențiere este sensul rotației specifice ($[\alpha]_D^{20}$) în lumină polarizată.

Una dintre metodele clasice de scindare (dedublare) a unui amestec racemic în cei doi enantiomeri este metoda biochimică ce folosește enzime cu enantiospecificitate de substrat.

În cazul α -aminoacizilor se poate utiliza o L-aminoacid-amilază; procedeul este folosit în biotehnologie pentru obținerea L-metioninei, L-valinei, L-fenilalaninei și L-triptofanului:



Ca sursă de enzimă se folosește *Aspergillus oryzae*. Enzima

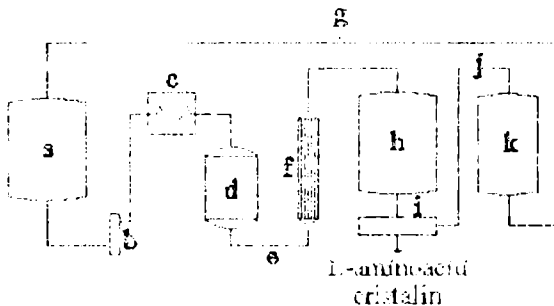
imobilizată poate fi introdusă într-un reactor coloană (Chibata) sau într-un reactor cu membrană de ultrafiltrare (procedeul german).

L-Aminoacidul se separă de D-aminoacidul N-acilat prin cristalizare fracționată, iar cel din urmă se racemizează și se recirculă până la hidroliza întregii cantități de L-aminoacid conținut în amestecul racemic.

În fig. nr. 35 este reprezentată schema unui proces continuu de separare de L-aminoacizi dintr-un racemic de aminoacid N-acilat (Chibata și colab., 1976).

Fig. nr. 35

Descrierea schematică a unui proces continuu de formare și separare a L-aminoacizilor dintr-un racemic de N-acetil-aminoacid, cu aminoacidacilază imobilizată



- a = rezervor de N-acetil-DL- α -aminoacid
- b = filtru;
- c, f = schimbătoare de căldură
- d = coloana cu enzimă imobilizată
- e = curent de L-aminoacid
- g = curent de N-acetil-DL-aminoacid
- h = cristalizor; i = separator;
- j = curent de acetil-D-aminoacid; k = tanc de racemizare

În calitate de L-aminoacid-acilaze se mai pot folosi carboxipeptidazele izolate din rinichi sau pancreas de porc. Metoda poate fi extinsă și la izolarea unor L-aminoacizi din hidrolizatele de proteine.

Cele mai bune rezultate le dau preparatele obținute prin imobilizarea L-aminoacid-acilazei pe:

- DEAE-Sephadex (prin legare ionică);
- gel de poliacrilamidă (includere);
- iodacetilceluloză (legare covalentă)

S-a observat că imobilizatul pe DEAE-Sephadex prezintă cea mai bună termostabilitate.

Alegerea finală a preparatului pentru obținerea unei coloane industriale ou enzimă imobilizată are la bază trei criterii principale:

- activitatea și stabilitatea enzimei imobilizate;
- ușurința și costul imobilizării
- posibilitatea regenerării coloanei

Enzima imobilizată pe DEAE-Sephadex îndeplinește toate aceste condiții pentru aplicarea sub formă de coloane industriale. În plus suportul este foarte stabil; după cinci ani de utilizare scăderea capacității de legare a enzimei este nesemnificativă. Se lucrează cu enzimă de origine microbiană.

Folosind un reactor-coloană cu umplutură de 1000 l DEAE-Sephadex-L-aminoacidacilază are loc o dezaoilare a izomerului L cu un randament practic pe 70-90%, în funcție de natura aminoacidului. După mai mult de 30 de zile de funcționare continuă la 50°C, coloana prezintă o activitate biocatalitică remanentă de 60%. Timpul de înjumătățire al coloanei este estimat la 60 zile. După 30 de zile de funcționare, coloana se poate regenera în întregime prin spălare cu soluție de enzimă. Prețul de cost scade

cu 40% față de procedeul de laborator cu enzimă nativă. -

Un alt suport pentru L-aminoacidilază îl reprezintă perlele de sticlă poroasă, alchil-aminată sau aril-aminată. Enzima izolată din *Aspergillus Simplex* se leagă covalent mai ales pe derivatul alchil-aminat al sticlei, preparatul obținut fiind reactiv și stabil.

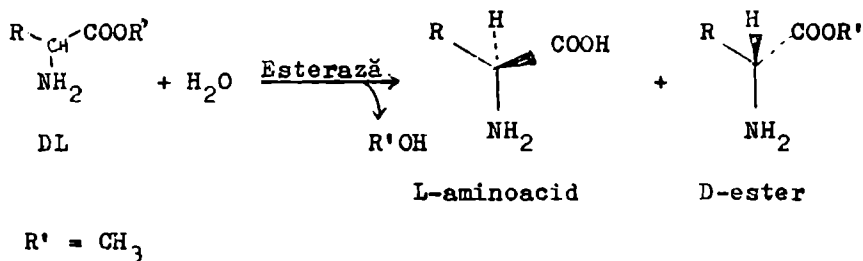
Trecând printr-o coloană cu acest preparat un debit mic de soluție 0,1 M de N-acetil-D,L-metionină, izomerul L se dezacilează în proporție de 96%. La debite mari de alimentare cu substrat randamentul scade, reacția începând abia după 40 de zile. Fenomenul este atribuit unor limite difuzionale. S-a calculat că la viteze reduse ale debitului se pot produce 25 kg L-metionină, operând continuu cu un litru de agregat enzimatic pe lună, productivitate comparabilă cu cea obținută prin folosirea L-aminoacidilazei imobilizată pe DEAE-Sephadex.

L-Aminoacidilaza poate fi imobilizată și prin includere în fibre de triacetat de celuloză.

Utilizând un reactor cu pat compact, la 45°C se pot obține astfel: L-tryptofan, L-fenilalanină, L-metionină și L-valină cu randamente bune.

Amestecurile racemice de α -aminoacizi pot fi dedublate și prin alte reacții enzimactice. Se cunoaște astfel faptul că enzime ca unele proteaze și peptidaze hidrolizează enantiospecific esterii izomerilor L ai aminoacizilor. În majoritatea cazurilor însă prezența esterului corespunzător stereoisomerului D are un puternic efect inhibitor pentru aceste enzime, metoda fiind mai puțin atractivă. În principiu mai este posibil să se dedubleze un amestec racemic de aminoacizi utilizând D-aminoacidoxidaza imobilizată care transformă izomerul D într-un cetoacid lăsând izomerul L intact.

O altă posibilitate de scindare a α -aminoacizilor racemici folosește o esterază:

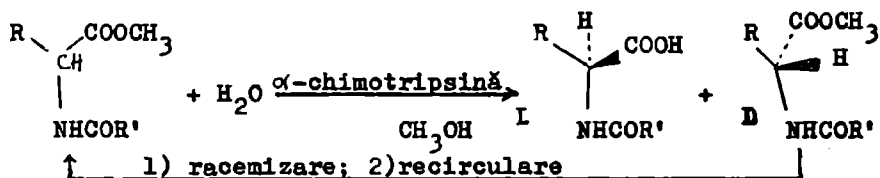


O asemenea hidroliză stereospecifică se poate realiza cu subtilisină și se aplică în cazul DL-fenilalaninei și DL-triptofanului.

În general, esterazele nu au o aplicabilitate industrială prea mare în cazul acestor reacții. Astfel, utilizarea α -chimotripsinei imobilizate, în mediu apos este puțin avantajoasă deoarece majoritatea esterilor α -aminoacizilor se polimerizează în prezența enzimei, iar enantiomerul D al esterului (unul dintre produșii hidrolizei) este inhibitor pentru chimotripsină. Metoda se poate aplica la scindarea unui număr mic de esteri racemici ai α -aminoacizilor.

Dezavantajele enumerate pot fi excluse dacă se lucrează în reactoare cu sistem bifazic apă-solvent nemiscibil cu apa, un procedeu biotehnologic relativ recent (pag.90-91).

O aplicație mult mai extinsă o are însă α -chimotripsina la hidroliza enantiospecifică a esterilor L-aminoacizilor N-acilați



L este solubil în apă și insolubil în solvenți organici;

D este insolubil în apă dar solubil în solvenți organici

$R' = -CH_3, -C_6H_5$

L-aminoacidul N acilat și enantiomerul D al esterului nehidrolizat se separă pe baza solubilității lor selective în solvenți, la pH = 7.

Enzima prezintă interes pentru că poate fi immobilizată printr-o mare varietate de metode, utilizând diferite suporturi condiționate sub formă de: perle, membrane, „Hollow-fiber” etc. Astfel se poate lucra cu α -chimotripsină immobilizată prin:

- adsorbție pe gel de agaroză (Sephroză 6B reticulată) activată suplimentar cu bromură de n-hexil;

- legare covalentă pe: perle de agaroză activată cu 1,4-butandiol-diglicolidil-eter; Spheron (gel de hidroxialchil-metacrilat activat sub formă de APEMA); celuloză mercerizată și activată cu BrCN; DEAE-celuloză și CM-celuloză activată cu BrCN sau cu triclor-s-triazină; geluri de poliacrilamidă perlată (Bio-Gel-P-2) activate cu grupe hidrazidice;

- reticulare cu glutaraldehidă sau reticulare mixtă enzimă-folie de celofan etc,

Am indicat de exemplu, în tabelul nr. 16 din vol. I variația activității enzimatice a α -chimotripsinei immobilizate covalent pe dextransi activați cu BrCN, față de esterul etilic al N-acetil-L-tirozinei (substrat).

III.5.1.2. Sinteza asimetrică

În metodele chimice de sinteză nu se pot obține decât racemi. Utilizând însă enzime enantiospecifice se poate realiza sinteza unor enantiomeri optic puri.

Și în acest caz enzimele imobilizate s-au folosit mai ales la sinteza asimetrică a unor α -L-aminoacizi cu multiple utilizări practice.

1°. Acidul L-aspartic este folosit în medicină dar și ca aditiv alimentar, fiind un precursor al aspartamului. El se obține industrial din acid fumaric și amoniac printr-o metodă fermentativă, utilizând aspartaza ca biocatalizator:



Principalul dezavantaj în utilizarea industrială a acestei metode într-un procedeu „batch” (reactor-tanc cu agitare) este faptul că trebuie incubat un amestec de substrate și enzimă solubilă. Utilizând însă aspartază imobilizată, se poate efectua un proces continuu de obținere a acidului L-aspartic. S-a observat că imobilizând aspartaza prin includere în gel de poliacrilamidă nu se obține un aduct cu o stabilitate enzimatică operațională satisfăcătoare pentru un proces industrial. În plus mai trebuie și extrasă enzima din *Escherichia coli* (pentru că este o enzimă intracelulară). Aspartaza astfel preparată conține cantități substanțiale de fumarază care poate duce la reacții secundare nedorite. Contaminarea cu fumarază dispare la o încălzire ușoară. S-a dovedit că aspartaza inclusă în geluri de poliacrilamidă este cea mai activă, dar enzima fiind intracelulară are o stabilitate operațională scăzută.

Toate dezavantajele întâlnite în cazul aspartazei pot fi înlăturate dacă se lucrează cu celule de *Escherichia coli* imobilizate.

Înă din 1973, compania japoneză Tanabe a utilizat celule

de Escherichia coli imobilizate prin includere în geluri de poli-acrilamidă pentru producerea industrială a acidului L-aspartic. O analiză economică a arătat superioritatea sistemului cu celule imobilizate față de procedeul "batch" cu enzima liberă, costul producției reducându-se cu 60% în primul caz în comparație cel de al doilea.

Ulterior s-a constatat că o creștere a activității enzimatice a celulelor imobilizate și o stabilitate operațională mai mare se obțin dacă celulele bacteriene se imobilizează în gel de carageenan (folosit de asemenea ca aditiv alimentar).

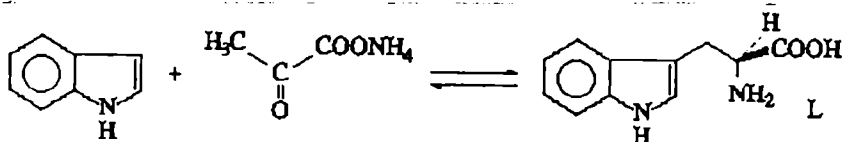
Aspartaza se mai poate imobiliza în porii membranelor sau fibrelor semipermeabile de viscoză; materialele obținute se pot folosi în reactoare „batch”, de tip coloană sau în reactoare cu membrană.

2°. Acidul L-glutamic se poate obține prin scindarea racemicului sintetizat pe cale chimică, prin extracție din hidrolizate de proteine, dar și prin sinteză asimetrică.

Un procedeu fermentativ interesant utilizează celule de Corynebacterium glutamicum incluse în gel de poliacrilamidă ou glucoză ca unică sursă de carbon.

O metodă de sinteză a acidului glutamic a fost pusă la punct în 1990 de cercetătorii chinezi, folosindu-se celule de Corynebacterium glutamicum T6-13 imobilizate în gel de diacetat de celuloză prin metoda precipitării (pag. 56).

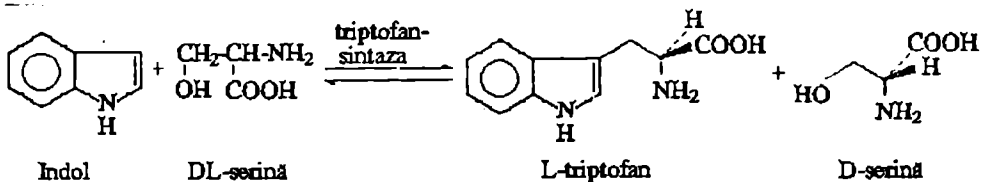
3°. L-Triptofan se poate obține printr-o metodă biosintetică utilizând indol și piruvat de amoniu:



Enzima necesară reacției (triptofanaza) este conținută în *Escherichia coli*, necesitând pentru activare 5-fosfatul piridoxalului.

Metoda de imobilizare cea mai eficientă, cu o activitate remanentă de 60% constă în adsorbția apoenzimei pe Sepharoză-piridoxal-fosfat. În absența coenzimei se observă o descreștere treptată a activității enzimatice. L-Triptofanul sau 5-hidroxi-L-triptofanul se sintetizează cu randamente bune printr-un procedeu continuu sau discontinuu (reactor „batch”). Astfel, un procedeu continuu și oare utilizează o coloană cu o umplutură de 10 ml triptofanază imobilizată pe Sepharoză, poate converti 90% din indol (0,8 mM), la 37°C; după 5 zile de funcționare activitatea enzimatică scade cu 5%.

O altă enzimă, triptofansintaza din *Escherichia coli*, purificată parțial, s-a imobilizat prin includere în fibre de triacetat de celuloză, reușindu-se obținerea L-triptofanului din indol și D,L-serină atât într-un procedeu „batch” cât și într-unul continuu. Triptofansintaza este imobilizată pe fibre de acetat de celuloză.



O concentrație prea ridicată de indol conduce la adsorbția acestuia pe fibre și la scăderea activității enzimatice, prin mărirea efectelor de împiedicare a difuziei. Procedeu în flux continuu folosește un reactor-coloană cu recirculare. Avantajele procedurii cu triptofansintaza astfel imobilizată constau în obținerea unui aduct relativ stabil suport-enzimă (până la 20

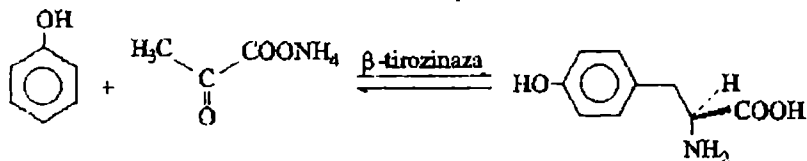
zile), posibilitatea reutilizării D-serinei: după racemizare, ca și ușurința cu care se izolează produșii de reacție.

Celulele de *Escherichia coli* se mai pot imobiliza și prin includere în gel de poliacrilamidă, putându-se obține triptofan (sau 5-hidroxitriptofan) din indol (sau 5-hidroxiindol) și serină sau piruvat de amoniu. După o incubare de 24 h la 30°C se obțin triptofanul cu randament de 86% și 5-hidroxitriptofan cu randament de 72%.

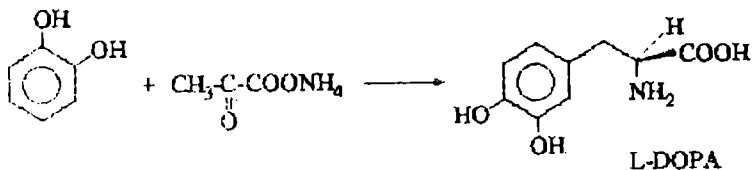
4°. L-Tirozina

β -Tirozinaza are acțiune catalitică analoagă cu cea a triptofanazei, reacția de biosinteză a L-tirozinei fiind de asemenea reversibilă .

L-Tirozina se poate sintetiza din fenol și piruvat de amoniu:

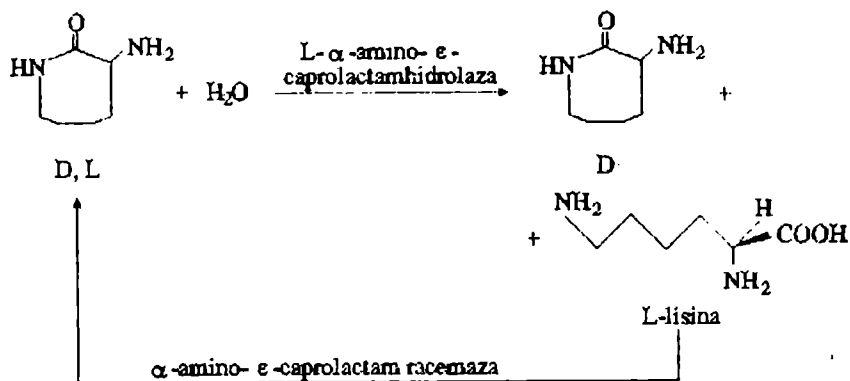


Prin aceeași reacție enzimatică se poate obține L-DOPA (medicament pentru tratarea boalei Parkinson), utilizând pirocatechină în loc de fenol:



Pentru aceste sinteze se utilizează enzima din *Escherichia intermedia*, co-imobilizată cu piridoxal-fosfatul prin legare covalentă pe Sepharoză activată cu BrCN.

