

IMOBILIZIRANI ENCIMI

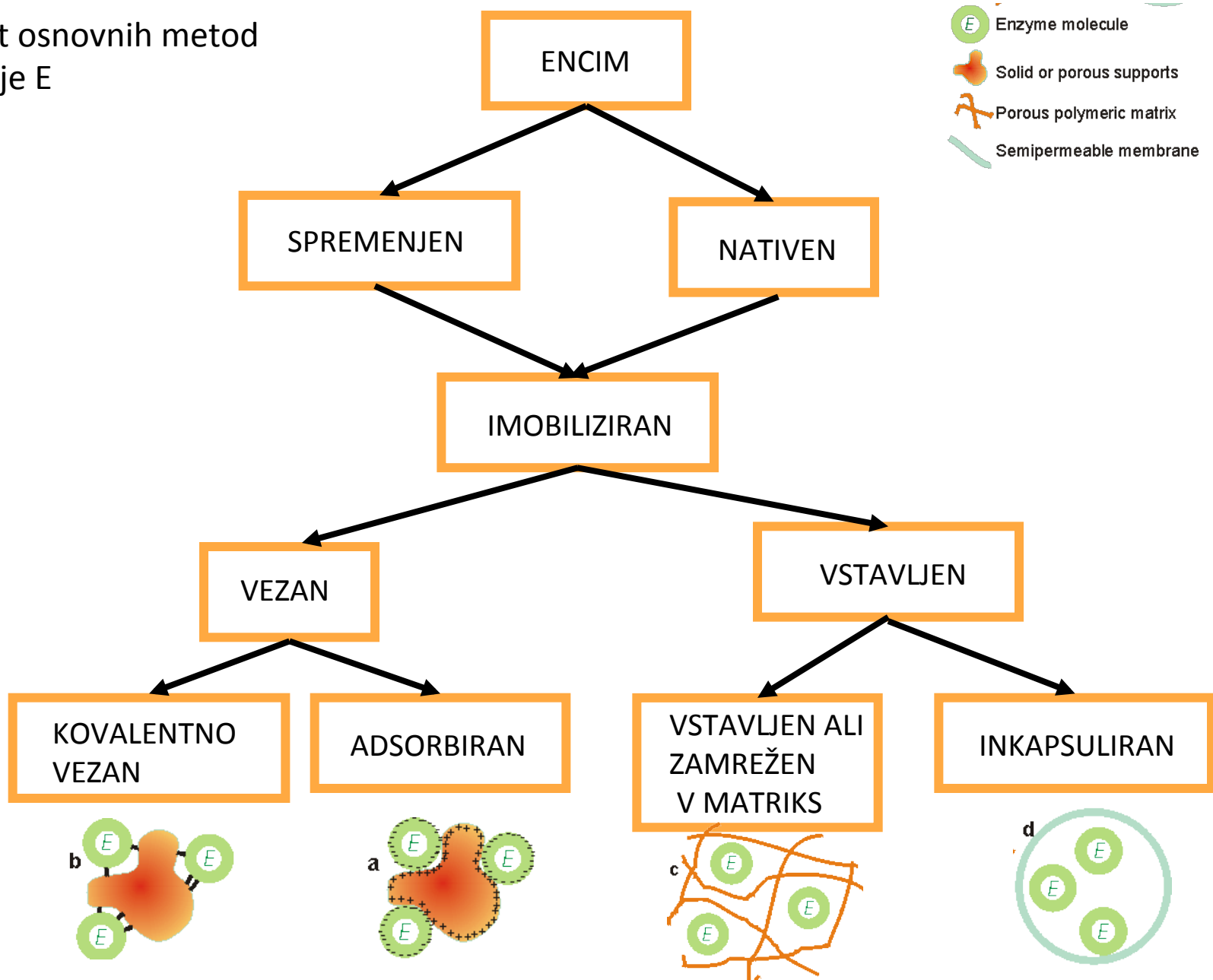
- cena encima v povprečju 1 EUR/mg
 - odvisno od priprave
 - dolžina življenske dobe encima
- uporaba dvofaznega sistema
 - encim ujet v eni fazi → primeren za večkratno uporabo
 - reaktanti prosti v reakcijski mešanici
 - imobilizirani encimi
- definicija: encimi, ki se jih reciklira
- Kateri so kriteriji za imobilizacijo?
 - enostavnost
 - velika učinkovitost
 - možnost avtomatizacije (povezano s ceno)
 - pomen za proces
 - izboljšana kontrola procesa
 - kontinuirno delo (problem kontaminacije z m.o.)
 - pomen za produkt
 - ohranjanje kvalitete
 - produkt ni kontaminiran z E

