

Τεχνολογία Καθαρισμού Ενζύμων

Κατιούσα Επεξεργασία (Down Stream Processing)

- Με τον όρο Κατιούσα Επεξεργασία εννοούμε το σύνολο των σταδίων που ακολουθούνται μετά την ανάπτυξη της καλλιέργειας των μικροοργανισμών, με σκοπό την απομόνωση και τον καθαρισμό των ενζύμων στον επιθυμητό βαθμό.
- Ανάλογα με την τύχη των ενζύμων μετά τη βιοσύνθεσή τους, αυτά κατατάσσονται:
 1. Στα **ενδοκυτταρικά**, και
 2. Στα **εξωκυτταρικά** ένζυμα.
- Με βάση τον όγκο παραγωγής, τα ένζυμα κατατάσσονται:
 1. Στα **βιομηχανικά** ένζυμα, και
 2. Στα **μικρού όγκου** ή **υψηλής προστιθέμενης αξίας** ένζυμα.

Πηγές ενζύμων

- Η επιλογή της πηγής καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από ορισμένα χαρακτηριστικά του ενζύμου:

1. Εκλεκτικότητα της αντίδρασης.

- Ένζυμα από διαφορετικές πηγές πιθανόν να εμφανίζουν διαφορετική εκλεκτικότητα, π.χ. η ρεννίνη υδρολύει τον πεπτιδικό δεσμό Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ της κ-καζεΐνης, ενώ οι αλκαλικές πρωτεάσες υδρολύουν ποικιλία πεπτιδικών δεσμών (χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά).

2. pH δραστηριότητας και σταθερότητας του ενζύμου.

- π.χ. η παγκρεατική θρυψίνη εμφανίζει άριστη σταθερότητα σε pH 3.0 και μέγιστη δραστηριότητα σε pH 8.0, ενώ η ισομεράση της γλυκόζης από τον *Bacillus coagulans* εμφανίζει σταθερότητα σε pH 4.0-8.5 και δραστηριότητα σε pH 6.0-8.0.

3. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα και σταθερότητα του ενζύμου.

- Κατά κανόνα είναι επιθυμητή η θερμοαναθεκτικότητα των ενζύμων.
- Σε ορισμένες, όμως, περιπτώσεις ενδέχεται να προκαλέσει προβλήματα, π.χ. όταν είναι αναγκαία η μετουσίωση και αδρανοποίηση του ενζύμου μετά το τέλος της διεργασίας.

4. Κόστος παραγωγής ενζύμου.