5°. L-Lisina se obține frecvent pe cale fermentativă. Unul din procesele de acest tip necesită două enzime (L- α -amino- ϵ -caprolactamhidrolaza din *Cryptococcus laurentii* și α -amino- ϵ -caprolactam-racemaza din *Achromobacter cyclocastrer*):

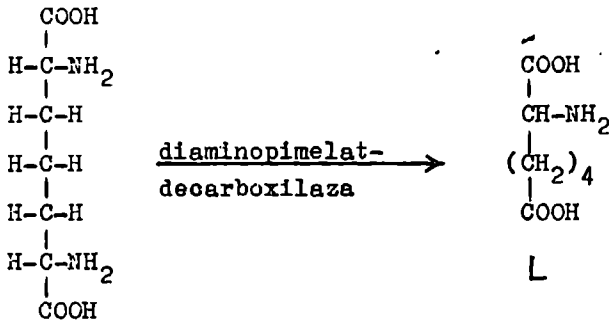


Materia primă, D,L- α -amino- ϵ -caprolactama se poate prepara ușor din ciclohexan și este un subprodus de la sinteza nylonului.

Cele două enzime se co-immobilizează prin legare ionică pe DEAE-Sephadex, într-o coloană, la 42°C.

L-lisina se sintetizează cu un randament de 95% atât din D,L- cât și din D- α -amino- ϵ -caprolactama.

În alt procedeu, pentru obținerea L-lisinei din acid mezo-2,6-diaminopimelic se utilizează diaminopimelat-decarboxilaza extrasă din *Escherichia coli* și bine purificată, immobilizată prin includere în poliacrilamidă:



Utilizând un reactor cu cuvă și agitare produsul de reacție se formează după 2 h de incubare la 40°C cu randament de 70%. Dacă se mai adaugă o enzimă, diaminopimelat-racemaza (extrasă din *Microbacterium ammoniaphilum*) inclusă separat în particule (perle) de poliacrilamidă, se poate converti acidul treo-2,6-diaminopimelic la izomerul mezo, prin incubare la 40°C timp de 2 ore. Se folosește un reactor cu cuvă, cu racemază immobilizată. Randamentul epimerizării este de 46%:

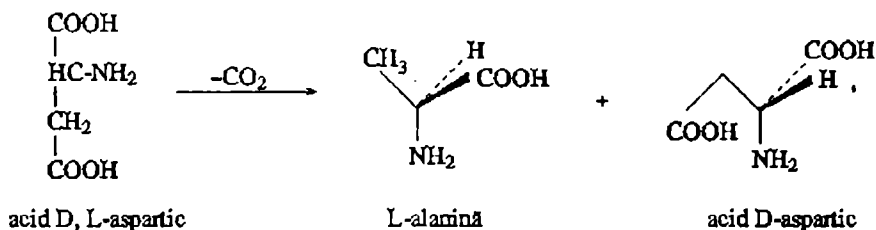


În a doua etapă, produsul de reacție se incubează la 50°C, timp de 2 ore, cu diaminopimelat-decarboxilaza immobilizată. Randamentul în L-lisină poate fi îmbunătățit utilizând un co-immobilizat al celor două enzime.

6°. L-Alanina

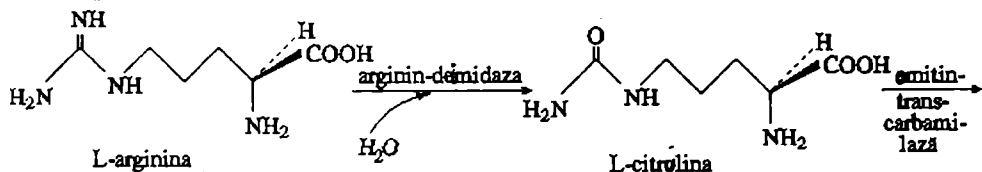
Ca materie primă pentru obținerea L-alaninei se poate folosi aspartat- β -decarboxilaza din *Pseudomonas tagnei* sau *Pseudomonas dacunhae*. Pentru aceasta celulele microbiene se imobilizează prin includere în poliacrilamidă. Aductul obținut se folosește sub formă de reactor-coloană cu pat compact.

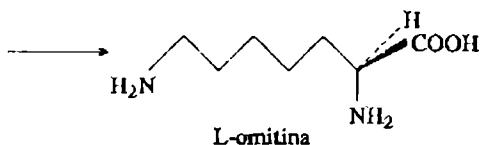
Prin coloană se trece continuu o soluție 1 M de acid D,L- sau L-aspartic la 37°C. Din ambele substraturi, L-alanina se izolează din eluent cu randamente bune (82% și respectiv 92%). Dacă se utilizează acidul aspartic racemic se poate izola și acidul D-aspartic:



Două modele de reactoare enzimatică pentru producerea alaninei pe bază de enzime și co-enzime co-imobilizate au fost descrise la pag. 274 din vol. I.

7°. L-Citrulina, utilizată în medicină, se poate obține din L-arginină prin acțiunea L-arginin-deimidazei microbiene, prezentă în diverse microorganisme. Activitatea acestei enzime se poate asocia cu ornitin-trans-carbamilaza, care transformă citrulina în ornitină:





Bacteria *Pseudomonas putida* având o activitate dehidrazică înaltă (nu are activitate transcarbamilazică) se utilizează sub formă inclusă în gel de poliacrilamidă și se poate folosi într-un proces discontinuu (reactor-cuvă) sau continuu (reactor-coloană) pentru obținerea L-citrulinei.

Stabilitatea unei coloane umplute cu celule de *Pseudomonas putida* imobilizate este foarte înaltă, având un timp de înjumătățire de 140 zile la 37°C; L-citrulina se obține cu randament foarte bun în efluentul coloanei.

Activitatea enzimatică remanentă din aductul suport-enzimă este de 56%, descreșterea activității datorându-se probabil restricțiilor difuzionale ale substratului și produsului de reacție în particulele gelului.

Acest mod de obținere continuă a citrulinei este considerat cea mai bună tehnică de fabricare a unui produs comercial printr-un procedeu microbian.

În general, procedeele enzimatice continue cu celule microbiene se utilizează în cazurile în care:

- enzimele sunt intracelulare;
- enzimele pure prezintă instabilitate atât în cursul imobilizării cât și după aceea;
- microorganismele nu conțin și alte enzime care pot interfera conducând la produși secundari nedorți sau când asemenea enzime, chiar prezente, se inactivează rapid în condițiile de

lucru;

- substratele și produșii nu au mase moleculare mari, nepunându-se astfel probleme legate de efectele difuzionale.

III.5.1.3. Obținere de L- α -aminoacizi prin hidroliza proteinelor

Procedeu cel mai des aplicat pentru obținerea L-aminoacizilor individuali este utilizarea hidrolizatorilor proteicici.

Hidroliza proteinelor se face folosind proteaze și peptidaze.

În plus, prin hidroliza parțială a proteinelor crește digestibilitatea acestora.

Un procedeu industrial bazat pe enzime imobilizate folosește β -lactoglobulina care se hidrolizează aproape complet la aminoacizii componenți, cu pronază și leucinaminopeptidază, imobilizate separat pe sticlă poroasă. Utilizând doar pronaza imobilizată hidroliza are loc numai în proporție de 70%. Cu peptidaze și pronază imobilizate, o suspensie de caseină (4-5% materie solidă) se hidrolizează în proporție de 80%.

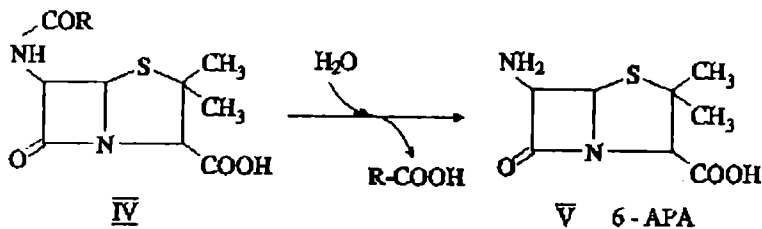
III.5.2. Obținerea antibioticelor de semisinteză

III.5.2.1. Obținerea acidului 6-aminopenicilanic și a penicilinelor

Acidul 6-aminopenicilanic (6-APA) este un intermediar prețios pentru fabricarea antibioticelor de semisinteză. Activitatea antibiotică a penicilinelor este influențată de catena laterală fixată pe gruparea $-NH_2$ din poziția 6.

Astfel, acidul 6-aminopenicilanic (V) poate fi utilizat

pentru obținerea penicilinei G (N-fenilacetil-penicilină) IVa și a penicilinei V [(2-fenoxi)acetil-penicilină] IVb etc:



R = $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ (IVa); $-\text{CH}_2-\text{OC}_6\text{H}_5$ (IVb)

Pe cale biochimică fermentativă, hidroliza penicilinelor se face cu 6-penicilin-acilază (PGA), majoritatea procedeele fiind astăzi brevetate.

Firme italiene au dezvoltat metode cu penicilinacilază inclusă în fibre de triacetat de celuloză.

Japonezii au un procedeu continuu de obținere a 6-APA cu celule de *Escherichia coli* imobilizate prin includere în poli-acrilamidă. Enzima se poate izola din microorganisme (*Escherichia coli*) și poate fi imobilizată și pe Sephadex-200 activat cu BrCN.

Intr-un procedeu englez, penicilinacilaza se imobilizează covalent pe o rășină polimetacrilică, prin reticulare cu glutaraldehidă.

Firme germane folosesc fie penicilinacilaza din *Escherichia coli* imobilizată covalent pe un copolimer de acrilamidă-BIS-anhidridă maleică (pentru obținerea 6-APA din penicilina G) fie enzima din *Bovista plumbea* inclusă în fibrele de acetat de celuloză (pentru penicilina V).

Se pot folosi atât reactoare cu cuvă și cu recirculare (pentru neutralizarea acidului RCOOH format în reacția de hidroliză a penicilinelor), cât și reactoare-coloană umplute cu fibre.

Intr-o etapă ulterioară se îndepărtează proteinele din 6-APA (pentru a evita reacțiile alergice).

Procedeele cu celulele imobilizate sunt preferabile celor care folosesc enzima pură, îndepărtându-se etapa de extracție și purificare a biocatalizatorului și asigurându-se astfel stabilitatea sa în timp.

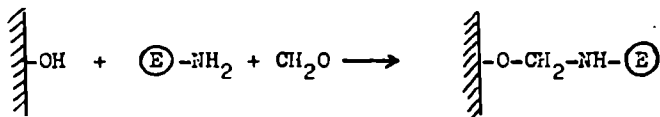
După izolarea și purificarea 6-APA, urmează obținerea penicilinelor de semisinteză, prin N-acilare, în prezența 6-penicilinazei (PGA).

PGA se mai poate folosi și în alte scopuri, ca:

- scindarea racemicilor derivaților fenil-acetilați ai aspartamului și carnitinei;
- reacții de protecție și deprotecție în chimia zaharurilor și aminoacizilor;
- N-acilarea altor nuclee antibiotice etc.

Ca surse microbiene pentru PGA se utilizează *Escherichia coli* și *Kluyvera citrophila*.

În majoritatea cazurilor în care se lucrează cu enzima pură este necesară stabilizarea sa suplimentară; în 1990 s-a descoperit un procedeu de stabilizare prin reticularea PGA pe agaroză, cu formaldehidă:

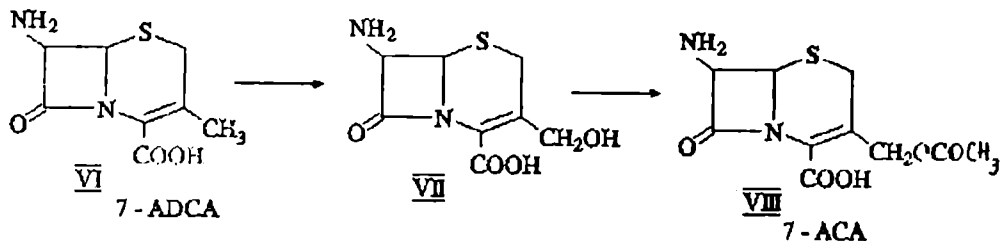


Pentru a se evita legarea enzimei printr-un singur punct (CH_2O fiind un agent de reticulare monofuncțional), ceea ce ar conduce la agregate puțin stabile, se folosește o cantitate mai mare de CH_2O , aductul obținut inițial tratându-se suplimentar cu formaldehidă. Legarea enzimei de suport prin mai multe puncte îi modifică structura terțiară prin distorsionare, dar scăderea

activității biocatalizatorului este compensată de creșterea stabilității sale termice. Aductul suport-enzimă astfel obținut este operațional la pH = 7-7,5.

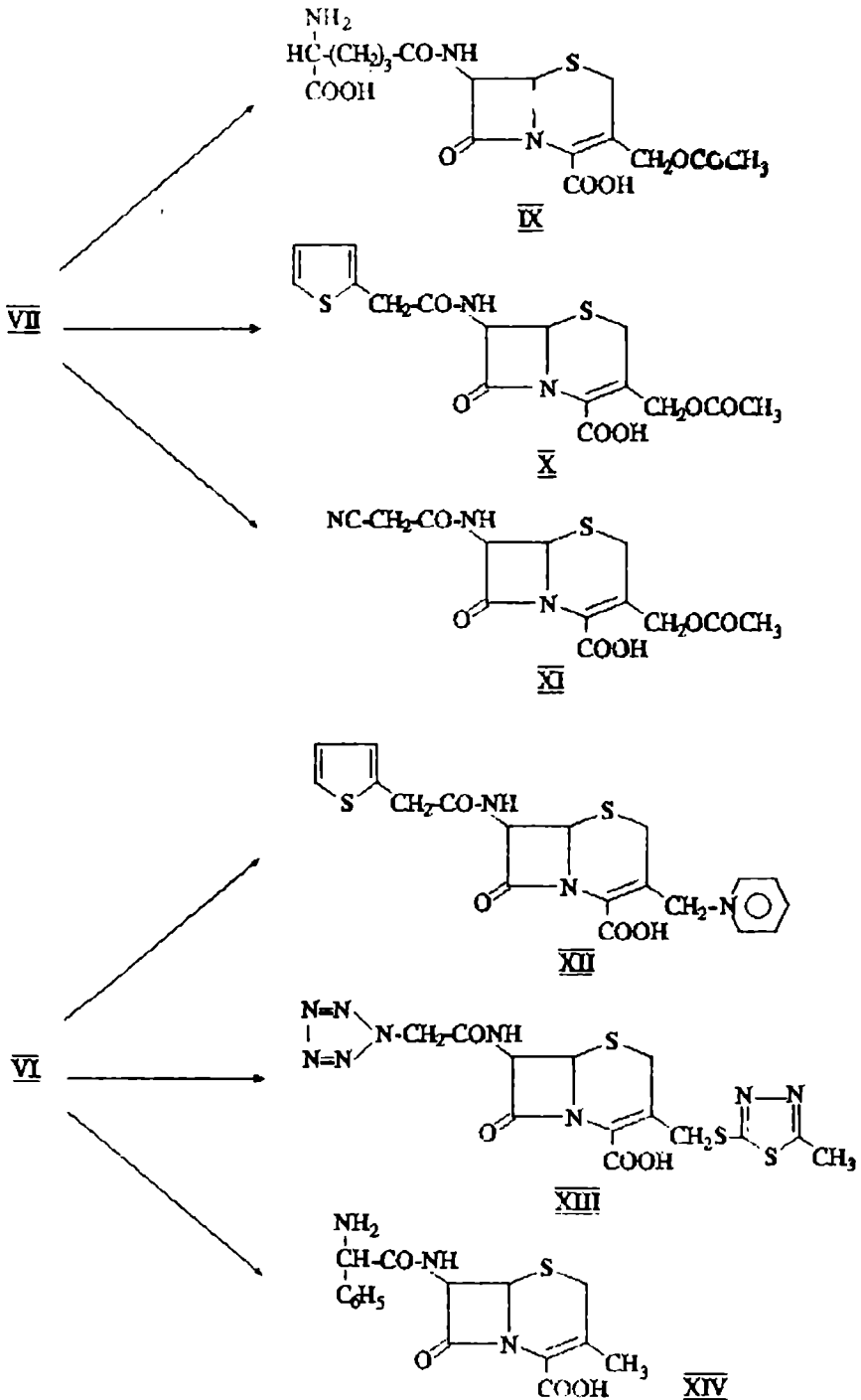
III.5.2.2. Semisinteze de cefalosporine

Cefalosporinele se pot obține din peniciline, fie prin semisinteză chimică, fie pe cale fermentativă. În ambele cazuri este vorba în primul rând de o lărgire a ciclului de cinci atomi (tiazolidinic) din molecula penicilinei, la ciclul de 6 atomi (dihidrotiazinic). În cursul reacției de lărgire a ciclului de cinci atomi are loc și o dezacilare a grupării amino din ciclul de patru atomi al penicilinelor, obținându-se acidul 7-amino-dezaceticefalosporanic (VI)-7ADCA, intermediar în semisinteza cefalosporinelor:



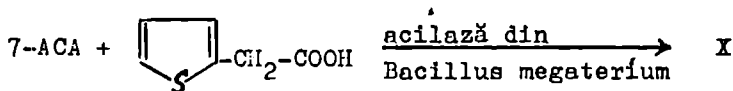
Din 7-ADCA se obțin apoi: acidul dezacetil-7-aminocefalosporanic (VII) și apoi acidul 7-aminocefalosporanic (VIII) -7-ACA.

Atât compusul (VII) cât și 7-ADCA (VI) reprezintă la rândul lor intermediari pentru: cefalosporina C (IX), cefalotina (X), cefacetil (XI) și respectiv: cefalolisina (XII), cefazolina (XIII), cefalexina (XIV):



Metoda enzimatică de semisinteză a cefalosporinelor prezintă avantajul față de metodele chimice de acilare prin aceea că nu necesită protejarea grupărilor reactive.