IMOBILIZIRANI ENCIMI

- profitabilnost
 - pri zelo dragih encimih
 - pri nizkomolekularnih substratih
 - pri procesih, kjer je kontaminacija z m.o.
 - ko se potrebuje produkt brez kontaminacije z encimom
- veliko patentov
- malo imobiliziranih encimov v uporabi
 - acilaza
 - penicilin G acilaza
 - lipaze
 - proteaze
 - nitrilaze
 - amilaze
 - invertaza

IMOBILIZIRANI ENCIMI

- razvitih pet osnovnih metod imobilizacije E

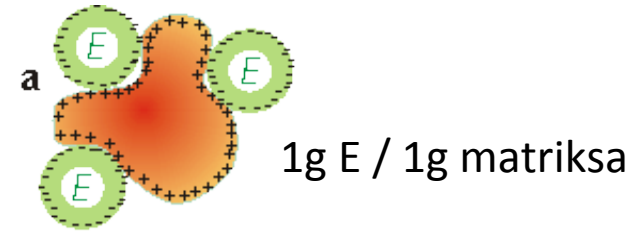


IMOBILIZIRANI ENCIMI

- kako pridobiti najboljše lastnosti imobiliziranega encima
- vpliv na stabilnost encima
 - narava nosilca (kemijske in fizikalne lastnosti)
 - vezavno mesto in število vezi
 - prostorska svoboda v smislu konformacijskih sprememb
 - mikrookolje v katerem se E nahaja
 - dolžina in narava vmesnika (spacer)
 - pogoji pod katerimi se je E imobiliziral
- vpliv na aktivnost encima
 - vpliv mikrookolja
 - pH
 - konformacijska fleksibilnost encima
 - vodni/manj vodni mediji
 - hidratacija/dehidratacija
 - orientacija molekule
 - način vezave (št. vezi)

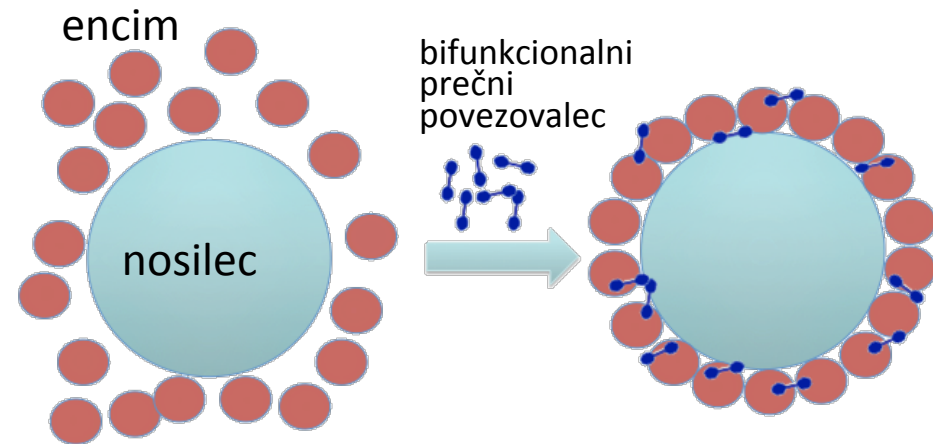
IMOBILIZIRANI ENCIMI- imobilizacija z adsorbcijo

- prednosti:
 - reverzibilnost vezave in ponovno možna uporaba nosilca
 - enostavna adsorpcija pod milimi pogoji
 - ohranitev aktivnosti, ker ni kemijskih modifikacij
 - velika kapaciteta vezave 1gE/ 1g matriksa