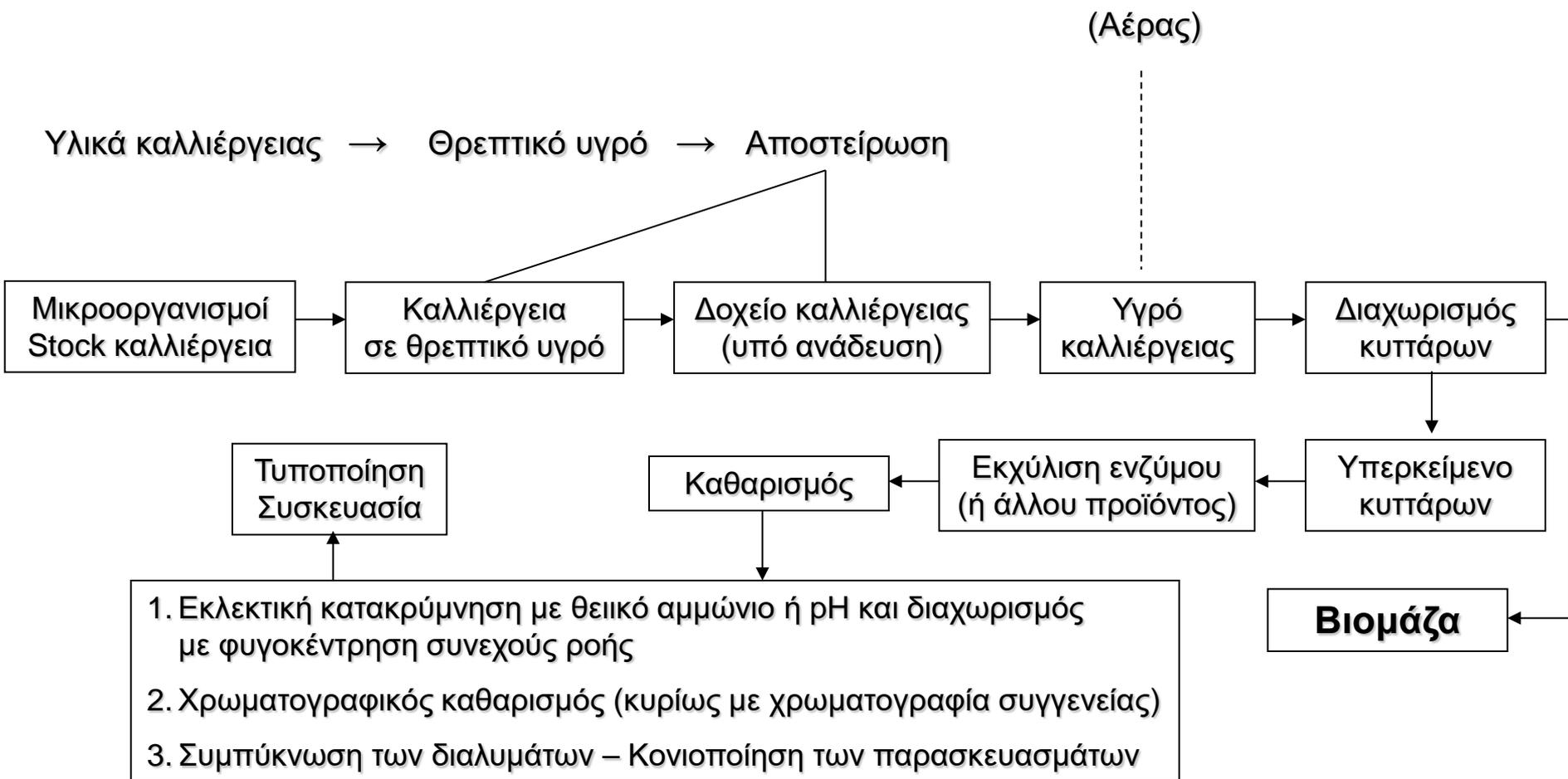
- Θα πρέπει να είναι τέτοιο, ώστε να είναι οικονομικά επιτρεπτή και συμφέρουσα η χρήση του βιοκαταλύτη στις βιομηχανικές διεργασίες.
- Το κόστος είναι μικρής σημασίας στις διαγνωστικές και θεραπευτικές χρήσεις, όπου εδώ το σημαντικότερο ρόλο παίζει η καθαρότητα και η εκλεκτικότητα του ενζύμου.
- Ως πηγές ενζύμων προτιμώνται γενικά μικροοργανισμοί, ακόμα και στην περίπτωση ενδοκυτταρικών ενζύμων, γιατί:

1. Έχουμε μικρότερο αριθμό σταδίων κατά την κατιούσα επεξεργασία, π.χ. οι εγκαταστάσεις ανάπτυξης του μικροοργανισμού και καθαρισμού του ενζύμου θα μπορούσαν να βρίσκονται στον ίδιο χώρο, ενώ αντιθέτως άλλες πηγές προϋποθέτουν τη συλλογή και μεταφορά της πρώτης ύλης στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις,
2. Οι μικροοργανισμοί διαχειρίζονται εύκολα σε τεχνητό περιβάλλον και δεν επηρεάζονται από εποχικούς παράγοντες,
3. Παρουσιάζουν σταθερότητα και προβλεψιμότητα στην απόδοση παραγωγής του ενζύμου,
4. Η παρουσία ορισμένων ουσιών στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης οδηγεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, σε εντυπωσιακή αύξηση της ποσότητας του ενζύμου, π.χ. η παρουσία αμύλου ενισχύει τη βιοσύνθεση α-αμυλάσης, η παρουσία γλυκόζης τη βιοσύνθεση οξειδάσης της γλυκόζης, κλπ,
5. Η εξαιρετικά μεγάλη ταχύτητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών παρουσιάζει τεχνολογικό πλεονέκτημα,

6. Είναι εφικτή η διαχείριση του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών για την αύξηση της παραγωγής του ενζύμου,

7. Η παρουσία πολλών φυτικών και ζωικών ενζύμων σε συγκεκριμένους ιστούς και όργανα αποτελεί πρόβλημα, καθώς η ειδική πηγή θα πρέπει να αποσπασθεί από το υπόλοιπο βιολογικό υλικό.