Cercetătorii japonezi au propus un procedeu enzimatic de obținere a 7-ADCA din 7-fenilacetil-7-ADCA cu o enzimă deacilantă din *Bacillus megaterium*, imobilizată prin adsorbție pe celit. Acest aduct suport-enzimă se introduce într-un reactor-coloană. Acilaza din *Bacillus megaterium* astfel imobilizată mai poate fi utilizată atât pentru reacția inversă (acilarea 7-ACA sau a 7-ADCA). De exemplu cefalotina (X) se poate obține din 7-ACA (VIII) și acid 2-tiofenacetic, prin trecerea continuă a soluției de substrat prin coloana umplută cu acilază imobilizată:

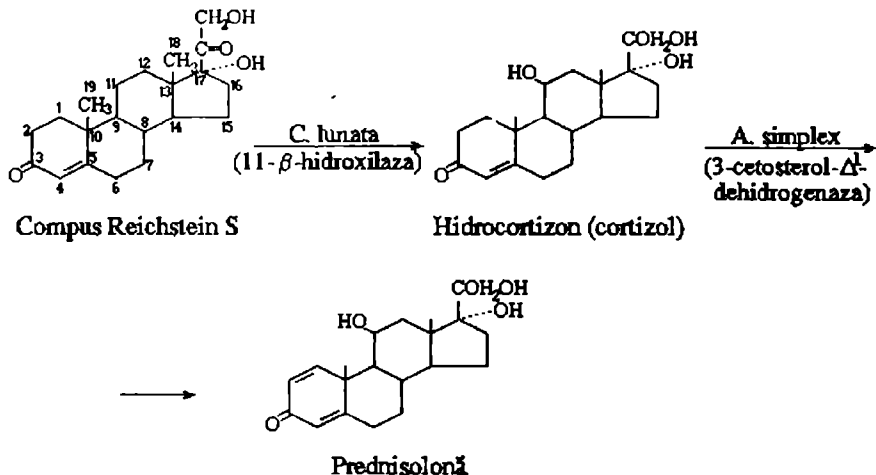


III.5.3. Obținere de steroide

Pentru reacțiile steroidelor, nu este necesară utilizarea enzimelor pure. Majoritatea acestor enzime necesită cofactori, astfel că se pot folosi cu succes celulele microbiene. Aplicarea pe scară largă a metodei enzimatică prezintă însă inconvenientul că în celule există și alte enzime, care pot cataliza și reacții nedorite.

Imobilizarea celulelor combină avantajele enzimelor componente cu cele ale fermentației microbiene.

În transformările steroidelor se disting două reacții importante: dehidrogenarea Δ^{1-2} a 3-cetosteroidelor și 11- β -hidroxilarea:



Cele două microorganisme, *Arthrobacter simplex* și *Curvularia lunata* se includ în gel de poli-acrilamidă reticulat cu BIS. Tehnica imobilizării este simplă, polimerizarea se face în perle și se obțin particule cu o bună capacitate de retenție a activității enzimatică (40% pentru *Arthrobacter simplex* pentru concentrații cu un conținut bacterian de 10% în greutate). Efectul de protejare a activității enzimatică la un conținut înalt de bacterii este datorat stabilității mecanice crescute a gelului.

Particulele obținute pot fi folosite în reactoare-coloană cu condiția ca debitul de alimentare al coloanei să fie moderat, pentru a preveni tasarea materialului.

Polimerizarea în perle prezintă însă dezavantajul utilizării solvenților organici care pot dezactiva cofactorii prezenți în microorganisme. Dezavantajul se înlătură folosind drept cofactor menadionă (2-metil-1,4-naftochinonă), care suplinește pierderea activității Δ^1 -dehidrogenazice a celulelor de *Arthrobacter simplex*.

Gelul cu *Arthrobacter simplex* imobilizat este stabil la 20°C, după 120 de zile activitatea enzimatică scăzând la 80%

față de activitatea preparatului proaspăt.

Ambele preparate enzimactice, cu *Arthrobacter simplex* și cu *Curvularia lunata* incluse în geluri sunt capabile de a determina completa transformare a substratelor.

Din compararea eficienței catalitice a celulelor imobilizate și a enzimelor imobilizate, rezultă o activitate Δ^1 -dehidrogenază a 3-cetosteroidelor net superioară pentru celule. O comportare similară se observă la activitatea 11- β -hidroxilază pentru *Curvularia lunata*.

Prednisolonul se mai poate obține și printr-o $\Delta^{1,2}$ -dehidrogenare cu celule de *Corynebacterium simplex* incluse în membrane de de collagen (pentru obținerea prednisolonului din hidrocortizon într-un reactor-coloană).

Celule bacteriene incluse în geluri de poliacrilamidă pot transforma: Δ^{5-3} β -hidroxi-; Δ^{5-3} β -acetăxi- și Δ^4 -3-cetosteroidele în $\Delta^{1,4}$ -3-cetosteroides.

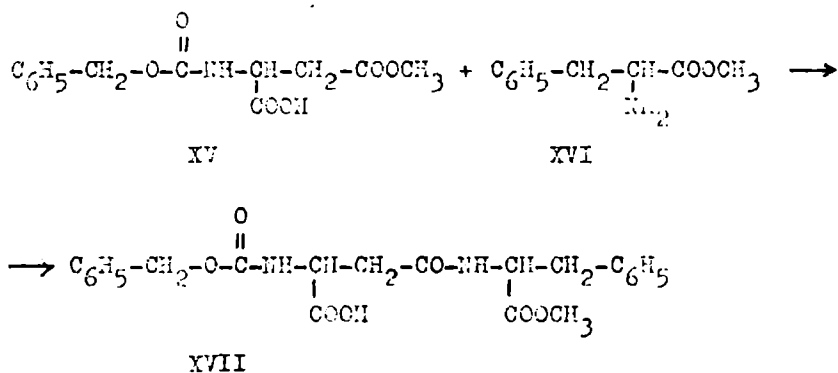
III.5.4. Sinteze de peptide

Una dintre cele mai eficiente metode de sinteză a peptidelor folosește o protează imobilizată, într-un solvent nemiscibil cu apa; datorită faptului că operația poate fi continuă, echilibrul de reacție se deplasează spre formarea peptidei.

Enzimele utilizate se imobilizează prin adsorbție pe un suport-rășină schimbătoare de ioni (amberlit), urmată de reticulare cu glutaraldehidă sau prin encapsulare.

De exemplu, un precursor al aspartamului, (esterul metilic al N-benziloxicarbonil-L-aspartil-L-fenilalaninei, XVII) se obține din acid N-benziloxicarbonil-L-aspartic (XV) și esterul

metilic al L-fenilalaninei (XVI) după o reacție propusă în 1969 de Isowa și colaboratorii.



Metodele japoneze de fabricare a acestui precursor (XVII) al aspartamului utilizează de regulă două proteaze:

a) α -Chimotripsină encapsulată în microcapsule reversibile. Sistemul de microcapsule se prepară prin injectarea unei soluții de N-benziloxycarbonilaspartat (XV) și chimotripsină în tampon-carbonat într-o soluție care conține esterul metilic al L-fenilalaninei într-un amestec de solvenți nemiscibili cu apa (heptan + cloroform) și un agent tensioactiv (bromură de tetradecil-trimetilamoniu).

b) Se poate folosi și termolisină adsorbită pe schimbători de ioni (Amberlit XAD-7) și reticulată cu glutaraldehydă. Termolisina, având un număr mai mic de grupe NH_2 , se folosesc soluții concentrate de enzimă și de glutaraldehydă. Particulele obținute se pot utiliza pentru umplerea unor reactoare-coloane din sticlă.

O altă variantă folosește termolisină adsorbită pe amberlit și reticulată cu glutaraldehydă, într-un solvent nemiscibil cu apa (acetat de etil). Aductul obținut se introduce fie în reactor-tanc cu agitare, fie în reactoare-coloane. Cu reactorul-coloană se operează la 25°C (pentru a evita tasearea), în timp ce cu

reactorul-tanc cu agitare se poate lucra la 40°C. Într-un asemenea reactor randamentul este de 93%, iar enzima nu trebuie stabilizată cu CaCl_2 , deoarece în condițiile de lucru ioni Ca^{2+} din enzimă nu se pierd. În schimb, în cazul reactorului-coloană (cu pat compact), stabilitatea enzimei imobilizate trebuie asigurată prin adăugare de CaCl_2 la substrat; în lipsa CaCl_2 randamentul descrește la 75% după 185 ore și apoi la 50%. Totuși reactorul coloană prezintă avantajul posibilității de a se opera în flux continuu.

III.5.5. Alte sinteze de compuși organici

III.5.5.1. Obținere de alcooli optic activi

A. Sinteza asimetrică

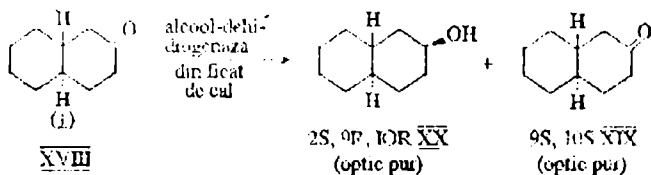
Dehidrogenaza alcoolului extrasă din ficatul de cal are proprietatea de a cataliza reacțiile de oxidoreducere a unor substraturi de interes pentru chimistul organician, ca: aldehide, cetone mono- și biciclice, cetone steroide, ca și alcoolii lor corespunzători, primari și secundari.

În laborator se pot astfel efectua atât reacții de oxidare a alcoolilor, cât și de reducere a cetonelor, în fiecare caz utilizându-se un sistem de coenzime recirculabil.

a) Reducerea stereospecifică a cetonelor

Un asemenea exemplu este reducerea stereospecifică a (\pm) trans-2-decalonei (XVIII) la 2S, 9R, 10R-trans-2-decalol (XX), izolându-se enantiomerul nereactiv 9S, 10S (XIX).

Reducerea este enantiotopic specifică pentru grupa carbonil a enantiomerului 9R, 10R (XIX):

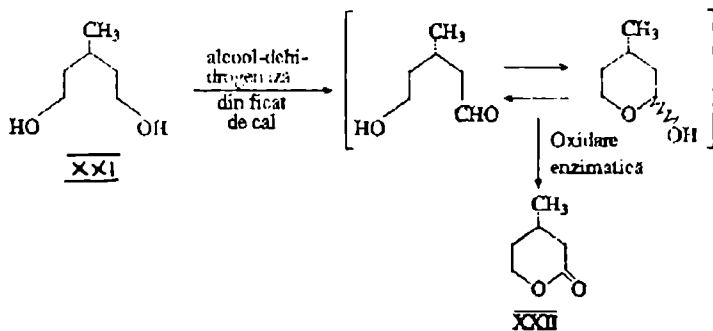


Drept ~~coenzimă~~ se utilizează NAD^+ .

b) Oxidarea enantiotopic-specifică a alcoolilor

În sinteza asimetrică are o mare importanță deosebirea de reactivitate dintre două grupări enantiotopice.

Astfel, este imposibil a se realiza altfel decât enzimatic transformarea diolului XXI la lactona XXII, datorită specificității totale virtuale pentru grupa pro-S-hidroxietil:



Se utilizează coenzima NAD^+ în prezența flavin-mononucleotidei (pentru reoxidarea NADH format).

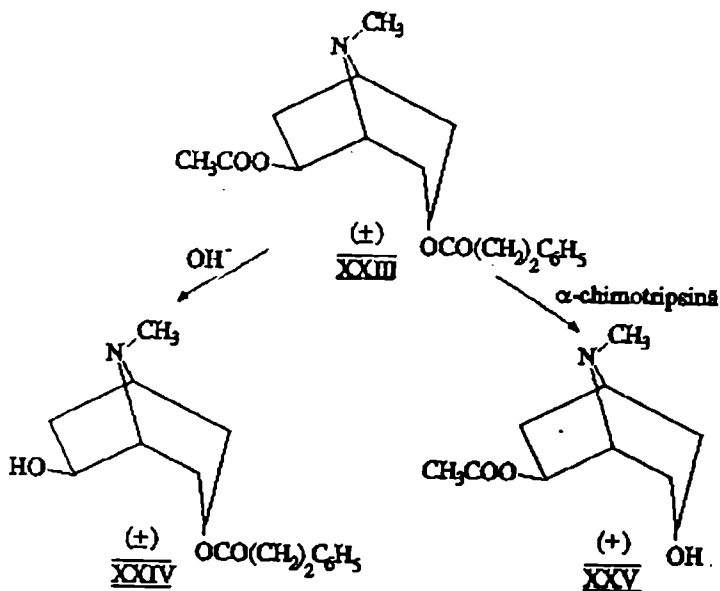
Se poate lucra atât cu enzima solubilă, cât și cu cea imobilizată. Co-immobilizarea enzimei și a coenzimelor se face pe membrane de „Hollow-fiber” din acetat de celuloză cu diametrul

lumenului de aproximativ 200 μm , pe care acestea se rețin complet, cu o bună permeabilitate dialitică față de substrat cu masă moleculară joasă. Pentru cofactori macromoleculari se pot folosi „Hollow-fiber” cu masă moleculară mai mare, care nu impun restricții în permeabilitatea substratului; în acest caz însă parametrii cinetici ai reacției enzimice sunt mai reduși decât în cazul utilizării cofactorului solubil, neimobilizat.

B. Obținere de alcooli optic activi prin hidroliza enzimatică enantiospecifică

α -Chimotripsina este folosită frecvent pentru hidroliza selectivă a esterilor în cazul utilizării unor grupe protectoare.

Astfel, specificitatea enzimei pentru grupele aromatice permite utilizarea sa în cazul compușilor care conțin grupe $-\text{OH}$ sau $-\text{NH}_2$ protejate. O ilustrare a acestei aplicații este hidroliza diesterilor tropanului:



În compusul inițial (XXIID) cele două grupări esterice sunt foarte asemănătoare; totuși, la hidroliză alcalină datorită factorilor sterici reacția are loc selectiv în poziția 6, obținându-se 6-⁵-hidroxiderivatul (XXIV). Pe de altă parte specificitatea aromatică a enzimei face ca hidroliza biocatalizată să conducă exclusiv la (+)-3 α -hidroxiderivatul (XXV).

În afară de esteraze se mai pot folosi și lipaze.

La pag. 86 este descris un reactor cu lipază pancreatică bovină immobilizată pe „Hollow-fiber”, utilizat la dedublarea unor amestecuri racemice de glicidil-butirați.

III.5.5.2. α -Cetoacizi

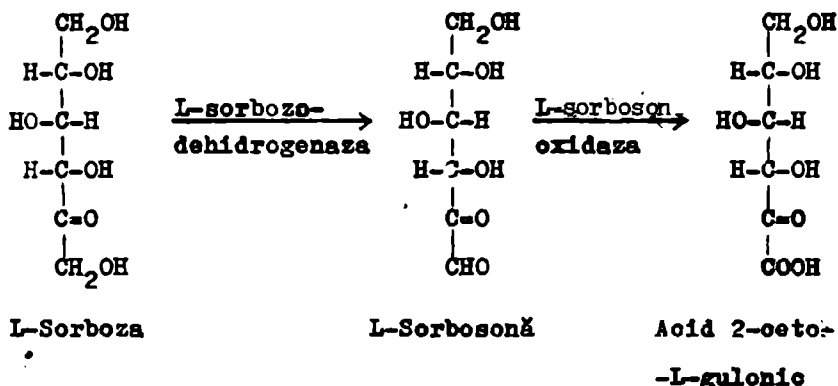
α -Cetoacizii sunt importanți pentru terapia uremiei cronice. Prepararea lor pe cale chimică din aminoacizi esențiali este foarte complicată și decurge cu randamente mici. Utilizând aminoacid-oxidaze se pot obține pe cale enzimatică majoritatea α -cetoacizilor. Deoarece însă costurile oxidazelor comerciale sunt foarte ridicate, s-a sugerat ideea utilizării unui sistem de două enzime format din L-aminoacidoxidaza din *Crotalus adamanteus* (șarpele cu clopoței) și catalaza co-immobilizate pe sticlă alchilaminată. Se alege oxidaza, deoarece ceto-analogii triptofanului și histidinei, care nu pot fi preparați prin sinteză chimică, se obțin sub acțiunea acestei enzime. Prezența catalazei mărește stabilitatea și deci activitatea oxidazei, datorită degradării rapide a H_2O_2 (produs secundar), cu regenerarea simultană a oxigenului utilizabil în reacția de oxidare. Se reduce astfel riscul reacției secundare a cetoacidului format cu H_2O_2 acumulată din reacție.

Din punct de vedere cinetic, un reactor-cuvă cu agitare

apare mai favorabil decât un reactor cu pat compact, în al doilea caz producându-se inhibarea enzimei printr-un contact prelungit cu substratul.

Preparatele enzimatiche astfel obținute sunt suficient de active și stabile, pentru un număr mare de experiențe.

Acidul 2-ceto-L-gulonic (intermediar în sinteza vitaminei C) se obține industrial prin oxidarea microbiană a L-sorbozei prin intermediarul L-sorbosonă, fiind necesare două enzime:



Celulele de *Gluconobacter melanogenus* incluse în gel de poli-acrilamidă sunt eficiente pentru etapa transformării L-sorbozei în L-sorbosonă. Deoarece în aceste celule activitatea L-sorbosonoxidazei este relativ scăzută, pe măsură de L-sorbosona se acumulează, se atinge o concentrație critică la care are loc dezactivarea L-sorbosonoxidazei.

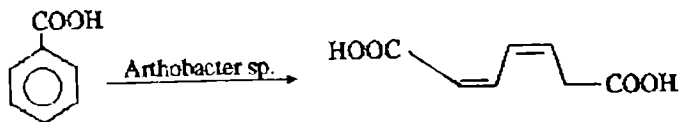
III.5.5.3. Alți acizi carboxilici

a) Acidul acetic

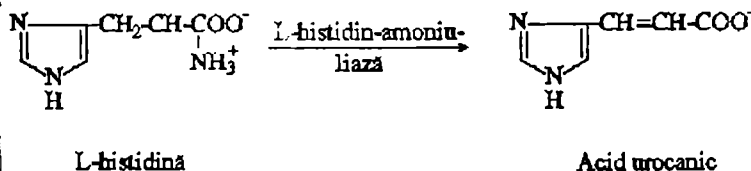
Un exemplu dintre multe altele pentru sinteza acidului acetic din CO₂ și H₂ este metoda japoneză (compania Daisel) care

folosește *Acetobacterium simplex* într-un reactor cu membrană și cu agitare, cu un randament de maximum 141 g/l/zi.

b) Acidul cis-cis-muconic se obține din acidul benzoic (compania Mitsubishi Kasei) cu *Arthrobacter* sp. liber sau imobilizat, într-un reactor cu membrană:



c) Acidul urocanic, un agent-ecran anti UV se obține din L-histidină sub acțiune L-histidin-amoniu-liazei microbiene, conținută în celule de *Achromobacter liquidum*, care se includ în gel de poliacrilamidă:



Înainte de utilizare celulele se tratează la 70°C timp de 30 minute pentru inactivarea urocanazei care transformă acidul urocanic în acid imidazolon-propionic.