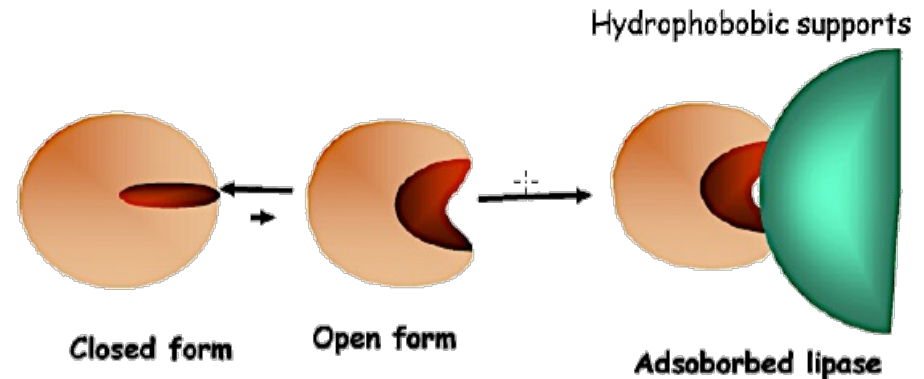
- slabosti:
 - odpuščanje z nosilca
 - šibke interakcije vezave
 - vpliv Δ ionske jakosti
 - pH
- adsorpcija na nosilec je lahko:
 - nespecifična
 - biospecifične
 - afinitete do kovinskih ionov ali barvil
 - elektrostatske interakcije (ion. izm. 1g E/1g matriksa)
 - hidrofobne interakcije

Prečno povezan encim



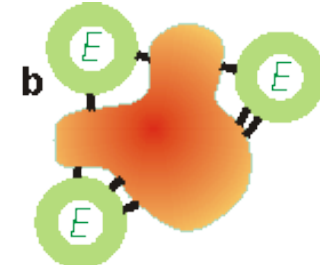
- aktivnost je lahko:
 - ohranjena (glukoza izomeraza)
 - večja (lipaza adsorbirana na polimetilmetakrilat)
 - manjša (glutamat dehidrogenaza preko hidrofob. interakcij)

- primer adsorpcija lipaze
 - lipaza v dveh oblikah
 - manj aktivna zaprta
 - bolj aktivna odprta
 - vezava pri nizki ionski jakosti
 - ni primerno za velike substrate

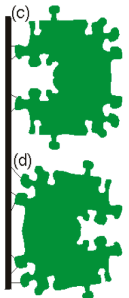
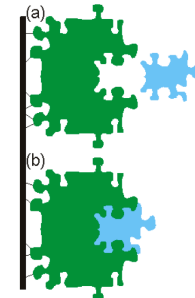
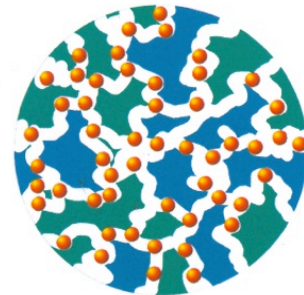
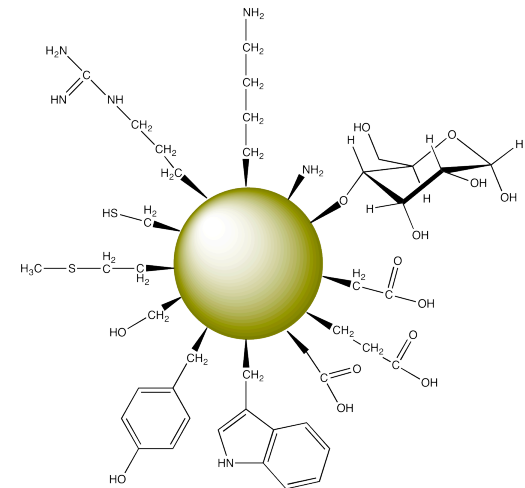


IMOBILIZIRANI ENCIMI- kovalentna imobilizacija

- Kateri so tisti parametri, ki jih je pri vezavi potrebno upoštevati?
 - fizikalne lastnosti nosilca
 - velikost por
 - velikost delcev
 - poroznost
 - oblika
 - kemijska narava nosilca
 - ogrodje (inertno, kompatibilno z E)
 - narava vezave in vezavna kemija
 - konformacija vezanega E
 - orientacija encima
 - narava in dolžina distančnika
 - linearni/globularni
 - veliki/majhni
 - hidrofilni/hidrofobni
 - število vezi med E in nosilcem
 - distribucija na nosilcu