- Παρόλο τη μεγάλη γενετική και βιοχημική ποικιλία των μικροοργανισμών, μόνο ορισμένα είδη χρησιμοποιούνται για παραγωγή ενζύμων, εξ' αιτίας θεμάτων ελέγχου και ασφάλειας.



Σχ.2. Συνοπτική πορεία για παραγωγή και απομόνωση εξωκυτταρικών ενζύμων από μικροοργανισμούς.

- Γενικά, τα εξωκυτταρικά ένζυμα είναι ανθεκτικότερα, αφού προορισμός τους είναι να λειτουργούν σε μη «φιλικά» περιβάλλοντα.
- Αντίθετα, τα ενδοκυτταρικά ένζυμα είναι γενικά πιο ευαίσθητα, ιδίως μετά τον καθαρισμό.
- Μέσα στο κύτταρο παρουσιάζεται υψηλή πρωτεϊνική συγκέντρωση, η παρουσία οξυγόνου είναι περιορισμένη, ενώ υπάρχουν και διάφορες αναγωγικές ουσίες και μεταβολίτες.
- Οι παραπάνω συνθήκες σταθεροποιούν το ενζυμικό μόριο.
- Όταν, όμως, έχουμε διάρρηξη των κυττάρων και απελευθέρωση των ενζύμων, ο βιοκαταλύτης βρίσκεται πλέον σε «εχθρικό» περιβάλλον που πιθανόν να οδηγήσει σε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας.

- Γι' αυτό το λόγο, συνήθως ρυθμίζεται το pH σε εύρος 6-8 και όλη η κατιούσα διεργασία πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C).
- Καθώς είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η χημική τροποποίηση των λειτουργικών πλευρικών ομάδων του ενεργού κέντρου του ενζύμου (π.χ. μερική ή ολική οξείδωση των σουλφυδρυλομάδων), συνήθως προστίθενται στο ρυθμιστικό διάλυμα αναγωγικά αντιδραστήρια (π.χ. β-μερκαπτοαιθανόλη) ή χηλικές ενώσεις που δεσμεύουν ιόντα μετάλλων (τα οποία ενεργοποιούν το οξυγόνο και κατά συνέπεια την οξείδωση).
- Η προσθήκη χηλικών ενώσεων αποφεύγεται στην περίπτωση που η δράση του ενζύμου εξαρτάται από ιόντα μετάλλων.
- Είναι προφανές ότι η παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων οδηγεί σε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας.

Πίνακας 2. Στάδια και τεχνικές κατιούσας επεξεργασίας.

| Στάδιο | Σκοπός σταδίου | Συνήθεις Τεχνικές |
|------------------|---|------------------------------------|
| <i>A. Αρχικό</i> | Εξωκυτταρικό ένζυμο 1. Παραλαβή υγρής φάσεως (διαχωρισμός υγρών- στερεών) | Φυγοκέντριση ή διήθηση |
| | Ενδοκυτταρικό ένζυμο 1. Παραλαβή κυττάρων (διαχωρισμός υγρών/στερεών) | Φυγοκέντριση ή διήθηση |
| | 2. Διάρρηξη κυττάρων | Μηχανικές-μη μηχανικές τεχνικές |
| | 3. Απομάκρυνση στερεών (κυττάρων, μεμβρανών, θραυσμάτων κυττάρων, κ.α.) | Φυγοκέντριση ή διήθηση |

| Στάδιο | Σκοπός σταδίου | Συνήθεις Τεχνικές |
|---------------------------------|---|---|
| <i>B. Χαμηλού καθαρισμού</i> | 1. Απομάκρυνση νουκλεϊκών οξέων 2. Απομάκρυνση μέρους των πρωτεϊνών | Κατακρύμνιση, ενζυμική υδρόλυση Κατακρήμνιση, διφασικό σύστημα κατανομής |
| <i>Γ. Υψηλού καθαρισμού</i> | Τελικός καθαρισμός ενζύμου | Υγρή χρωματογραφία στήλης |
| <i>Δ. Μορφοποίηση προϊόντος</i> | Συμπύκνωση προϊόντος, απομάκρυνση μικρομοριακών ουσιών, σταθεροποίηση, συσκευασία. Ποιοτικός έλεγχος προϊόντος. | Υπερδιήθηση, κατακρήμνιση |