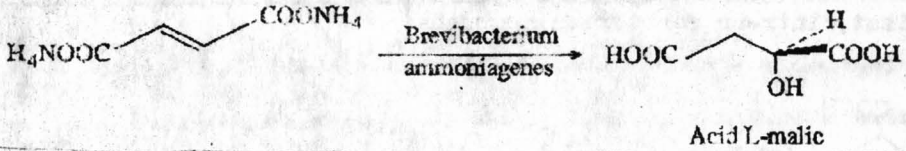
Celulele imobilizate se introduc într-o coloană prin care se trece o soluție apoasă de L-histidină (pH ~9) ce conține ioni de Mg²⁺. Se lucrează la 37°C. Din efluent acidul urocanic se izolează cu randament de peste 90%. Ioni Mg²⁺ asigură menținerea activității enzimatică (timp de înjumătățire = 180 zile la 37°C).

d) Sinteze de acizi L-hidroxicarboxilici

- Acidul L-malic este utilizat pentru tratarea afecțiunilor hepatice.

Un procedeu mixt, nipono-finlandez de fabricare în flux

continuu a acidului L-malic din fumarat de amoniu, utilizează celule de *Brevibacterium ammoniagenes* imobilizate prin includere în gel de poliacrilamidă. Celulele conțin fumarază:



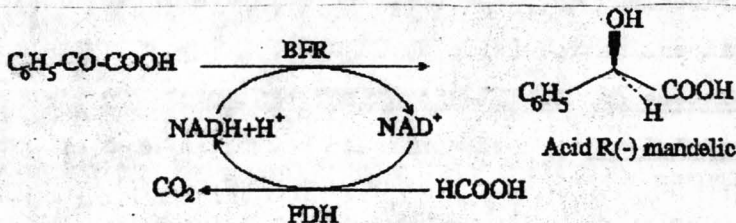
-Acidul R (-) mandelic este un intermediar valoros pentru industria farmaceutică. Sinteza sa asimetrică se bazează pe reacția de reducere a acidului benzilformic.

Se știe că reacțiile enzimatiche de oxido-reducere necesită cofactori (NADH sau NADPH). În plus, dehidrogenazele sunt mai puțin stabile decât alte enzime. În scopuri industriale, a fost deci necesară punerea la punct a unor procedee de stabilizare a acestor enzime, dar și de utilizare a unor preparate enzimatiche care să asigure regenerarea cofactorilor.

Un astfel de exemplu îl constituie un procedeu japonez care utilizează două substraturi (benzilformiat și formiat) și un sistem de două enzime co-imobilizate, plus o coenzimă nativă (NAD⁺).

Cele două enzime sunt:

- dehidrogenaza abreviată BFR, izolată din *Streptococcus faecalis* IFO 12964 și
 - formiat-dehidrogenază (FDH), separată din *Candida boidinii*.
- Schema generală a transformării va fi:



Cele două enzime se co-immobilizează printr-o metodă fizică (inclusiv într-un gel insolubil de copolimeri acrilici), folosind „metoda picăturilor” (vezi vol. I).

Astfel, BFR și FDH se suspendă împreună cu 8% dextrină și 1% BSA într-o cantitate minimă de tampon fosfat 0,1 M, pH = 7,5. După uscare, gelul format se transformă în pulbere.

Separat, se prepară o soluție de monomeri acrilici (polietilenglicol-diacrilat, BIS și 2-hidroxietil-acrilat) în metilcelosolv saturat cu azot. Soluția astfel obținută se amestecă cu pulberea de enzime în prezența peroxidului de benzoil (inițiator de polimerizare), la 35°C în atmosferă de N₂. Gelul format se lasă să se matureze, timp de 5 ore la 35°C după care se transformă în foi subțiri și se spală bine cu o soluție tampon fosfat 0,1 M, pH = 7,5.

Co-immobilizatul obținut se folosește la umplerea unui reactor-coloană prin care se pompează soluția de substrat. Soluția de substrat conține benzoil-formiat de sodiu, formiat și NAD⁺ în tampon-clorhidrat de etilendiamină 0,05 M, pH = 7,5. Pentru a se asigura o reducere eficientă a NAD⁺ la NADH, concentrația formiatului trebuie să fie de 3 ori mai mare decât cea a benzoil-formiatului.

Reactorul, având o productivitate constantă de 90%, este funcțional timp de 2 luni. NADH se recuperează din amestecul brut de reacție prin trecerea acestuia printr-o membrană osmotică reversibilă, care lasă să treacă doar R (-) mandelatul, reținând coenzima.

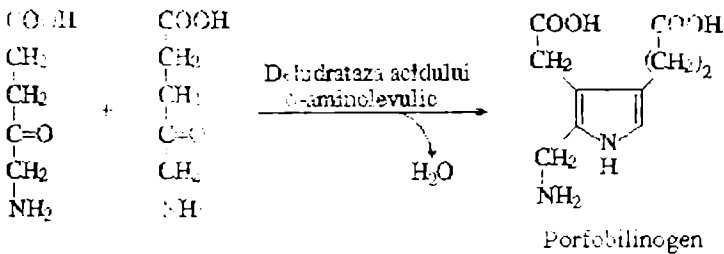
Un alt procedeu de obținere a acidului R (-) mandelic din acid benzoilformic utilizează celule de *Streptomyces faecalis* co-immobilizate cu NAD prin encapsulare.

III.5.6. Obținere de reactivi pentru sinteze fine

Enzimele imobilizate pot fi folosite pentru sinteza majorității compuşilor biologic activi ca: porfobilinogen, glutation, coenzime, compuși marcați izotopic etc.

III.5.6.1. Sinteza porfobilinogenului

Dehidrataza acidului δ -aminolevulinic catalizează sinteza porfobilinogenului pornind de la două molecule de acid δ -aminolevulinic:



Pirolul substituit astfel obținut este precursorul porfirinelor, clorofilelor și vitaminei B₁₂.

Dehidrataza acidului δ -aminolevulinic din ficatul bovin are o masă moleculară de 285.000 Da și este compusă din 8 subunități, fiecare din ele cu o masă de 35.000 Da.

Substratul formează cu enzima o bază Schiff. Enzima extrasă din ficatul bovin și purificată se imobilizează pe Sepharoză 4B activată cu BrCN, iar aductul obținut se introduce într-o oclonă. Nu se recomandă procedeul „batch” pentru că enzima este puternic inhibată de produsul de reacție.

Se pot folosi și celule de *Chromatium vinosum* pretratate cu

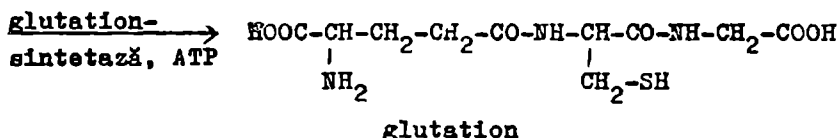
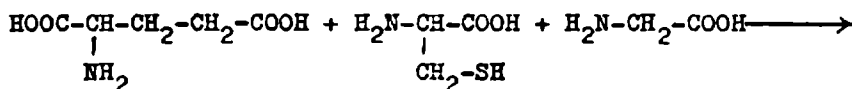
etanol (pentru inhibarea urogen-sintetazei).

Produsul de reacție poate fi marcat cu izotopi (^{13}C sau ^{15}N) și transformat în porfirine și compuși înrudiți utilizați în studii spectroscopice (rezonanță magnetică nucleară, spectroscopie Raman ou laser).

III.5.6.2. Sinteza glutatationului (γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina)

Numeroase brevete descriu sinteza glutatationului din glutamat, cisteină, glicină și ATP, cu glutatation-sintetază immobilizată.

Enzima extrasă din *Saccharomyces cerevisiae* și purificată se imobilizează covalent pe un suport activat. Randamentele în glutatation sunt mai mari decât în procedeele cu enzimă liberă.



III,5.6.3. Obținere de cofactori

Metoda sintezei chimice rămâne cea mai accesibilă pentru multe coenzime, obținerea acestora prin biosinteză necesitând sisteme enzimatiche complexe.

De exemplu, sinteza coenzimei A din acid pantotenic necesită un sistem de 5 enzime. Această sinteză se poate face cu celule de *Brevibacterium ammoniagenes* incluse în gel de poliacrilamidă

III.5.6.4. Sinteze de compusi radiomarcați

Compușii farmaceutici care conțin izotopi cu viață scurtă se utilizează în metodele externe de investigare clinică. Dacă sintezele chimice sunt relativ lente și nestereospecifice, conducând la racemici, sintezele enzimatică sunt rapide și stereospecifice.

Un dezavantaj al sintezelor enzimatică este impurificarea produsului de reacție cu substanțe antigenice sau pirogenice, dar se poate înlătura prin imobilizarea enzimei care este astfel separată de alte proteine.

În acest fel se pot sintetiza de exemplu:

- ^{13}N -L-alanina (^{13}N are $t_{1/2} = 10$ min.) obținută în 4 minute cu un sistem de două enzime imobilizate;

- acidul ^{13}N -L-glutamic se sintetizează într-o singură etapă trecând o soluție de $^{13}\text{NH}_3$ și octoglutarat printr-o coloană cu glutamat-dehidrogenaza imobilizată pe perle de silice activată cu un derivat de N-hidroxisuccinimidă. Eluatul obținut se amestecă cu pirivat și se trece prin a doua coloană ce conține transaminază imobilizată.

III.5.7. Utilizarea enzimelor imobilizate pentru reacții în mediu neapoi

III.5.7.1. Metode de modificare a enzimelor

În unele cazuri, în care reacțiile enzimatică trebuie conduse fie în solvenți organici anhidri, fie în soluții bifazice apă-solvent organic nemiscibil cu apa, este necesar ca biocatalizatorul să fie modificat, făcându-l solubil în solvenți lipofili.

Aceasta se realizează prin fixarea covalentă a unui poli-etilenglicol (PEG) cu masă suficient de mare, pe molecula enzimei.

Ca urmare rezultă o serie de consecințe:

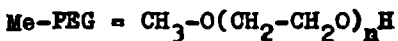
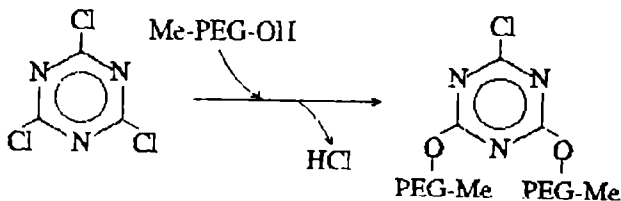
- enzimele devin solubile în solvenți organici ca: benzen, toluen, CHCl_3 , 1,1,1-triclorețan, tricloroetilenă etc;
- unele proprietăți importante ale enzimelor, ca: stabilitatea, activitatea și specificitatea pot fi alterate;
- se simplifică studiile spectroscopice asupra conformației enzimelor.

Cel mai des se folosește monometil-PEG cu masa moleculară medie de 5000.

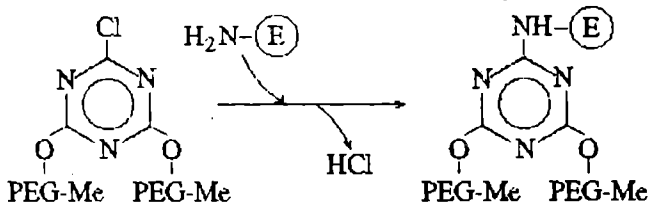
Se pot folosi mai multe metode pentru legarea covalentă a polimerului PEG pe suprafața enzimei, toate implicând reacția grupelor amino din poziția Σ a resturilor de lizină, care este preferabil să fie plasate pe suprafața moleculei biocatalizatorului.

Etapale acestui tip de imobilizare vor fi:

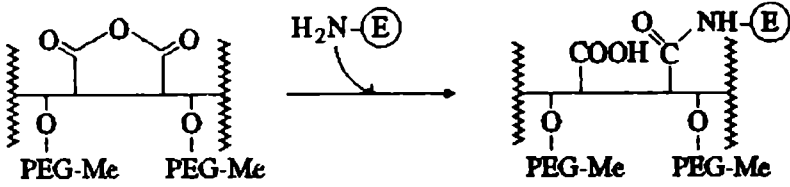
1) Activarea Me-PEG cu clorură de cianuril:



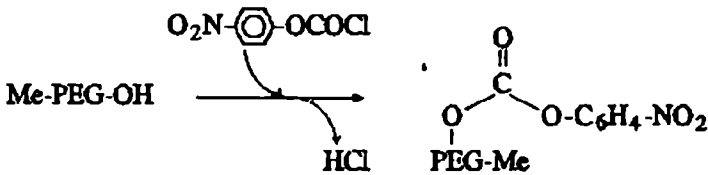
2) Legarea covalentă a enzimei:



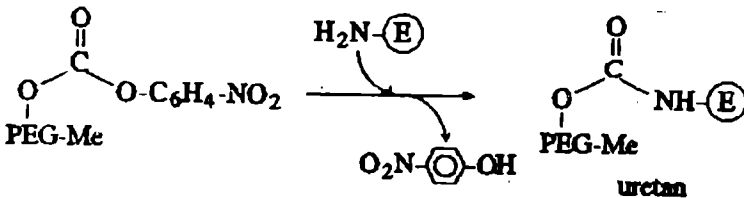
O variantă a metodei este utilizarea unui copolimer sintetic al anhidridei maleice, care conține grupări anhidridă, reactive:



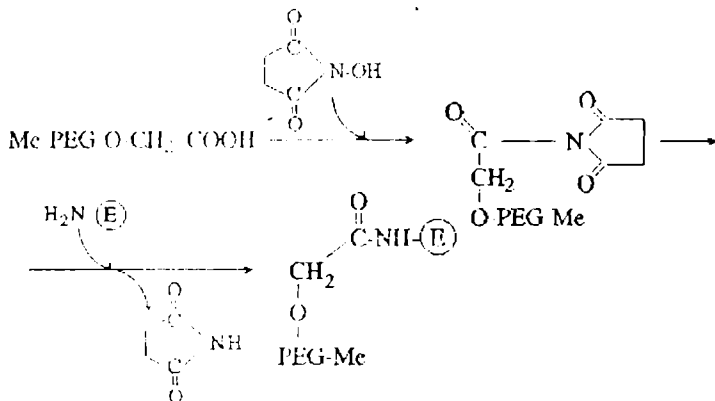
Metil-poli-etilenglicolul mai poate fi legat de molecula enzimei prin intermediul unui derivat uretanic, obținut cu un cloroformat reactiv:



Carbonatul mixt astfel format va fixa enzima prin înlocuirea grupei reactive p-nitrofenil cu grupa $-\text{NH}_2$ a enzimei:



O altă variantă pentru fixarea enzimei utilizează α -metil- $-\omega$ -carboxi-PEG, activat cu N-hidroxi-succinimidă:



Tehnica de insolubilizare în apă a enzimelor poate fi utilizată la majoritatea proteinelor, inclusiv hidrolazele (lipaze, proteaze), enzime redox (dehidrogenaze, oxidaze) și transferaze (glucozidaze).

Activitatea enzimatică remanentă a preparatelor este în general ridicată (50-80%), majoritatea enzimelor devenind solubile în solvenți organici după atașarea a 5-10 lanțuri de PEG/moleculă.

Enzimele modificate cu PEG pot fi recuperate din soluții de benzen sau toluen prin precipitare cu eter de petrol sau hexan.

III.5.7.2. Tipuri de reacții enzimatică care decurg în mediu neapós

A. Reacții în solvenți organici

Majoritatea reacțiilor enzimatică au loc în mediu apos, solvenții organici producând de regulă denaturarea biocatalizatorilor. În unele cazuri însă, reacțiile în mediu apos prezintă dezavantaje ca:

- dificultatea îndepărtării apei din produsele de reacție (datorită punctului său de fierbere ridicat);
- riscul apariției unor reacții secundare nedorite

(hidroliză, racemizare, polimerizare, descompunerea produsilor de reacție) facilitate de prezența apei etc.

În mediul lor natural, multe enzime acționează în condiții hidrofobe, în prezența unei membrane, sau legate de ea.

Din aceste considerente, în unele cazuri în care prezența apei poate denatura enzima, se poate lucra într-un solvent organic care să conserve activitatea sa biocatalitică.

Solvenții complet anhidri nu pot conserva activitatea enzimatică, urmele de apă fiind necesare pentru cataliză. Problema este câtă apă trebuie să conțină enzima pentru a-și conserva activitatea?

Astfel, se știe că α -chimotripsina, cu 50 molecule de apă/moleculă de enzimă rămâne activă, ceea ce e mult mai puțin decât necesar pentru a forma un strat monomolecular de apă în jurul enzimei. Subtilisina sau unele lipaze se comportă similar în prezența urmelor de apă. În cazul altor enzime este necesară o cantitate mult mai mare de apă pentru a-și conserva activitatea. De exemplu, polifenoloxidaza necesită prezența a $3,5 \cdot 10^7$ molecule apă/moleculă enzimă.

În sistemele biologice, majoritatea apei (>98%) servește ca solvent („apă liberă”), numai o cantitate mică fiind reținută pe suprafața enzimei („apă legată”).

Prezența „apei legate” este un element crucial pentru structura și activitatea enzimei.

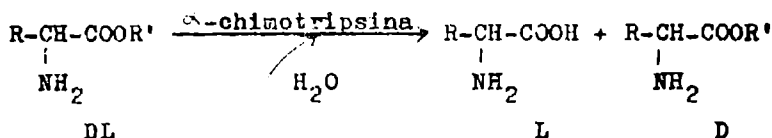
De aceea, chiar în cazul catalizei enzimatică în solvenți organici poate fi înlocuită cu aceștia numai „apa liberă”, fără a se altera condițiile din microvecinătatea moleculei de enzimă.

B. Reacții enzimatică în sisteme bifazice apă-solvent organic nemiscibil cu apa

Asemenea sisteme constau din două faze macroscopice,

conținând faza apoasă cu enzima dizolvată și o fază de solvent organic nepolar, preferabil lipofil și cu masă moleculară ridicată (hidrocarburi, eteri, esteri etc). Aceste sisteme prezintă avantajul distanțării biocatalizatorului de faza organică.