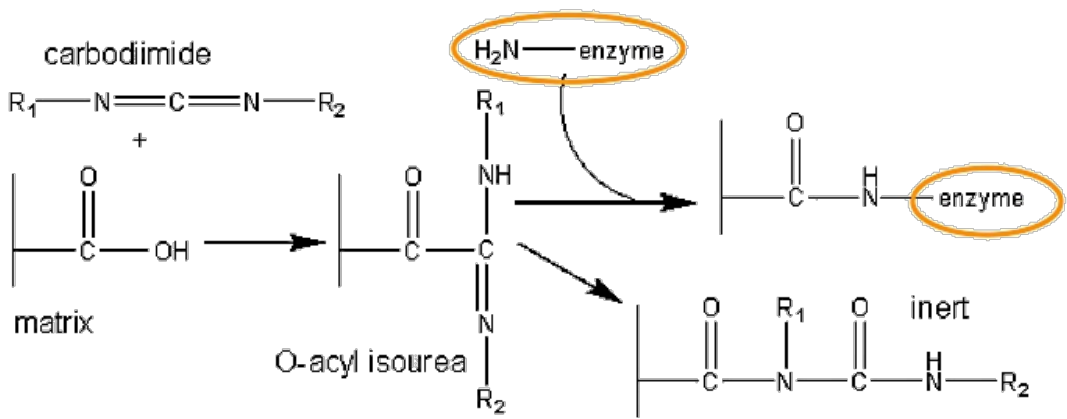
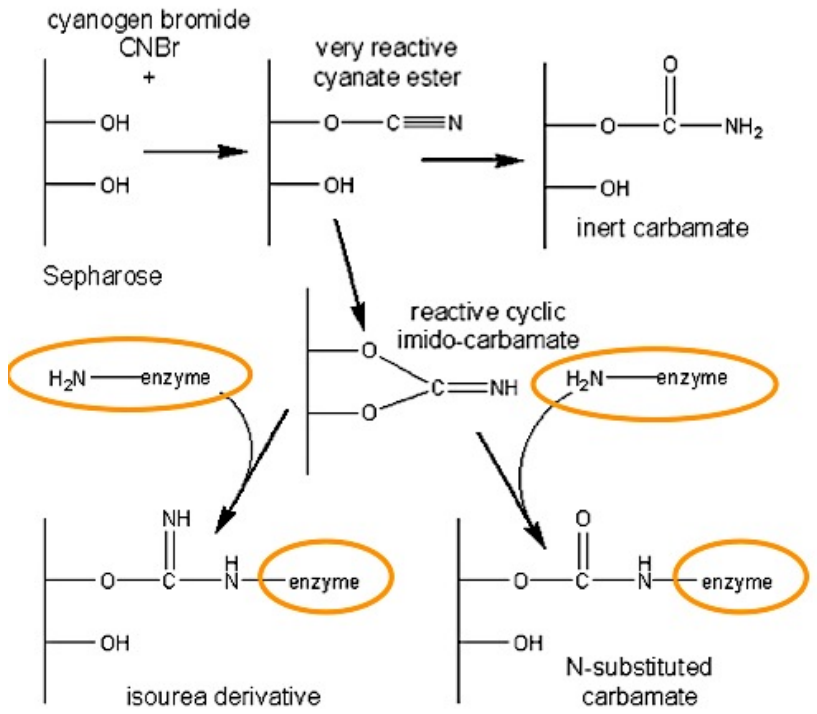