Διάρρηξη των κυττάρων

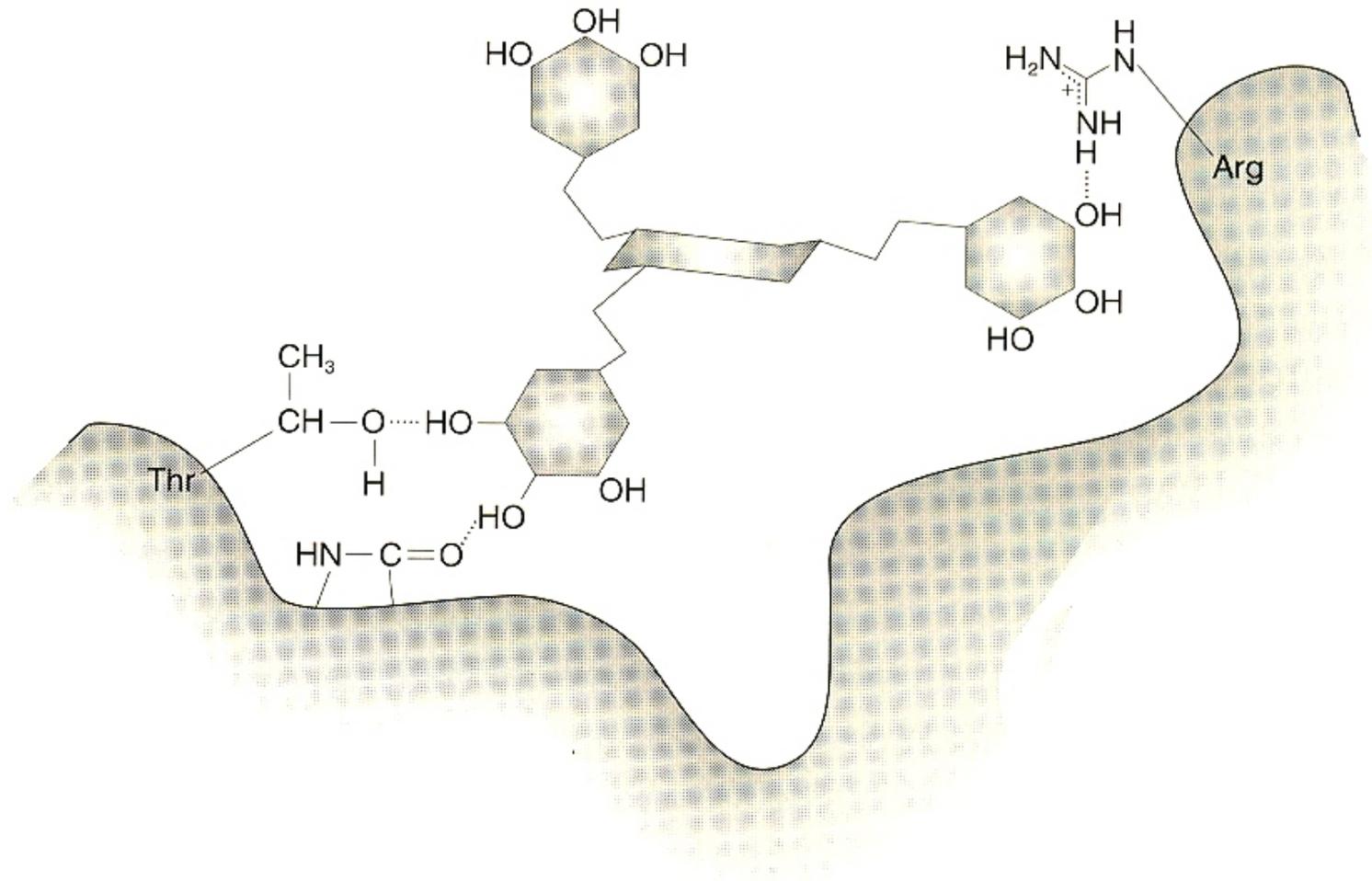
- Η παραλαβή των ενδοκυτταρικών ενζύμων προϋποθέτει τη διάρρηξη ή ομογενοποίηση των κυττάρων.