Un exemplu de reacție care decurge în sisteme bifazice apă : solvent lipofil este hidroliza enantiospecifică a racemicilor esterilor α -aminoacizilor în prezența chimotripsinei:



Reacția de dedublare a unor racemici ai esterilor α -aminoacizilor în mediu apos prezintă o serie de dezavantaje ca:

- posibilitatea polimerizării esterilor racemici în prezența chimotripsinei;
- efectul inhibitor al esterului D-aminoacidului asupra enzimei;
- caracterul nespecific al hidrolizei în mediu apos.

Un număr relativ mic de esteri ai D,L - α -aminoacizilor (esterul metilic al DL-metioninei sau al DL-treoninei etc) pot fi supuși scindării enantiospecifice cu chimotripsină în mediu apos.

În schimb, dacă se lucrează într-un sistem bifazic apă-solvent nemiscibil cu apa se pot scinda cu bune randamente o serie de compuși ca: esterul etilic al DL-fenilalaninei (în apă-toluen), esterul metilic al DL-fenilalaninei (în apă-acetat de etil) etc.

În asemenea cazuri faza organică servește ca solvent pentru substrat, iar faza apoasă ca solvent pentru enzimă. Totodată solventul organic nu trebuie să dizolve produsul de reacție (L- α -aminoacidul).

De exemplu, în cazul esterului metilic al D,L-fenilalaninei, metoda hidrolizei în sistem bifazic conduce la un randament de 98% în L-fenilalanină.

G. Reacții cu enzime suspendate în solvenți organici monofazici

Prima reacție enzimatică de acest fel a fost realizată în 1900 de J.H.Kastle și A.S.Loevenhardt. Enzimele pot fi transformate în suspensii în solvenții organici în care sunt insolubile. Din motivele arătate mai înainte, pentru ca o enzimă să-și păstreze activitatea catalitică este necesar ca molecula sa să-și conserve „apa legată”. De aceea solvenții organici utilizați nu trebuie să fie complet anhidri, deoarece pot extrage „apa legată” de pe suprafața moleculei enzimei. Reacțiile enzimatică se vor petrece cu bune randamente dacă solventul organic va conține o cantitate mică de apă (sub 2%). Pentru o asigurare în plus, solvenții pot fi saturați cu apă înainte de efectuarea reacției.

În aprecierea compatibilității dintre activitatea enzimatică și hidrofobicitatea solvenților se iau în considerare: parametrul de solubilitate Hildebrandt (δ), constanta dielectrică (ϵ) și momentul de dipol (μ). Cele mai sigure rezultate se obțin utilizând logaritmul coeficientului de partiție ($\log P$) a unui solvent dat între 1-octanol și apă (tabelul nr. 22 și nr. 23).

Consultând aceste tabele se observă din valorile $\log P$ că solvenții organici miscibili cu apa și hidrofilii (DMF, DMSO, acetonă, alcoolii inferiori) sunt incompatibili, pe când în solvenții lipofili nemiscibili cu apa (alcoani, eteri, arene, haloalcoani) se conservă o activitate catalitică înaltă a enzimei, deoarece asemenea solvenți nu au o afinitate pentru apa de pe suprafața biocatalizatorului.

Tabelul nr. 22

Compatibilitatea solvenților cu activitatea enzimatică

log p	Miscibilitate cu apa	Efecte asupra activității enzimelor
-2,5 la 0	Complet miscibil	Se pot utiliza pentru solubilizarea substratelor lipofile în concentrații de până la 50% (V/V), fără a afecta enzima
0 la 2	Parțial miscibil	Utilizări limitate datorită deactivării rapide a enzimei
2 la 4	Slab miscibil	Determină o distorsiune slabă a moleculei enzimei; se folosesc cu precauție deoarece activitatea nu este predictibilă
>4	Nemiscibil	Nu determină distorsiuni ale enzimei și asigură o înaltă retenție a activității.

Tabelul nr. 23

Valori ale lui log P pentru solvenți uzuali

Solvent	log P	Solvent	log P
1	2	3	4
Dimetilsulfoxid (DMSO)	-1,3	Acetat de amil	2,2
N,N-Dimetilformamidă (DMF)	-1,0	Toluen	2,5

Tabelul nr. 23 (continuare)

1	2	3	4
Etanol	-0,24	Octanol	2,9
Acetonă	-0,23	Dibutyleter	2,9
Tetrahidrofuran (THF)	0,49	CCl ₄	3,0
Acetat de etil	0,68	Ciclohexan	3,2
Acetat de propil	1,2	Hexan	3,5
Acetat de butil	1,7	Octan	4,5
CHCl ₃	2,0	Dodecan	6,6

Numai în unele cazuri în care se folosesc substraturi polare (compuzi polihidroxicilici) se pot lua în considerare și solvenții miscibili cu apa ca: dioxan, THF, 3-metil-3-pentanol sau piridina. Totuși și în acești solvenți majoritatea enzimelor se dezactivează; numai enzime extrem de stabile (ca subtilisina) se pot folosi în asemenea condiții.

Deoarece în mediu de solvenți organici grupele funcționale ale enzimei nu sunt ionizate și cum conformația enzimei și deci activitatea și specificitatea sunt influențate de pH, este necesar ca înainte de efectuarea reacției enzima solidă să fie obținută prin liofilizare sau prin precipitare dintr-un tampon cu pH optim.

Enzima suspendată în solvenții organici se folosește sub formă de imobilizat. Ca suporturi se utilizează mai frecvent: celitul, alginatul, silicagelul, suporturi organice neionice etc, iar ca metodă de imobilizare-adsorbția pe suprafața suportului,

care determină o mai bună distribuție a biocatalizatorului, sau includerea în alginat (pentru lipazele folosite în reacțiile de esterificare și transesterificare).

Activitatea catalitică remarcabilă a unor enzime solide în solvenți organici poate fi explicată prin proprietățile speciale ale proteinelor. Astfel, în contrast cu starea cristalină densă a substanțelor cu mase moleculare mici, proteinele solide au structuri delicate. Acestea prezintă suficientă mobilitate, pentru ca unitatea enzimatică să sufere modificări conformaționale minime în cursul formării complexului enzimă-substrat.

Suprafața totală a enzimelor în stare solidă este de ordinul $1,3 \cdot 10^6$ m²/Kg dacă sunt imobilizate pe silice și de 1/3 la 2/3 din volumul total dacă sunt imobilizate pe „Hollow-fiber” prin filare într-un solvent.

Dacă și agitarea este suficientă, substratul nu numai că va avea acces la suprafața centrilor activi ai enzimei, dar va și penetra în interiorul biocatalizatorului aflat în stare solidă.

În locul solvenților organici lipofili se pot folosi și gaze supercritice ca CO₂ ($T_{crit.} = 31^{\circ}C$ și $P_{crit.} = 73$ bari), care prezintă o solubilitate similară cu cea a hexanului; aceste gaze se pot utiliza ca mediu de dispersie sau co-solvent pentru conversia substanțelor organice lipofile.

Dintre enzime, hidrolazele sunt cele care pot servi sub formă de suspensii în solvenți lipofili sau în gaze supercritice mai ales pentru catalizarea reacțiilor de: esterificare, transesterificare, alcooliză și hidroliză.

Asemenea medii de dispersie prezintă o serie de avantaje ca: toxicitate redusă sau absența ei, ușurința cu care se îndepărtează, slaba lor vâscozitate (care asigură o difuzie înaltă a substratului la centrul activi ai biocatalizatorului).

În mod special în cazul gazelor supercritice este posibil un control al vitezelor lor de reacție, deoarece variații mici ale temperaturii sau presiunii modifică mult solubilitatea la punctul critic.

În concluzie, pentru a se asigura bunul mers al reacțiilor în cazul utilizării enzimelor în stare solidă (imobilizată) în medii organice cu conținut mic de apă, se iau în considerare următorii factori:

- solvenții hidrofobi sunt mai compatibili decât unii dintre cei hidrofili (log P pentru solvenții organici este mai mare de 3 sau 4 ori);

- stratul de „apă legată” de pe molecula enzimei poate fi conservat, mai ales dacă solvenții organici se presaturează cu apă;

- se pot asigura valori ale pH-ului din microvecinătatea enzimei identice cu pH-ul optim;

- sunt necesare agitarea sau sonicarea, pentru a mări difuzia substratului la suprafața biocatalizatorului.

III.5.8. Considerații generale asupra utilizării enzimelor imobilizate în sinteza organică

Din cele arătate până acum, reiese cu claritate superioritatea enzimelor imobilizate asupra celor solubile (libere) în diverse aplicații ce privesc sinteza și semisinteza unor compuși organici cu largă aplicabilitate.

La alegerea unei strategii de urmat pentru chimistul organician se vor lua în considerare mai multe aspecte.

III.5.8.1. Aplicabilitatea metodei alese

Deși utilizarea preparatelor de enzime imobilizate este net superioară operării cu enzimele solubile, există un număr relativ redus de biocatalizatori (proteaze, esteraze, izomeraze) pentru care s-au pus la punct metode de lucru cu agregate suport-enzimă, greutăți întâmpinându-se în special în cazul oxidoreductazelor.

Sintezele organice au ca scop ruperea sau formarea unor legături de tip C-X în care X = C, H, N, O, P, S, halogen etc. Din referințe specificitatea constituțională restrânsă a enzimelor exclude utilizarea practică a majorității lor.

III.5.8.2. Stabilitatea preparatelor de enzime imobilizate

Stabilitatea pe termen lung a preparatelor de enzime imobilizate este de o importanță majoră pentru reacțiile organice care în general au o durată mare. Se cunoaște că imobilizarea duce la o creștere a stabilității enzimelor dacă se alege o metodă de imobilizare adecvată. În special includerea în geluri, încapsularea și legarea chimică a enzimelor pe suport au un efect favorabil asupra stabilității în timp a enzimelor, în timp ce, de exemplu, imobilizarea prin legături ionice conduce la preparate mai puțin stabile decât cele dintâi.

Stabilitatea substratelor și a enzimelor în condițiile de reacție este alt factor important, care impune alegerea suportului, a metodei de imobilizare și a condițiilor de lucru (în special pH-ul) pentru care atât cofactorii cât și substratele respective trebuie să prezinte o stabilitate cât mai mare, evitându-se reacțiile secundare.

III.5.8.3.1. Accesibilitatea datelor specifice

Datele privitoare la enzimele imobilizate utilizate în reacții organice trebuie să arate o bună concordanță cu cele ale enzimelor libere. Trebuie studiate în special specificitatea în prezența substratelor și inhibitorilor ca și efectele solvenților organici, ale modificărilor de pH, temperatură și concentrație a electroliților. Este de așteptat astfel ca, atât enzimele libere cât și cele imobilizate să se comporte asemănător în condițiile date pentru a se prevedea mersul și rezultatul sintezelor organice.

III.5.8.4. Costuri și accesibilitate comercială

În multe cazuri costul ridicat al preparatelor comerciale de enzime imobilizate este prohibitiv pentru chimistul sintetician, care-și poate prepara singur aductul dacă metoda de imobilizare și materialele utilizate (suport-enzimă, cofactori etc) sunt relativ accesibile economic. Cu cât aductul suport-enzimă este mai stabil și mai operațional în timp, cu atât costul imobilizării scade. În cazul oxidoreductazelor trebuie luată în considerare și ușurința de regenerare a cofactorului folosit.

III.5.8.5. Alegerea procedurii experimentale

Enzimele imobilizate prin includere în fibre sau prin micro-encapsulare necesită în general un echipament sofisticat, greu de realizat în laboratorul de Chimie Organică.

În schimb, enzimele imobilizate pe sau incluse în suporturi insolubile care pot fi utilizate în procedeul „batch” sau în coloane permit o adaptare mai ușoară, cu condiția ca preparatele să

aibă o activitate ridicată și o bună stabilitate chimică și mecanică.

Metoda cea mai atractivă pentru laboratoarele de Chimie Organică este utilizarea coloanelor cu preparate enzimaticice. Pentru enzimele hidrolitice asemenea instalații sunt termodinamic nefavorabile, dar pentru sinteze bazate pe reacții reversibile ca de exemplu, formarea de esteri optic activi în cazul α -chimotripsinei, devin practicabile. Succese notabile s-au obținut cu asemenea instalații în sinteza de nucleotide.

Coloanele nu sunt recomandabile pentru reacții cu oxidoreductaze căci implică recuperarea cofactorilor.

În cazul reacțiilor ce folosesc substrat greu solubil în apă, se poate lucra cu rezultate satisfăcătoare în procedeul cu coloană, folosind amestec heterogen substrat-enzimă solubilă în apă.

Un procedeu de rutină pentru chimistul sintetician, metoda „batch” (tanc cu agitare) în care se folosește enzima immobilizată pe un material poros, poate da rezultate mai bune în cazul substratelor insolubile în apă. Solubilitatea mai poate fi influențată și de utilizarea unor solvenți organici sau a compușilor tensioactivi. Dacă substratul conține grupări acide sau bazice, solubilitatea sa poate fi modificată prin modificarea pH-ului (în special la substrat bazice).

Dintre cele două procedee de laborator („batch” sau coloană) se va alege pentru fiecare sinteză în parte acela care are un efect favorabil asupra vitezei de reacție. De exemplu, pentru reacții în mediu apos în prezența unor cantități mari de enzimă ce pot produce uneori spumări excesive, se va alege procedeul „batch” în care excesul de biocatalizator se poate filtra.

Cu toate limitele impuse, procedeele cu enzime immobilizate

rămân, pe termen lung, cele mai favorabile pentru sinteza organică.

III.6. Aplicații ale biocatalizatorilor imobilizați, în industria alimentară

Aplicațiile tehnologice ale enzimelor imobilizate în industria alimentară au evoluat mai rapid decât în industria farmaceutică, din două motive:

-majoritatea procedeeelor bazate pe biocatalizatori imobilizați sunt aplicabile în industria alimentară (fiind similare cu procesele naturale degradative, relativ simplu);

-procedeele enzimatică sunt mai rapide și conduc la produși mult mai puri decât cei obținuți prin metodele chimice.

În tabelul nr. 24 sunt indicate principalele aplicații tehnologice bazate pe reacții enzimatică.

Tabelul nr. 24

Aplicații industriale ale procedeeelor enzimatică

Clasa de enzime	Tipuri de reacții	Aplicații în
1	2	3
Proteaze	-Hidroliza proteinelor (papaină, ficină, tripsină, chimotripsină, pepsină, aminopeptidază)	-Industria brânzeturilor (rennină, pepsină) -Bere, băuturi din malț (pepsină, ficină, bromelaină etc). -Produse dietetice

Tabelul nr. 24 (continuare)

1	2	3
	- Hidroliza pectinesterrilor.	Sucuri de fructe (ficină, bromelaină).
Carbohidraze	- Hidroliza lactozei (lactază) - Hidroliza rafinozei (α -galactozidaza) - Hidroliza zaharozei (invertaza) - Convertirea glucozei în fructoză (glucoizomeraza) - Hidroliza amidonului (α și β -amilaza) - Hidroliza celulozei (celulază) - Hidroliza gumelor și mucilagiilor (amilaze)	Obținerea brânzeturilor cu scindarea lactozei din lapte Obținerea zahărului din sfeclă Prepararea produselor zaharoase Industria produselor zaharoase Industria berii și spirtului Obținere de glucoză nealimentară Fabricarea zahărului din sfeclă
Lipaze	Hidroliza lipidelor	Industria produselor dietetice
Esteraze	Obținere de nucleotide (RN-aza, DN-aza etc)	Sinteze de cofactori

Tabelul nr. 24 (continuare)

1	2	3
Diverse	Catalaza	Sterilizare sau pasteurizare la rece
	Aminoacilaze	Dedublarea amestecurilor racemice
	Penicilin-amidaza	Antibiotice de semisinteză

În cele ce urmează vor fi prezentate pe scurt principalele utilizări ale enzimelor imobilizate, în industria alimentară

III.6.1. Hidroliza proteinelor la peptide și aminoacizi

Industria alimentară este interesată în hidroliza proteinelor mai ales în scopul solubilizării lor și al creșterii digestibilității, cu aplicații în fabricarea unor alimente dietetice pentru copii.

Majoritatea proteinelor pot fi hidrolizate cu proteaze imobilizate; dezvoltarea unui sistem de hidroliză a proteinelor pentru industria alimentară are în vedere avantaje majore ca: procese continue, cost de producție scăzut, cost scăzut al echipamentelor, un bun control al procesului ca și posibilitatea utilizării și a altor enzime decât cele provenite din organisme, dacă acestea nu impurifică produsul final de reacție.

Se pot hidroliza enzimatic în primul rând proteinele solubile, dar și materialele coloidale (extracte de soia) prin adaptarea unor reactoare corespunzătoare.

Astfel, utilizând un amestec de pronază și aminopeptidază

se pot hidroliza insulina și lactalbumina, cu randamente apropiate de 100%, la aminoacizii liberi corespunzători. Ulterior, metoda a căpătat o adaptabilitate comercială utilizându-se ca substrat caseina (suspensie cu o concentrație în produs solid de 4-5%); se obțin aminoacizi liberi cu randament de peste 80%. Reproducibilitatea metodei este însă afectată de contaminarea microbiană la un timp de reacție prelungit, produsul de reacție având o compoziție în aminoacizi diferită în procedeul cu enzime immobilizate față de cel cu enzime libere (peptidaze sau proteaze).

În 1990, cercetătorii japonezi au propus o metodă de solubilizare a caseinei cu serin-protează extrasă din *Thermomonospora fusca* YX (bacterie aerobică filamentoasă din composturi-bălegar-termogene). Serin-proteaza secretată de această bacterie este o enzimă exocelulară relativ ușor de extras și purificat, având o mare stabilitate termică și onimică.

Enzima se poate immobiliza fie pe sticlă alchilaminică cu pori controlați (particule de 125-177 μ ; mărimea porilor fiind de aproximativ 500 Å), fie pe sticlă acoperită cu ZrO_2 și activată prin β -aminopropilsilanizare și prin tratare ulterioară cu glutaraldehidă. În acest din urmă caz immobilizat enzima este legată de suport prin intermediul grupării NH_2 din poziția ξ a resturilor de lizină. Cu acest aduct immobilizat pe particule de sticlă acoperite cu ZrO_2 se umple un reactor-coloană prevăzut cu manta de încălzire. Immobilizarea duce la creșterea stabilității enzimei peste 90°C, autoliza fiind nesemnificativă.

Lucrând cu o soluție de caseinat de sodiu (0,5%) tamponată la 60°C și pH = 6-10,7 se obține un amestec de peptide acide, solubile (hidrolizat proteic). Metoda este continuă.