0.02g E/g matriksa

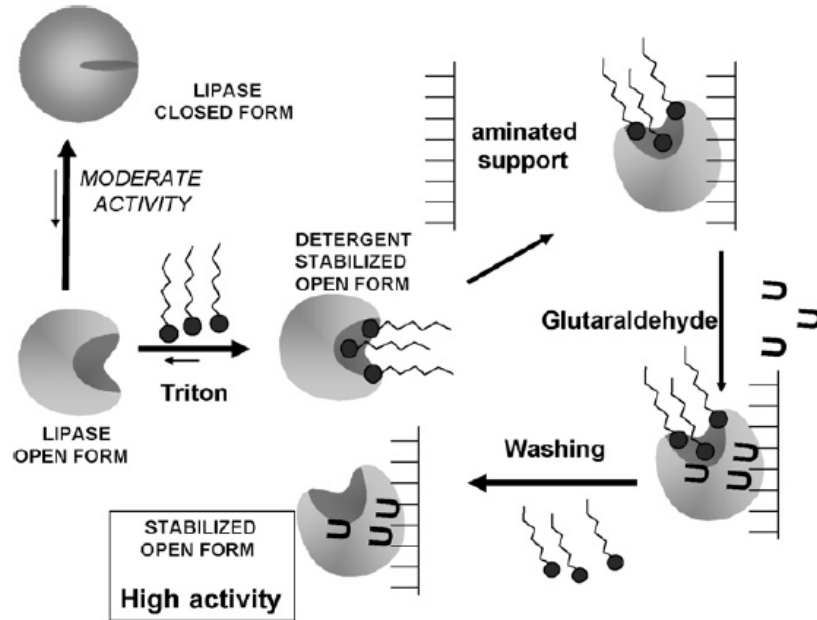


IMOBILIZIRANI ENCIMI

- kovalentna vezava preko
 - nukleofilnih skupin encima (Cys, Lys, Tyr, His)
 - aktivno skupino na nosilcu
- reakcije vezave
 - cianogen bromidna reakcija
 - karbodiimidna reakcija
 - glutaraldehidna reakcija
 - silanizacija



IMOBILIZIRANI ENCIMI



imobilizacija lipaze v prisotnosti detergenta

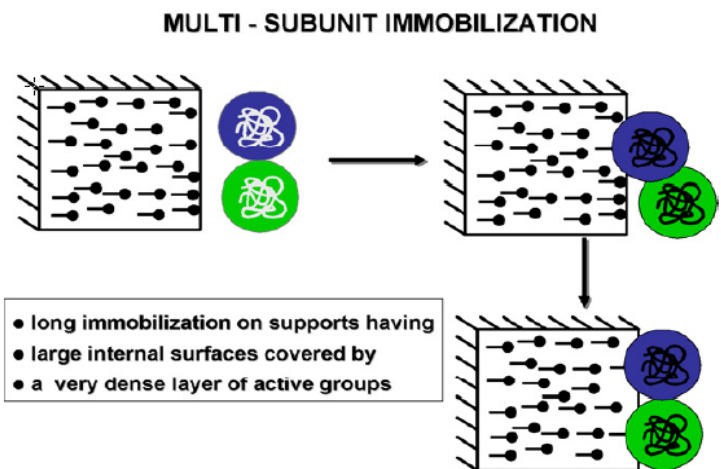


Fig. 3. Stabilization of dimeric enzymes by multisubunit stabilization.

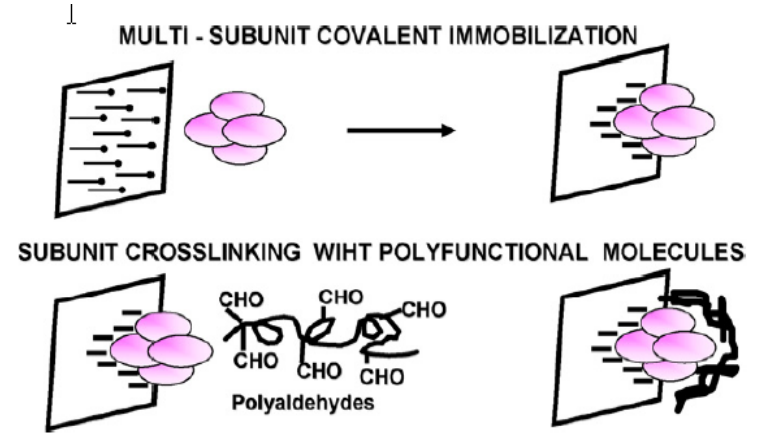


Fig. 4. Stabilization of complex multimeric enzymes by multisubunit stabilization plus crosslinking with polyfunctional-polymers.

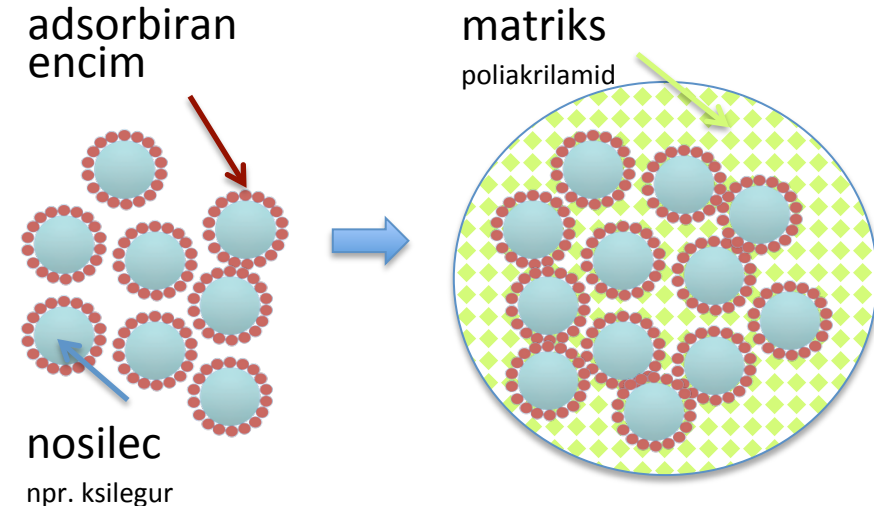
IMOBILIZIRANI ENCIMI – zajetje encima

- primerno za majhne S in P
- akrilamid, celulozni acetat
- Ca alginat (polisaharid), hitozan
- derivatizacija Lys za kovalentno pritrnitev (akriloil klorid $\text{CH}_2\text{-CH-COCl}$)



- postopek zajetja encima:
 - encim dispergirani v topni obliki matriksa (polimer)
 - pretvorba v netopno obliko
 - prečno povezovanje
 - polimerizacija
 - gelatinizacija
 - velikost merže je prirejena velikosti in obliki proteina/celice
 - primerno za encime in tudi celice
 - stabilnost encima

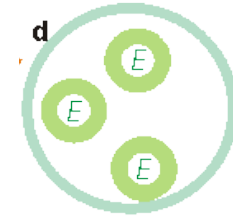
Ujetje adsorbiranega encima



IMOBILIZIRANI ENCIMI – inkapsulacija

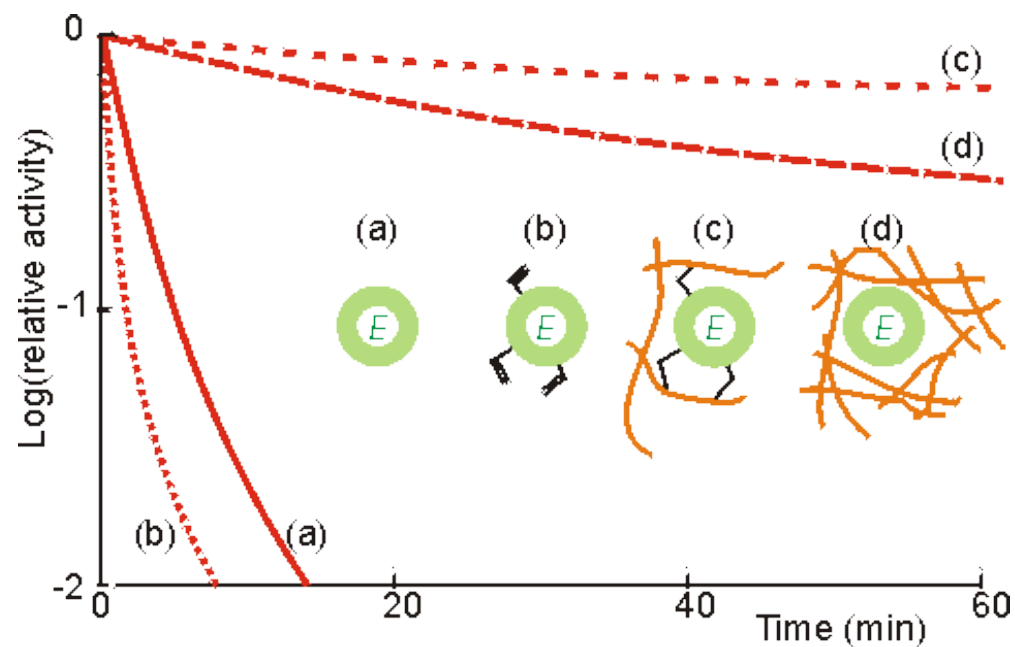
- nastanek sferične membranske bariere
 - 1-100 μm premer
 - encimi znotraj kapsule so nespremenjeni
 - P in S prehajajo
 - primerno za multiencimski sistem

- Izvedba:
 - liposomi
 - ovojnica okoli vodnih kapljic
 - encim v 1,6 diaminoheksan
 - disperzija v vodno raztopino heksadionske kisline v kloroformu
 - nastane tanek polimer okoli vodne kapljice, kjer se nahaja encim