Hidrolizatele obținute se pot folosi pentru ajustarea pH-ului unor băuturi (sucuri), sau pentru fabricarea unor produse

dietetice bogate în proteine, ea și pentru stimularea fermentației microbiene.

Enzima astfel imobilizată se folosește și la sinteze unor proteine, în condiții în care acțiunea sa hidrolitică să devină ireversibilă.

Metodele care folosesc enzime imobilizate pot fi îmbunătățite dacă substratul este supus unor pretratări care să-i mărească afinitatea față de enzimă, scurtându-se timpul de reacție și îmbunătățindu-se astfel costul procedurii.

Hidroliza proteinelor în condiții de solubilitate mărită este destul de dificilă, necesitând modificări ale parametrilor de reacție.

Studii de laborator au arătat că hidroliza cu protează la pH neutru (când proteina este în stare coloidală) a unui extract de soia care este complet insolubil la pH aproximativ 4, poate duce la solubilizarea a aproape 90% din proteină.

III.6.2. Industrializarea laptelui

III.6.2.1. Coagularea laptelui

Proteazele imobilizate, ca de exemplu cele din cheagul de bovine, cheagurile microbiene ca și pepsina pot fi utilizate pentru coagularea laptelui.

Astfel se poate obține brânză din lapte smântânit, utilizând pepsina imobilizată.

Un procedeu industrial folosește lapte la 15°C, trecut pe o coloană cu pepsină imobilizată. Produsul obținut s-a înălțat apoi la 37°C, când coagulează imediat.

Studii de optimizare au arătat că un timp lung de coagulare necesită debite înalte de alimentare a coloanei. Problema tehnică

majoră este legată de timpul de înjumătățire mic al activității enzimei în condițiile operaționale (aproximativ 72 pre). Relativ la acest timp mic de înjumătățire sunt două aspecte de luat în considerare:

- mai întâi proteinele din lapte pot bloca porii suportului pe care este immobilizată enzima. Pentru refacerea activității aductului suport-enzimă este necesară o spălare cu soluție de HCl, care deplasează aceste proteine de pe suport;

- altă cauză a timpului redus de înjumătățire este și pH-ul la care se operează. Pepsina se denaturează rapid la $\text{pH} > 4$. Sistemul laptelui smântânit, datorită punctului izoelectric al caseinei are un $\text{pH} = 5$, ceea ce poate provoca dezactivarea enzimei.

Studii de laborator au arătat de altfel că la $\text{pH} = 1-2$ timpul de înjumătățire al activității pepsinei crește la peste 30 zile.

În vederea aplicabilității industriale pentru coagularea laptelui se iau în discuție două faze distincte:

a) Faza enzimatică primară, în care o enzimă proteolitică (cheagul sau pepsina) scindează o legătură fenilalanil-metionil din α -caseină, conducând la miceli de caseină în stare metastabilă.

b) În faza următoare, neenzimatică, are loc separarea Ca din gelurile de lapte.

Cum coeficienții de temperatură pentru cele două etape [(a) și b)] sunt 2 și respectiv 10-12, coagularea laptelui poate fi întârziată selectiv într-un reactor enzimatic prin scăderea temperaturii (pentru a inhiba faza neenzimatică și pentru a definitiva faza enzimatică). Ulterior laptele tratat se încălzește producându-se coagularea.

Un proces continuu de fabricare a brânzei devine astfel

accesibil și oferă avantaje față de procedeul tradițional, discontinuu, de tip „batch”, putând fi industrializat.

În instalațiile care utilizează protează, trebuie rezolvate o serie de probleme înainte procesului propriu-zis.

După studierea unui mare număr de suporturi care implică tehnici de imobilizare complicate, conducând în multe cazuri la aducți suport-enzimă puțin stabili și cu o activitate enzimatică scăzută, s-au ales un suport ieftin (alumină), o tehnică simplă de imobilizare (adsorbția) și o enzimă relativ activă (pepsina) într-un reactor cu pat fluidizat.

Proteazele, nerecorandabile pentru a fi folosite în stare solubilă datorită unei proteolize excesive, necontrolabile, pot fi astfel utilizate în stare imobilizată.

Alegerea enzimei se face ținând cont de capacitatea sa de coagulare a laptelui, dar și de influența sa asupra procesului de maturare a brânzei, astfel încât între cele două faze (coagularea laptelui și maturarea) să existe un echilibru.

III.6.2.2. Preluorarea laptelui cu hidroliza lactozei

Studii medicale arată că un număr tot mai mare de indivizi prezintă intoleranță la lactoza din lapte, datorită fie unei absorbții deficitare, fie unei deficiențe în lactază a organismului uman. Pentru oamenii care suferă de asemenea deficiențe apare o intoleranță la consumul de lapte sub orice formă, manifestată prin disfuncții gastrointestinale (diaree, flatulență, balonare etc). Din punct de vedere geografic asemenea intoleranțe se observă mai ales la populațiile din Asia, Africa, America

Latină și Orientul Mijlociu, ceea ce duce la scăderea în aceste regiuni a consumului de lapte, un element nutritiv totuși esențial.

Este deci de înțeles de ce s-au dezvoltat tehnologiile de preparare a unor produse lactate dietetice, în care lactoza să fie parțial sau total scindată.

În general, metodele de prelucrare a laptelui în acest scop sunt procedee chimice, fizice și enzimatic.

Tratarea enzimatică a laptelui este cea mai convenabilă, deoarece se păstrează (după hidroliza lactozei) galactoza și glucoza, componente nutritive ale acestui aliment.

Fiind un aliment, laptele tratat nu trebuie să conțină produși secundari (apăruți eventual prin reacții nedorite de degradare), să nu fie afectați produșii de hidroliză ai lactozei și să nu se modifice proprietățile laptelui.

La „Centrale del Latte” din Milano, Italia, se utilizează β -galactozidază inclusă în fibre, iar ca sursă de enzimă drojdia. Se lucrează cu lapte sterilizat și cu enzima inclusă în fibre de triacetat de celuloză. Fibrele se introduc într-un reactor-coloană. (fig. 36).

Ca surse de β -galactozidază folosesc de obicei drojdia sau bacterii (*Escherichia coli*).

Se preferă drojdiile din mai multe motive:

- se folosesc celulele active de *Saccharomyces* sp. lucrându-se cu β -galactozidaza pură sau parțial purificată extrasă din drojdie, deoarece nu ridică probleme toxicologice legate de contaminarea microbiană a laptelui;

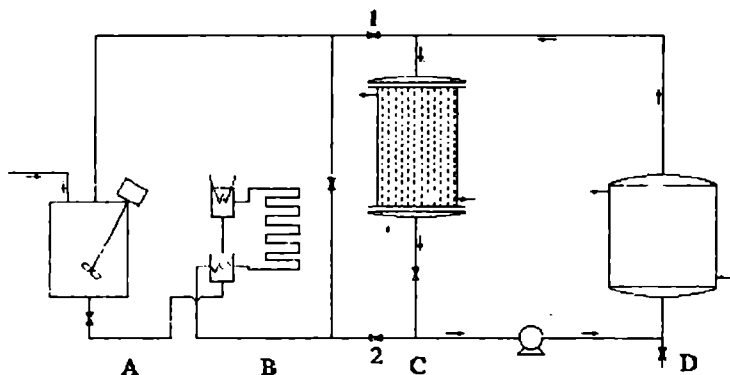
- β -galactozidaza din drojdie are aproximativ aceeași activitate asupra lactozei pure ca și a lactozei din lapte, pe când activitatea enzimelor din alte surse (*Escherichia coli*) se

reduce dramatic în cazul laptelui, probabil datorită prezenței unor inhibitori;

- enzima din drojdie are un pH optim al activității, apropiat de cel al laptelui.

Fig. nr. 36

Stație pilot utilizată la hidroliza lactozei din lapte cu β -galactozidază immobilizată pe fibre



A-vas pentru lapte sau soluție de spălare; B-sterilizator;
C-reactor enzimatic; D-rezervor

Totuși enzima din drojdie are și unele dezavantaje, mai ales cel legat de recuperarea ionilor de Mg^{2+} , cofactor necesar pentru activitatea sa. Când fibrele ce conțin enzima vin în contact cu soluțiile apoase, are loc o difuzie dialitică a compușilor cu masă moleculară mică din micro-cavitățile (porii) fibrelor. Dacă în soluția exterioară nu sunt prezenți ioni de Mg^{2+} , care să echilibreze această pierdere rezultă o dezactivare ireversibilă a enzimei.

Un alt dezavantaj este stabilitatea termică scăzută a β -galactozidazei din drojdie, dar dacă se lucrează la temperatu-

ră joasă acest inconvenient este înlăturat.

Se aleg ca suport fibrele de triacetat de celuloză care sunt foarte stabile în condițiile de lucru înlăturându-se posibilitatea (nedorită) de impurificare a preparatului de lapte cu produși rezultați din scindarea suportului.

Înainte de fiecare utilizare, fibrele de aduot suport-enzimă trebuie spălate cu atenție. β -Galactozidaza din drojdie inclusă în fibre este stabilă la 0-25°C; cum procesul are loc la 4-7°C, nu se observă o modificare a activității enzimatice.

Stabilitatea enzimei mai depinde și de prezența ionilor de Mg^{2+} în laptele supus prolucrii, ca și de contaminarea bacteriană. Urmele de ioni Mg^{2+} din laptele de vacă sunt suficiente pentru a preveni dezactivarea enzimei. Este necesar să se lucreze în condiții speciale, pentru a preveni contaminarea microbiană, care reduce dramatic activitatea enzimei. Lucrând la temperaturi joase nu se rezolvă în totalitate problema contaminării microbiene deoarece după câteva zile microorganismele psicrofile se pot adapta, proliferând. De aceea fibrele cu enzimă imobilizată trebuie spălate cu atenție, periodic. La „Centrale del Latte” se folosește pentru spălare o sare cuaternară de amoniu (Steramina H) cu bune efecte detergente și antimicrobiene, fără a afecta activitatea enzimei imobilizate.

În general, utilizarea procedurii descrise are ca rezultat o bună conservare a calităților organoleptice originale ale laptelui. S-a putut pune la punct o instalație cu o capacitate minimă de 8000 l/zi.

III.6.2.3. Industrializarea zerului

În industria brânzeturilor, rezultă mari cantități de zer, separat după coagularea laptelui; acest subprodus are un conținut

relativ ridicat de lactoză, din care cauză s-a pus problema utilizării sale pentru obținerea de glucoză și galactoză, prin hidroliza lactozei cu β -galactozidază.

Înainte de prelucrarea propriu-zisă a zerului, este necesară îndepărtarea apei oxigenate folosite la „pasteurizarea” laptelui supus coagulării (aproximativ 0,05% H_2O_2) și care se regăsește în zer.

Apa oxigenată poate fi distrusă de catalază, dar costul înalt al enzimei limitează utilizarea sa; chiar dacă enzima este imobilizată, se observă o dezactivare rapidă a sa în prezența H_2O_2 . Dacă se utilizează catalază imobilizată pe membrane de collagen, enzima poate fi reactivată.

S-a observat că în oxidarea catalizată de lactoperoxidază a tiocianatului cu H_2O_2 se formează un agent antibacterian.

Cum laptele conține concentrații mari de peroxidază și cantități moderate de tiocianat, adăugând H_2O_2 în lapte, are loc activarea sistemului lactoperoxidazic, rezultatul fiind o „auto-pasteurizare”. S-a propus generarea H_2O_2 din lactoză cu ajutorul unui sistem de două enzime imobilizate. Astfel, β -galactozidaza și glucozooxidaza se co-imobilizează pe particule (perle) poroase și se utilizează într-un reactor cu pat compact, în straturi alternante. Procedul prezintă avantajul că nu mai necesită o nouă descompunere a exoesului de H_2O_2 .

Lactoza din zer este supusă hidrolizei cu β -galactozidază (lactază) la monozaharidele componente (glucoza și galactoza), cu valoare alimentară considerabilă.

Ca surse de enzimă se pot folosi: *Saccharomyces lactis* sau *Aspergillus niger* din drojdiile sau bacteria *Escherichia coli*.

Lactaza separată și purificată poate fi imobilizată pe o mare varietate de suporturi organice (triacetat de celuloză,

colagen, agaroză etc) sau anorganice. Se folosesc în special preparatele de β -galactozidază incluse în geluri de poliacrilamidă sau în fibre de triacetat de celuloză ca și lactaza immobilizată pe stiole boro-silicioase poroase, cu ajutorul glutaraldehidei.

Se pot folosi și celule microbiene incluse în geluri de poliacrilamidă.

Alegerea sursei de enzimă depinde de scopul în care sunt utilizate preparatele obținute. Astfel hidroliza acidă a lactozei se va face cu enzima din *A. niger* care are un pH optim = 4, în timp ce pentru substrat cu pH neutru (laptele) am arătat la pag. 239 că se folosește mai ales enzima provenită din drojdie.

Hidroliza acidă a lactozei din zer, care duce la obținerea unor zaharuri mai solubile și mai dulci decât lactoza a căpătat interes o dată cu creșterea cererii (și a prețului) edulcoranților.

Se utilizează lactaza din *A. niger*, immobilizată pe silice poroasă, într-un reactor coloană. Cum activitatea optimă a enzimei se situează la 35°C, reactorul se încălzește inițial la această temperatură; pe măsură ce reacția avansează și activitatea enzimei scade, temperatura se ridică treptat până la 50°C. În aceste condiții, timpul de înjumătățire al activității enzimei este de 559 zile.

Se poate lucra și cu β -galactozidază immobilizată pe alumina, într-un reactor cu pat fluidizat.

III.6.3. Utilizări în industria berii

Preparatele de papaină immobilizată se folosesc la stocarea berii la temperatura camerei, evitându-se tulburarea (formarea de complexe opalescenți ai taninurilor, proteinelor și carbohidraților).

Trecând berea peste o coloană cu papaină immobilizată, se poate purifica acest produs de proteinele pe care le conține; procedeul este continuu, reducându-se astfel durata procesului de purificare.

Papaina utilizată în acest scop se poate prezenta sub forma unei mari varietăți de produse immobilizate: membrane de collagen cu papaină, legare covalentă a papainei pe gel de hidroxialohilmetacrilat (aduct utilizat în reactoare-cuve sau coloane), imobilizare pe fire de bumbac (înfășurate pe o spirală de oțel). De exemplu, pentru acest ultim procedeu de imobilizare se activează celuloza cu o soluție de HClO_4 , după care se spală cu apă. Fibrele de celuloză parțial oxidată sunt plasate într-o coloană prin care se trece soluția de papaină.

În industria berii se mai pot folosi și enzimele glicolitice immobilizate. Astfel, α -amilaza microbiană immobilizată poate fi folosită împreună sau în loc de amilazele naturale din malț, în procesul de hidroliză enzimatică a amidonului.

Pentru ajustarea vâscozității berii se poate folosi β -glucanaza immobilizată (β -glucanul influențează vâscozitatea berii).

Pentru hidroliza dextrinelor din bere la glucoză se utilizează glucoamilaza immobilizată.

III.6.4. Industria vinului și sucurilor

O problemă asemănătoare cu apariția opalescenței la bere se pune și în cazul rachiurilor, sucurilor de fructe, vinului.

Astfel, în rachiul de orez pasteurizat și stocat, ca și în vinul de orez apare în mod frecvent o turbiditate proteinică, limpezirea lor făcându-se prin hidroliză proteolitică.

Pentru rachiul de orez se folosește o protează termofilă din *Penicillium dupontii* imobilizată pe Sepharoză activată cu BrCN; procesul este continuu și automatizat.

Proteazele imobilizate pot fi utilizate și pentru limpezirea sucului de grape-fruit și a vinului. În acest caz se folosesc pepsina și acid-proteinazele (izolate din fungi de *Aspergillus awamori* și *Aspergillus oryzae*) imobilizate pe bromacetil-celuloză și pe suporturi anorganice poroase (silicagel, sticlă). În cazul sucului de grape-fruit care conține ioni de Fe^{2+} și Fe^{3+} (care inhibă acid-proteinazele), înainte de limpezire se trece sucul peste o coloană cu schimbători de ioni, pentru îndepărtarea lor.

III.6.5. Aplicații în industria produselor zaharoase

Industria zahărului este un mare consumator de enzime imobilizate, care se utilizează în principal pentru:

- obținerea glucozei prin hidroliza amidonului;
- invertirea zahărului;
- epimerizarea glucozei la fructoză.

III.6.5.1. Hidroliza amidonului și celulozei

Majoritatea D-glucozei fabricată industrial se obține prin hidroliza enzimatică a amidonului.

amidon $\xrightarrow[\text{(solubilizare)}]{\alpha\text{-amilaza}}$ dextrine $\xrightarrow[\text{(zaharificare)}]{\text{glucoamilaza}}$ D-glucoză

Ca materie primă, din considerente economice, se alege mai ales amidonul din porumb.

Prima etapă, solubilizarea amidonului la dextrine se face

cu α -amilază immobilizată pe CM-celuloză activată cu BrCN. Materialul obținut se încarcă într-un reactor coloană.

A doua etapă, zaharificarea, are loc cu glucoamilaza immobilizată covalent sau inclusă în fibre. Se poate folosi de exemplu glucoamilază immobilizată pe un suport conștând dintr-un copolimer glutaraldehidă-p-fenilendiamină.

În literatură se găsesc numeroase referiri la utilizarea glucoamilazei immobilizate pentru producerea glucozei din amidon de porumb.

Din studiul de laborator al reacției de zaharificare a apărut evidentă atractivitatea comercială a preparatelor de enzime immobilizate.

Astfel, timpul necesar de obținere a siropului de glucoză din amidon de porumb este mai mic de 60 min, față de 75 ore pentru procedeele chimice. Se obține un sirop limpede, ușor de decolorat și de purificat.