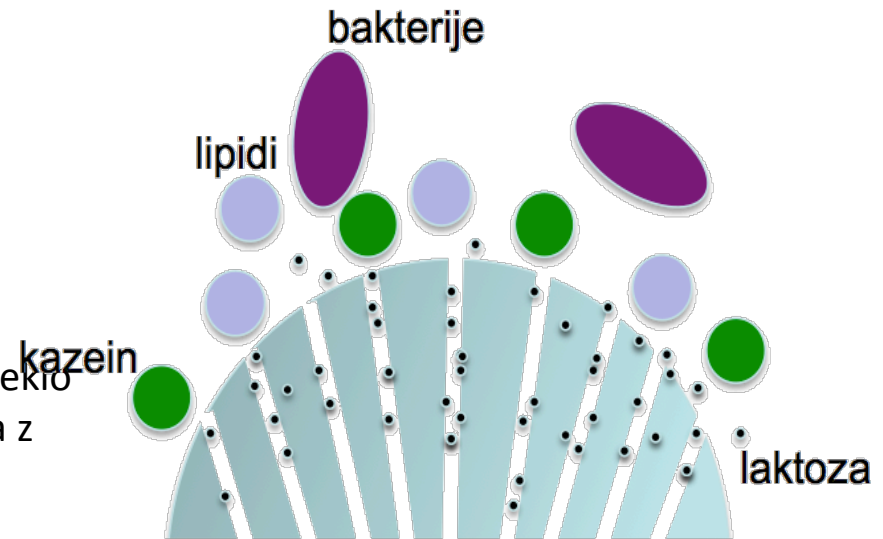
IMOBILIZIRANI ENCIMI – kinetika immobiliziranega encima

- a) nativni kimotripsin
- b) akrilolil-kimotripsin (do 12 ak modific.)
- c) akrilolil-kimotripsin kopolimeriziran v polimetakrilatnem gelu
- d) kimotripsin ujet v polimetakrilatnem gelu



IMOBILIZIRANI ENCIMI- primeri: glukoza izomeraza

- laktaza hidrolizira laktozo
 - produkt glukoza in galaktoza
 - izjemno sladek in topen v vodi
 - namenjen je ljudem z laktozno intoleranco
- pri razvoju metode velika težava s kontaminacijo z m.o.
 - mlekom in sirotko
 - čiščenje in dezinfekcija (H₂O₂ ali kvartarne amonjeve spojine)
 - predhodna sterilizacija
 - delo v hladnem (5°C)
- metoda v klasični obliki ni zaživela
- PLEXAZYM je nov sistem, ki omogoča hidrolizo velike količine laktoze
 - laktaza je imobilizirana na porozno pleksi steklo
 - omogoča 200 dni kontinuiranega delovanja z minimalno izgubo aktivnosti
 - 1 tona sirotke / kg nosilca/dan
 - Potrebno je dovajati zrak
 - nosilec se na koncu spreje z vodo in dezinficira z 0,1% benzalkonijevim kloridom.



IMOBILIZIRANI ENCIMI – primeri: lipaza

- kemijska hidroliza naravnih maščob in olj v velikem obsegu
 - delo pri visokih T (260oC)
 - pod pritiskom 50 barov
 - tehnologija neprijazna do okolja,
- pristop z encimi:
 - računica:
 - običajna naprava (parilnik) z kapaciteto 50.000 ton na leto ima ceno ~ 0,01-0,02 \$/kg m.k.
 - uporaba tekoče lipaze (200\$/kg) in ob normalni uporabi za te namene cena 0,2\$/kg m.k.
 - uporaba imob. surovega preparata lipaze se stroški znižajo na 0,09 \$/ kg m.k.
 - ob recikliranju encima in upoštevanju stroškov čistilnih naprav cena primerljiva
- načini imobilizacija lipaze
 - kovalentna
 - adsorbpcija
 - zamreženje
- Prednosti imobilizirane lipaze:
 - stabilnost
 - ↑ konc glicerina (40%), ki še dodatno stabilizira imob. E in podaljšuje uporabo za 10x
 - čistost m.k., ki nastanejo je večja kot pri kemijskem procesu
 - proizvodnja zelo čistega glicerina (40% v primerjavi z 15% s kemijskim načinom)
 - pogoji tekom procesa so mili in omogočajo cepitev nenasičenih k.

**Nanobiotechnology:
Putting
Molecular Machines
to Work**