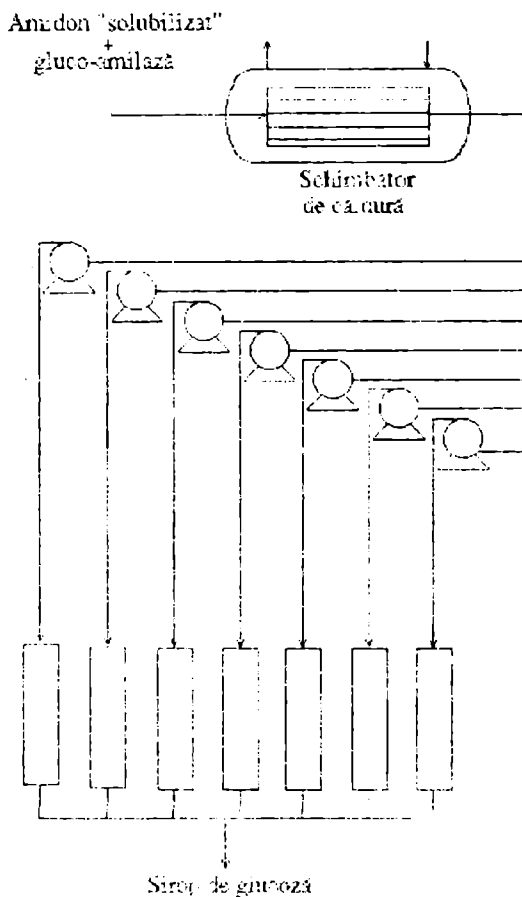
În cazul glucoamilazei se observă că timpul de înjumătățire al activității enzimatică poate crește substanțial dacă se lucrează la temperaturi joase, fără a fi afectată viteza de reacție.

În plus lucrând cu glucoamilază parțial purificată și immobilizată pe un suport anorganic activat prin silanizare se poate utiliza un reactor-coloană cu pat compact, la 40-50°C și pH = 4,5.

O instalație pilot de la Universitatea din Iowa (fig. 37) are o baterie de reactoare-coloană cu enzimă immobilizată sterilizate în prealabil și care rămân operaționale timp de 30 de zile.

Fig. nr. 37

Sistem de baterie de reactoare-coloană pentru fabricarea glucozei cu glucoamilază immobilizată



Utilizarea glucoamilazei immobilizată pe sticlă poroasă cu pori controlați are două dezavantaje majore:

- costul ridicat al suportului și
- scindarea (solubilizarea) în timp a suportului.

Acoperind materialul de sticlă cu oxizi (SiO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , ZrO_2 etc) se obțin suporturi mult mai durabile, cu multe avantaje

economice, dar costul suportului depășește valoarea produsului.

Toate aceste dezavantaje pot fi înlăturate recurgându-se la ceramicile poroase ca suporturi pentru imobilizarea covalentă a glucoamilazei.

Un domeniu atractiv este și hidroliza enzimatică a celulozei la D-glucoză, celuloza fiind mult mai răspândită în natură decât amidonul. Glucoza obținută pe această cale nu se folosește ca edulcorant alimentar, dar poate servi ca sursă de energie pentru biosinteza unor proteine sau poate fi convertită în alți compuși chimici, utilizabili industrial (etanol).

Celuloza poate fi hidrolizată cu celulaza din *Trichoderma viride*, un amestec complex de enzime cu activitate hidrolitică diferită. Cum aceste enzime diferă prin proprietățile lor, este necesară o metodă de imobilizare care să nu dezactiveze nici una din ele. De cele mai multe ori se folosește celulază imobilizată pe colagen perlat, prin reticulare cu glutaraldehidă.

Nu se folosesc reactoare-coloană (substratul coloidal de celuloză se poate tasa), ci reactoare cu pat fluidizat, hidroliza decurgând cantitativ.

III.6.5.2. Invertirea zahărului

Zaharoza se poate hidroliza enzimatic la un amestec echimolecular de glucoză și fructoză, mai dulce decât zahărul și care împiedică uscarea (cristalizarea) în timp a produselor zaharose (siropuri, dulceațuri, umpluturi de bomboane etc).

Hidroliza (invertirea) zahărului se poate face cu invertaza izolată din drojdia de bere și inclusă în fibre de triacetat de celuloză sau în geluri de poliacrilamidă.

Dacă soluțiile de zaharoză au o concentrație de sub 30%,

se pot folosi reactoare-coloană. În cazul unor soluții mai concentrate (30-50%), creșterea vâscozității micșorează mult viteza de scurgere prin coloană. În acest caz se folosește procedeul discontinuu „batch”.

III.6.5.3. Epimerizarea D-glucozei la D-fructoză

Izomerizarea enzimatică a D-glucozei în D-fructoză are o mare importanță industrială.

Siropul cu conținut înalt de fructoză este un produs comercial important care poate înlocui zaharoza. El este format din 50% glucoză și 42% fructoză, restul fiind alte zaharuri. Prezența fructozei face ca acest sirop să aibă calități edulcorante crescute.

Un procedeu industrial american, computerizat utilizează glucoizomeraza imobilizată pe DEAE-celuloză prin adsorbție, în reactoare cilindrice, conținând particule (perle) de suport cu enzimă adsorbită superficial. Se lucrează cu o baterie de reactoare, la 60°C și pH = 7-7,5. Substratul este un sirop cu conținut de 73% în glucoză și 30-50% materii solide; produsul de reacție conține 42% fructoză.

Se pot folosi și celule microbiene (ce conțin glucoizomerază) imobilizate. Această variantă este mai avantajoasă decât cea cu enzimă pură, deoarece glucoizomeraza este o enzimă intracelulară, greu de extras și purificat. Utilizarea celulelor scade prețul de cost, mărinț în plus și stabilitatea operațională a enzimei aflată în mediul său natural.

În plus s-a mai constatat că unele tipuri de celule pot fi ușor fixate într-o fază staționară, printr-un simplu tratament termic („autoimobilizare”).

Ca substrat se folosește siropul de glucoză obținut din amidonul de porumb sau de cartofi, în urma hidrolizei enzimatice.

Acest sirop are proprietăți edulcorante estimate la 70-75% din cea a zaharozei.

Prin izomerizarea parțială a glucozei se obține siropul cu conținut înalt de fructoză, la fel sau mai dulce decât zahărul.

Un procedeu utilizat în USA, Europa, Japonia, Coreea de Sud folosește glucoizomeraza conținută în *Bacillus coagulans*.

Se imobilizează celulele prin reticulare cu glutaraldehidă, iar masa obținută se extrudează în folii subțiri, utilizate în reactoare cu pat compact.

Celulele microbiene se mai pot imobiliza și în membrane de colagen utilizate sub formă de spirală într-un reactor cu pat compact (procedeu SUA cu *Bacillus coagulans*).

În general organismele de tipul *Bacillus* produc o enzimă interesantă (D-xiloizomeraza), care poate izomeriza și D-glucoza. În plus, se pot cultiva în medii ușor accesibile.

Firma Gist-brocades (Olanda) lucrează cu glucoizomeraze dintr-o tulpină de *Actinoplanes missouriensis*. Miceliile sunt incluse în gelatină și reticulate cu glutaraldehidă. Se obțin particule sferice cu diametrul de 1 mm, care se pot folosi atât în procedeul „batch” cât și în reactoare cu flux continuu, cu pat compact sau fluidizat.

Se obține un sirop cu un conținut de 42% fructoză; se lucrează la 65°C și pH = 7-7,5.

Se cunosc și alte procedee de obținere a siropului cu conținut înalt de fructoză:

- cu glucoizomerază din tulpini de *Streptomyces* adsorbite pe alumina cu pori controlați;

- cu o tulpină de *Arthrobacter* „autoimobilizat” și introdus

într-un reactor cu pat compact;

- cu o enzimă din *Streptomyces phaeochromogenes*, imobilizată pe un suport celulozic schimbător de ioni.

Gluciozomeraza se mai poate imobiliza pe: sticlă poroasă, răgini formaldehidice, prin includere în fibre de celuloză și în „Hollow-fiber”.

Celulele conținând izomerază activă se pot imobiliza și prin includere în acetati de celuloză sau în geluri de poliacrilamidă. În tabelul nr. 25 sunt sumarizate câteva exemple de gluciozomeraze comerciale.

Tabelul nr. 25

Exemple de gluciozomeraze comerciale

Numere comercial/Firmă	Sursa de enzimă	Tehnica de imobilizare
1	2	3
Maxazyme/Gist-broca-des (Olanda)	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Includere în gelatină, urmată de reticulare cu glutaraldehidă
Optisweet/Miles Kali-Chemie (Germania)	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Adsorbția enzimei purificate pe silice, urmată de reticulare cu glutaraldehidă
Spezyme/Finnsugar (Finlanda)	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Legarea electrostatică a enzimei purificate pe DEAE-celuloză amestecată cu polistiren și TiO_2
Sweetzyme/Novo-Nordisk (Danemarca)	<i>Bacillus coagulans</i>	Reticularea materialului celular omogenizat cu glutaraldehidă

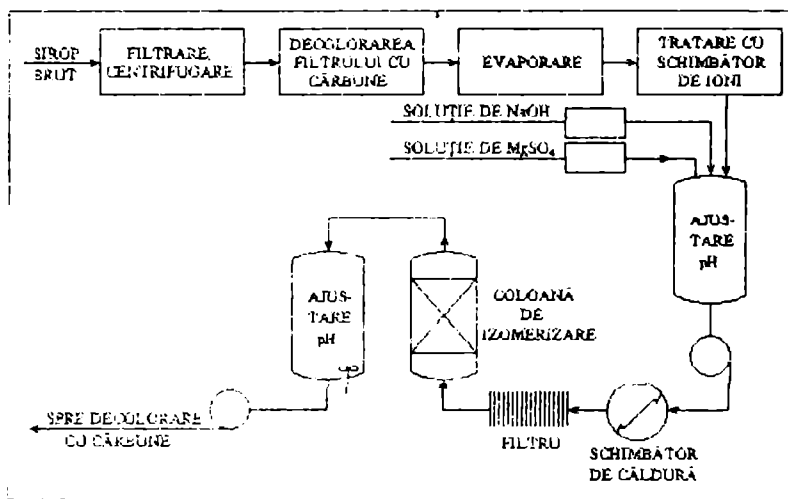
Tabelul nr. 25 (continuare)

1	2	3
Sweetase/Negase (Japonia)	Streptomyces phaeochromogenes	Imobilizarea miceliilor trata- te termic pe rășină schimbăto- re de anioni

In figura nr. 38 este indicată o schemă tehnologică generală pentru izomerizarea în flux continuu a siropului de glucoză brut.

Fig. nr. 38

Instalație de epimerizare a glucozei



Siropul de glucoză obținut din amidon este purificat prin filtrare și decolorare cu cărbune, după care este evaporat până la un conținut de 40-45% substanță solidă. După trecerea printr-un schimbător de ioni este introdus într-un vas cu agitare în care se adaugă ioni de Mg^{2+} și are loc o ajustare a pH-ului până la 8,5.

Urmează încălzirea la 65°C printr-un schimbător de căldură și filtrarea, după care siropul se trece prin coloana ce conține patul de enzimă imobilizată, debitul de alimentare al coloanei fiind ajustat pentru a se produce conversia dorită la fructoză (controlată cu un polarimetru automat). Dacă activitatea enzimei scade ușor în timp, randamentul conversiei este menținut prin reducerea debitului de alimentare a reactorului.

Din coloana de izomerizare, izo-siropul este trecut într-un vas cu agitare în care se corectează pH-ul la 4,5, înainte de rafinarea cu cărbune activ. Respectând parametrii de lucru, se obține un sirop cu conținut înalt de fructoză și care nu conține nici măcar urme de D-manoză.

III.6.6. Alte aplicații

III.6.6.1. Hidroliza rafinozei

Rafinoza este un trizaharid (α -galactozid) care împiedică cristalizarea zaharozei din melasele din sfeclă de zahăr. Randamentul în zaharoză poate crește dacă se hidrolizează rafinoza cu α -galactozidază. Creșterea randamentului se datorează nu numai hidrolizei propriu-zise a rafinozei, dar și eliminării întârzierii în etapa de cristalizare a zahărului. Pentru industria zaharozei trebuie folosit un microorganism care să furnizeze α -galactozidază dar de loc sau foarte puțină invertază. O bună sursă de asemenea enzimă este *Mortierella vinacea*. α -Galactozidaza este produsă atunci când în cultură, în condiții controlate, miceliile au o dimensiune constantă (20-30 mesh). Aceste miceli microbiene autoimobilizate se folosesc în reactoare cu flux continuu. Reactorul enzimatic constă într-o baterie de

vase deschise în formă de U, fiecare fiind echipat cu agitator și un filtru la partea inferioară, pentru îndepărtarea biocatalizatorului din produsul de reacție.

Melasele se tratează continuu în reactor la 48-52°C cu apă caldă ajustându-se pH-ul la 5,0-5,2. ou acid sulfuric.

α -Galactozidaza are de fapt un pH optim de 4, dar la pH =5,2 se previne invertirea zaharozei. Dacă melasele nu conțin cantități mari de rafinoză, reacția durează de la 1,5-2,5 ore până la 4 ore.

Preparatul enzimatic se folosește timp de 25 zile după care se înlocuiește cu unul proaspăt. Astfel, 30 Kg preparat imobilizat folosesc la hidroliza unei tone de rafinoză, dacă trizaharidul este conținut în melase în proporție de până la 60%, ceea ce duce la creșterea randamentului final în zaharoză.

Intr-un reactor discontinuu („batch”) se pot folosi celule de *Mortierella vinacea* reticulată cu glutaraldehidă. Lucrând la 50°C, pentru mai mult de 250 cicluri durând în total 3 săptămâni, celulele reticulate își mențin 72% din activitatea enzimatică inițială, în timp ce cele netratate cu glutaraldehidă au o activitate remanentă de numai 5% în condiții similare.

Se pot folosi și celule autoimobilizate de *Absidia liguerii* supuse ulterior dispersării în particule de dimensiuni convenabile cu care se umplu reactoarele-colocană ce funcționează la 60°C. După 30 zile activitatea α -galactozidazică scade la 80% în comparație cu cea inițială.

α -Galactozidaza din *Bacillus stearothermophilus* se imobilizează pe nylon, produsul obținut fiind utilizat într-un reactor cu pat compact.

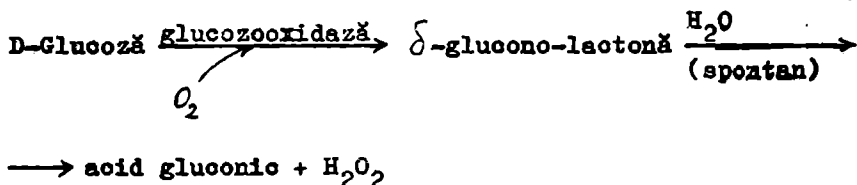
III.6.6.2. Obținere de acid gluconic

Glucozoxidaza poate fi utilizată în industria alimentară pentru oxidarea glucozei la acid gluconic.

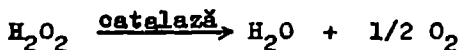
Tratând un sirop cu conținut înalt de fructoză (obținut prin invertirea zahărului) cu glucozoxidază, se obține un amestec de fructoză și acid gluconic, ușor de separat prin cromatografie de schimb ionic. În acest fel este posibilă obținerea concomitentă a fructozei pure și a acidului gluconic.

Glucozoxidaza se poate utiliza și pentru îndepărtarea glucozei din unele produse alimentare (albuș de ou), sau a originului din acestea.

Produsul reacției este o δ -gluconolactonă instabilă, care se hidrolizează spontan la acid gluconic și H_2O_2 :



H_2O_2 rezultată, fiind inhibitor pentru enzimă, trebuie îndepărtată cu ajutorul catalazei:



Co-immobilizând glucozoxidaza și catalaza, se observă că stabilitatea glucozoxidazei crește dacă co-immobilizarea catalazei se face pe același suport (pentru că sub acțiunea catalazei se reface O_2 necesar oxidării cu glucozoxidază).

O sursă foarte convenabilă a acestor enzime este *Aspergillus niger*, enzimele putând fi purificate împreună. Cele două enzime se co-immobilizează pe un copolimer de glutaraldehidă-p-fenilendiamină. Preparatul obținut se poate folosi atât în reactoare

„batch” cât și în reactoare-coloană.

Temperatura optimă de reacție pentru sistemul celor două enzime co-immobilizate este mai mică decât pentru amestecul de enzime solubile, iar aerarea cu O_2 conduce la viteze de reacție mai mari decât cu aer.

Descrerea constantei K_M pentru oxidarea glucozei în cazul sistemului co-immobilizat este rezultatul probabil al unei concentrații crescute de oxigen din proximitatea catalazei.

III.6.6.3. Conservarea cărnii

Pentru a îndepărta mirosul neplăcut din carne, se adaugă mono-glutamat de sodiu; efectul crește considerabil prin adăugarea suplimentară a unui amestec bihormolecular de nucleotide ale acidului inosinic (IMP) și acidului guanilic (GMP). În acest scop începând din 1973 în Japonia se produc anual 2000-3000 t amestecuri de nucleotide.

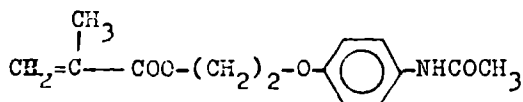
Un procedeu comercial pentru obținerea IMP și GMP este hidroliza enzimatică a RNA izolat din drojdie. Inițial, RNA se hidrolizează cu 5'-fosfo-diesteraza la ribonucleotidele constituențe, iar în a doua etapă AMP este convertit la IMP prin acțiunea 5'-AMP-dezaminazei. Nucleotidele din hidrolizat astfel obținut se izolează prin cromatografie de schimb ionic.

Un procedeu continuu folosește fosfodiesteraza din *Penicillium* sp. și AMP-dezaminaza din *Aspergillus* sp. immobilizate separat prin legare covalentă pe ceramică poroasă. Procedeu este net superior celui care utilizează enzimele solubile în reactor cuvă (procedeu discontinuu).

ABREVIERI, DENUMIRI DIVERSE

Amberlite = rășină schimbătoare de ioni acidă (IRA) sau bazică (IRC)

AFEMA = p-acetilaminofeniletoximetacrilat



ATP = adenzin-trifosfat

Biorad = varietăți de geluri celulozice comerciale USA

BIS = N,N'-metilen-bisacrilamidă

CM = carboximetil

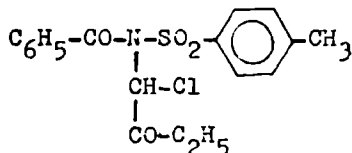
DEAE = dietilaminoetil

ECTOLA (epiclorhidrin-trietanolamino)-

-celuloză = amestec de celuloze aminate (schimbător de ioni bazi)

EDTA = acid etilendiaminotetraacetic

L-(1-tosilamidofenil)-etilclormetilcetonă



Metilcelosolv = CH₃-O-CH₂-CH₂-OH

NAD = coenzima I (fără specificarea formei reduse sau oxidate)

NAD⁺ = nicotinamid-adenin dinucleotidă (coenzimă I oxidată)

NADH = nicotinamid-adenin dinucleotidă forma redusă

NADP = nicotinamid-adenin-dinucleotid-fosfat

(Coenzima II fără specificarea formei reduse sau oxidate)

NADP⁺ = coenzima II forma oxidată

NADPH = coenzima II forma redusă

RES = rezonanță electronică de spin

TRIS.HCl = clorhidrat al 1-tris(hidroxi-etil)aminometanului
DOWEX = rășini polistirenice (DOWEX 50) sau bazice (DOWEX 1)
Eucheuma cattonii = specie de alge producătoare de k-carageenan
FAD = flavin - adenin - dinucleotida
IMP = inosin-monofosfat
GMP = guanosin-monofosfat

BIBLIOGRAFIE SELECTIVA GENERALA

(vol. I și II)

1. Aiba, S., Humphrey, A.E. și Millis, N.F., Biochemical Engineering, 2nd ed., Academic Press, New-York, 1973
2. Aseno, S., Yasuda, T., Tani, Y. și Yamada, H., Agric.Biol. Chem. 46(1982), pag. 1183
3. Axén, P. și Ernback, S., Eur.J.Biochem. 18(1971), pag. 351
4. Axén, P., Porath, J. și Ernback, S., Nature (London), 214 (1967), pag. 1302
5. Annals of the New-York Acad. of Sci. 613 (1990):
 - Carenza, M., de Alteris, E., Lora, S., Parascandola, P. și Scardi, V., Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* Cells by Adhesion to Polymeric Matrices obtained by Radiation-induced Polymerization, pag. 547
 - Chang, T.M.S., Biotechnological and Medical Applications based on Immobilization of Hepatocytes, Microorganisms, or Enzyme Systems by Microencapsulation in Artificial Cells, pag. 109
 - Dieckmann, R. și Hempel, D.C., Immobilization Techniques, Bioreactors and Improvements in Downstream Processing, pag. 255
 - Fukui, S., Recent Topics in Research and Development of Bioreactor Systems, pag. 1
 - Guisán, J.M., Alvaro, G. și Fernandez-Lafuente, R., Immobilization- Stabilization of Penicillin 6-Acylase, pag. 552
 - Hashimoto, K. și Shirai, Y., Continuous Production of Monoclonal Antibody Cells Immobilized in Hardened Alginate Gel

Particles, pag. 216

- Hertzberg, S., Kvittingen, L., Anthonsen, T. și Skjåk-Braek, G., Alginate as Immobilization Material for Biocatalysts in Organic Solvents, pag. 511
- Ichijo, H., Suehiro, T., Nagasava, J., Honda, S., Nedairo, H. Yamauchi, A., Aisaka, N. și Sagesaka, M., Fibrous Support Module Composed of Braided Poly(Vinyl Alcohol) Superfine Fibers, pag. 858
- Ji, X.S., Cai, P. și Yuan, Z.Y., Immobilized Phosphoglucosmutase and its Application, pag. 747
- Kaetsu, I., Morita, Y., Otori, A., Naka Y., Kumakura, M., Fugimura, T., Yoshii, F. și Tamado, M., Immobilization and Culture of Cells, pag. 781
- Li, Y.F., Huang, Y., Ye, L.F., Sui, P. și Wen, Q.Q., Production of Glutamic Acid by Immobilized Cells, pag. 883
- Lopez, J.L., Wald, A.S., Matson, S.L. și Quinn, J.A., Multiphase Membrane Reactors for Separating Stereoisomers, pag. 155
- Nakamura, K., Fujii, H., Clei, Y.M. și Yano, T., Supercritical Fluid. A novel Nonaqueous Medium to Integrate Enzymatic Reaction and Separation, pag. 319
- Park, T.G. și Hoffman, A.S., Immobilized Biocatalysts in Reversible Hydrogels, pag. 588
- Prenosil, J.E. și Hegglin, M., Self-immobilized Plant Cell Aggregates in a Bioreactor System with Low Shear Stress, pag. 234
- Serralheiro, M.L., Empis, J.M. și Cabral, J.M., Peptide Synthesis by Microencapsulated Chymotrypsin, pag. 638
- Wada, H., Imamura, I., Iako, M., Katagiri, S., Tarui, S., Nishimura, H. și Inada, Y., Antitumor Enzyme Polyethylene

Glycol - modified Asparaginase, pag. 95

- Wingard Jr., L.B., Biosensor Trends Receptors, Enzymes and Antibodies, pag. 44
- Woodley, J.M., Harrop, A.J. și Lilly, M.D.. The Impact of Biocatalyst Selection on the Design of Aqueous - Organic Biphasic Biocatalytic Processes, pag. 191
- Youan, Z.Y., Li, S.Y., Chen, P.Y., Wang, Y. și Wu, F.X., Microencapsulation DNA - Recombinant Cells and its Application in Production of HBsAg, pag. 338
- 6. Bernfeld, P. și Wan, J., Science, 142 (1963), pag. 678
- 7. Bickerstaff, G.F., Application of immobilized enzyme to fundamental studies on enzyme structure and function. In: Wiseman, A. (Hrsg) Topics in enzyme and fermentation biotechnology, Wiley, New York, 1984, vol. 4, pag. 162
- 8. Bickerstaff, G.F., Enzymes in Industry and Medicine, Edward Arnold, London, 1991
- 9. Bowers, L.D. și Carr, P.W., Immobilized enzymes in analytical chemistry. In: Fiechter, A. (Hrsg) Advances in biochemical engineering, Springer Berlin, 1980, vol. 5, pag. 89
- 10. Brodelius, P., Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts. In: Advances in Biochemical Engineering, 10 (1978), pag. 75
- 11. Brodelius, P. și Mosbach, K., Immobilized plant Cells. In: Perlman, D. Advances in applied microbiology, Acad.Press New York, 1982, vol. 28, pag. 1
- 12. Brodelius, P. și Vandamme, E., J. Immobilized Cell Systems in Biotechnology. A Comprehensive Treatise in 8 Volumes, VCH, Ed. J.F. Kennedy, 1987, vol. 7a, cap. 8
- 13. Bruce, A., Brady, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. și Watson, J.D., Molecular Biology of the Cell-Third Ed. Garland

Publishing, Inc. New York, London, 1994

14. Brümmer, W., Hennrich, N., Klockow, M., Lang, H. și Orth, H.D.
Eur. J. Biochem. 25 (1972), pag. 129
15. Chang, T.M.S., Artificial Cells, Thomas Springfield Illinois,
1972
16. Chang, T.M.S., Artificial cells mikroencapsulated bioreactants
including multienzyme systems. In: Polym. Mater. Sci. and Eng.
Proc. ACS Div. Polym. Mater. Sci. and Eng., Washington DC, 1988,
vol. 58, pag. 110
17. Chang, T.M.S., Artificial cells in medicine and biotechnology.
In: Appl. Biochem. and Biotechnol., 10 (1984), pag. 3
18. Cheetham, P.S.J., Developments in the immobilization of micro-
bial cells and their application. In: Wiseman, A. (Hrsg) Topics
in enzyme and fermentation biotechnology, Wiley, New York,
1980, vol. 4, pag. 189
19. Chibata, I., Immobilized Enzymes reserch and development,
Wiley, New York, 1978
20. Chibata, I. și Wingard, Jr., L.B., Applied biochemistry and
bioengineering, Immobilized microbial Cell, Acad. Press New
York, 1983, vol. 4
21. Chibata, I., Tosa, T. și Sato, T., Appl. Microbiol. 27 (1974),
pag. 878
22. Clement, G.E. și Potter, R., J.Chem.Educ. 48(10), 1971,
pag. 695
23. Dalrod, S.K. și Emple, M., Stud.Org.Chem. 29, 1987 (Biocatal.
Org. Media), pag. 419
24. Davis, H.G., Green, R.H., Kelly, D.R. și Roberts, S.M.,
Biotransformations in Preparative Organic Chemistry. The Use
of Isolated Enzymes and Whole Cell Systems in Synthesis,
Academic Press London, UK, 1989

25. Dumitru, N.F. și Iordăchescu, D., *Introducere în enzimologie*. Ed. Medicală, București, 1981
26. *Enzymes in Industry. Production and Applications*. Ed. W.Gerhartz, VCH, Verlagsgesellschaft Weinheim 1990
27. Faber, K., *Bio-transformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 1992
28. Falb, R.D., Lynn, J. și Shapira, J., *Experientia* 28 (1973), pag. 958
29. Filipopuson, H. și Hornby, W.E., *Biochem.J.* 120 (1970), pag. 215
30. Fukui, S. și Tanaka, A., *Adv.Biochem. Eng./Biotechnol.* 29 (1984), pag. 1
31. Fukui, S., Tanaka, A., Iida, T. și Hasegawa, E., *FEBS Lett.* 66 (1976), pag. 179
32. Fukui, S. și Tanaka, A., *Endeavour* 2 (1985), pag. 10
33. Fukui, J. și Tanaka, A., *Annu.Rev.Microbiol.* 36 (1982), pag. 145
34. Fukushima, S., Nagai, T., Tanaka, A. și Fukui, S., *Biotechnol. Bioeng.* 20 (1978), pag. 1465
35. Godfrey, I. și Reichelt, J., *Industrial enzymology: the applications of enzymes in industry*. Momillan, London, 1983
36. Guilbault, G.G., *Ann. New York Acad. Sci.* 361 (1981), pag.285
37. Hartmeier, W., *Immobilized Biokatalysatoren (Eine Einführung)*, Springer-Verlag Berlin, 1986
38. *Immobilized plant and animal cells*, Chioester, New York, 1983.
39. Kay, G. și Crook, E.M., *Nature (London)*, 216 (1967), pag.504
40. Kiersten, M. și Bucke, C., *Biotechnol.Bioeng.* 19 (1977), pag. 387
41. Klibanov, A.M., *Immobilized enzymes and cells as practical biocatalysts*, *Science* 219 (1983), pag. 722 ,

42. Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular Biology, Ed. T.S. Work, E. Work, North-Holland Publishing Comp., 1979 vol. 7
43. Lilly, M.D., Enzyme Microb. Technol. 8 (1986), pag. 315
44. Liu-Osheroff, P. și Guillory, R.J., Biochem.J. 127 (1972), pag. 419
45. Magearu, V., Controlul analitic al proceselor biotehnologice, Ed. Tehnică, București, 1988
46. Messing, R.A., Immobilized Enzymes for Industrial Reactors, Acad.Press New York, 1975
47. Methods in Enzymology, Ed. K.Mosbach, Acad. Press New York, 1976, vol. XLIV:
 - Antonini, E. și Fanelli, R.R., Immobilized Hemoproteins, pag. 11
 - Avramea, S., Immunoenzymatic Techniques for Biomedical Analysis, pag. 709
 - Broun, G.B., Chemically Aggregated Enzymes, pag. 263
 - Chambers, R.P., Cohn, W. și Baricco, W.H., Physical Immobilization of Enzymes by Hollow-Fiber Membranes, pag. 291
 - Chan, W.W.C., Immobilized Subunits in Methods in Enzymology, pag. 491
 - Chang, T.M.S., Microencapsulation of Enzymes and Biologicals pag 201
 - Chang, T.M.S., Methods for the Therapeutic Applications of Immobilized Enzymes, pag. 676
 - Dinelli, O., Marconi, W. și Morisi, F., Fiber-Entrapped Enzymes, pag. 227
 - O'Driscoll, K.F., Techniques of Enzyme Entrapment in Gels, pag. 169

- Epton, R., Hibbert, B.L. și Thomas, T.H., Enzymes Covalently Bound to Polyacrylic and Polymethacrylic Copolymers, pag. 84
- Gabel, D. și Axén, R., Characterization of Immobilized Enzymes by Chemical Methods, pag. 383
- Gabel, D. și Kasche, V., Conformational Transitions in Immobilized Proteases, pag. 526
- Goldstein, L., Kinetics of Immobilized Enzyme Systems, pag. 397
- Gregoriadis, G., Enzyme Entrapment in Liposomes, pag. 218
- Gregoriadis, G., Medical Applications of Liposome-Entrapped Enzymes, pag. 698
- Guilbault, G.G., Enzyme Electrodes and Solid Surface Fluorescence Methods, pag. 579
- Gurne, D. și Shemin, D., The Synthesis of Porphobilinogen by Immobilized δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase, pag. 844
- Hornby, W. și Goldstein, L., Immobilization of Enzymes on Nylon, pag. 118
- Horton, H.R. și Swaisgood, H.E., Immobilization as a Means of Investigating the Acquisition of Tertiary Structure in Chymotrypsinogen, pag. 516
- Jones, J.B., On the Potential of Soluble and Immobilized Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, pag. 831
- Lilly, M.D., Enzymes Immobilized to Cellulose, pag. 46
- Lilly, M.D. și Dunnill, P., Immobilized Enzymes Reactors, pag. 746
- Maltiasson, B. și Mosbach, K., Assay Procedures for Immobilized Enzymes, pag. 335

- Manecke, G. și Schlünsen, J., Immobilization of Enzymes on Neutral and Ionic Carriers, pag. 107
- Messing, R.A., Adsorption and Inorganic Bridge Formations, pag. 148
- Mosbach, R., Koch-Schmidt, A.Ch. și Mosbach, Kl., Immobilization of Enzymes to Various Acrylic Copolymers, pag. 53
- Mosbach, K. și Mattiason, B., Multistep Enzyme Systems, pag. 453
- Mosbach, K., Larsson, P.O. și Lowe, C., Immobilized Coenzymes, pag. 859
- Ollis, D.F. și Datta, R., Activity Correlations between Similarly Modified Soluble and Immobilized Enzymes, pag.444
- Pastore, M. și Morisi, F., Lactose Reduction of Milk by Fiber-Entrapped β -Galactosidase. Pilot-Plant Experiments, pag. 822
- Porath, J. și Axén, R. Immobilization of Enzymes to Agar, Agarose and Sephadex Supports, pag. 19
- Poulsen, P.B. și Zittan, L., Continuous Production of High-Fructose Syrup by Cross-Linked Cell Homogenates Containing Glucose Isomerase, pag. 809
- Pye, E.K. și Chance, B., Investigation of the Physical Properties of Immobilized Enzymes, pag. 357
- Srere, P.A. și Uyeda, K., Functional Groups on Enzyme Suitable for Binding to Matrices, pag. 11
- Turkova, J., Immobilization of Enzymes on Hydroxyalkyl Metacrylate Gels, pag. 66
- Vieth, W.R. și Venkatasubramanian, K., Collagen-Immobilized Enzyme Systems, pag. 273
- Weetall, H.H., Covalent Coupling Methods for Inorganic

- Support Materials, pag. 134
- Weetall, H.H., Vann, W.P., Pitcher, Jr.W.H., Lee, D.D., Lee, Y.Y. și Tsao, G.T., Scale-Up Studies on Immobilized, Purified Glucoamylase, Covalently Coupled to Porous Ceramic Support, pag. 776
- Zaborsky O., Immobilized Enzymes-Miscellaneous Methods and General Clasification, pag.317
- 48. Mitz, M.A. și Summaria, L.J., Nature (London) 189 (1961), pag. 576
- 49. Nelson, J.M. și Griffin, E.G., J.Amer.Chem.Soc. 38 (1916), pag.1109
- 50. Okita, W.B., Bonham, D.B. și Gainel, J.L., Biotechol.Bioeng. 27 (1985), pag. 632
- 51. Park, T.H. și Kim, I.H., Appl.Microbiol.Biotechnol. 22, (1985), pag. 190
- 52. Pike, V.W., Synthetic Enzymes in Biotchnology. A Comprehensive Treatise in 8 Volumes VCH, Ed. J.F.Kennedy, 1987, vol. 7a, cap. 9
- 53. Principle of Biotechnology (Sec.Ed.), Ed. A.Wiseman., Surrey University Press, Black and Son, Ltd, 1988
- 54. Quischo, F.A. și Richards, F.M., Proc.Natl.Acad.Sci. 52 (1964) pag. 833
- 55. Radovich, J.M., Enzyme Mikrobial. Technol. 7 (1985), pag. 2
- 56. Rose, A.H. (Hrsg), Microbial enzymes and bioconversions, Acad.Press London, 1980
- 57. Rouxhet, P.G., Haecht, J.L., van, Didelez, J., Gerard, P. și Briquet, M., Enzyme Microbiol. Technol. 3 (1981), pag. 49
- 58. Sato, T., Mori, T., Tosa, T. și Chibata, I., Arch.Biochem. Biophys. 147 (1971) pag. 788
- 59. Sato, T., Nishida, Y., Tosa, T. și Chibata, I., Biochem.

Biophys. Acta 570 (1979), pag. 179

60. Takata, I., Tosa, T. și Chibata, I., J.Solid Phase Biochem. 2 (1977), pag. 225
61. Takata, I., Yamamoto, K., Tosa, T. și Chibata, I., Enzyme Microb. Technol. 2 (1980), pag. 30
62. Tanaka, H., Kurosawa, H., Kokufutu, E. și Veliky, I.A., Biotechnol. Bioeng. 26, (1984), pag. 1393
63. Tosa, T., Sato, T., Mori, T., Yamamoto, K., Takata, I., Nishida, Y. și Chibata, I., Biotechnol. Bioeng. 21, (1979) pag. 1967
64. Viesturs, U., Šmite, I. și Žileviča, A. Biotechnologie. Agenți biotehnologici, tehnologii, aparatură. Ed. Ceres București, 1991
65. Voet, D. și Voet, J.G., Biochemistry. John Wiley and Sons, Inc. 1990
66. Weliky, N.N., Buowa, F.S. și Dale, E.C., Arch. Biochem. Biophys. 131, (1961), pag. 1
67. The Working Party of Immobilized Biocatalysts, Enzyme Microb. Technol. 5, (1984), pag. 304
68. Yamamoto, K., Tosa, T., Yamashita, K. și Chibata, I., Eur.J.Appl.Microbiol. 3 (1976), pag. 169
69. Yamamoto, K., Tosa, T. și Chibata, I., Biotechnol.Bioeng. 22 (1980), pag. 2045
70. Scriban, R. (Coordonnateur): Biotechnologie. Ed. IV, Ed. Technique et Documentation - Lavoisier Paris, 1993.

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 292/1996 la
Tipografia Editurii Universității din București

VERIFICAT
2007



VERIFICAT
2017

ISBN 973 - 575 - 123 - 2

Lei 8200