Ζωικά κύτταρα

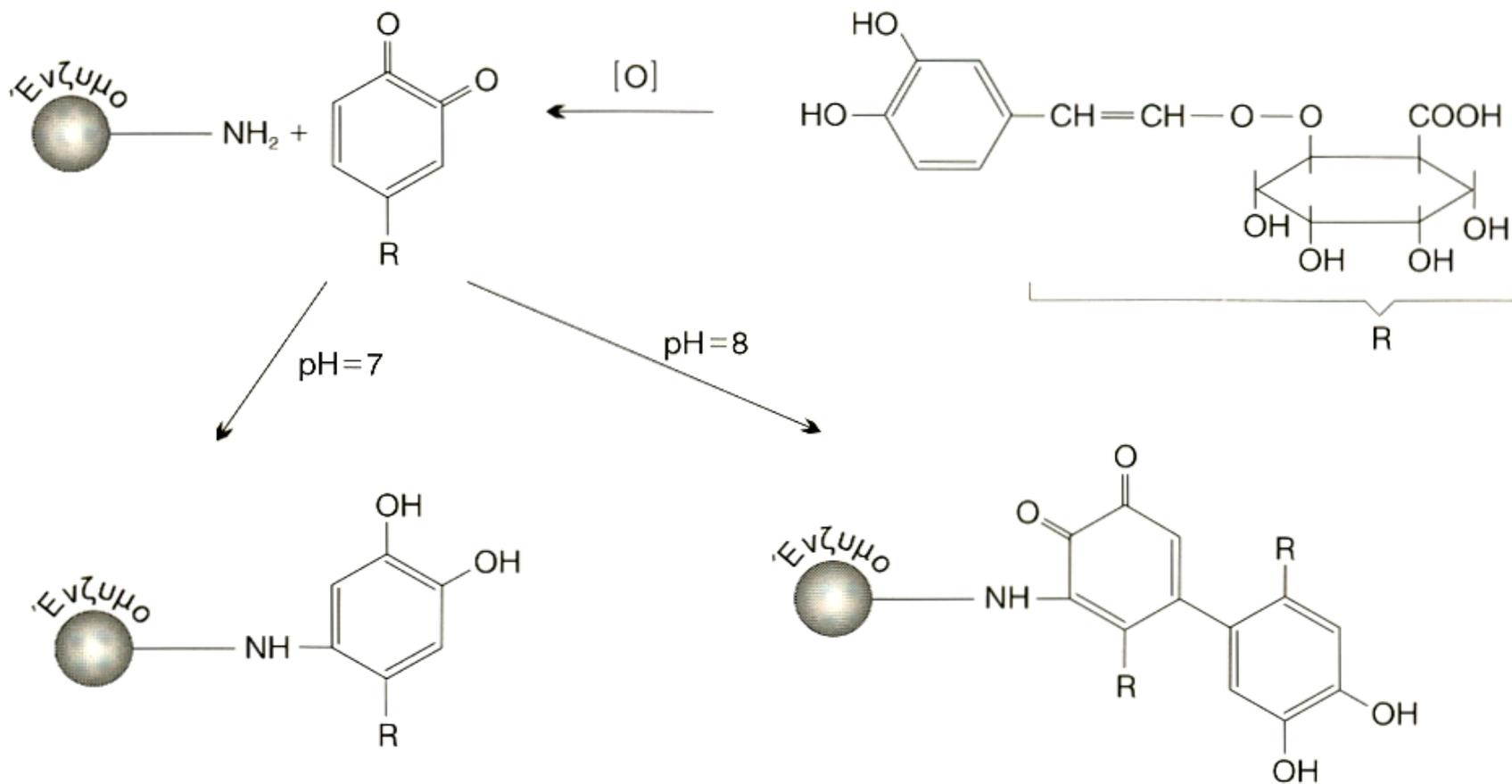
- Θεωρούνται ως τα πιο ευαίσθητα.
- Η διάρρηξή τους είναι σχετικά εύκολη.
- Τρόποι διάρρηξης:
 1. Φυγοκέντριση, πλύση με φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl, 0.15M) και προσθήκη νερού στην κατάλληλη αναλογία. Η διάρρηξη επιτυγχάνεται λόγω διαφοράς ωσμωτικής πιέσεως.
 2. Χρήση απορρυπαντικών και εφαρμογή υπερήχων μικρής εντάσεως.
 3. Επεξεργασία με εκχυμωτή (blender) παρουσία ψυχρού ρυθμιστικού διαλύματος.

Φυτικοί ιστοί

- Λόγω του ανθεκτικού κυτταρικού τοιχώματος, η διάρρηξή τους είναι γενικά δύσκολη.
- Χαρακτηριστικό πρόβλημα που ανακύπτει συχνά είναι η παρουσία ανεπιθύμητων πολυφαινολικών ενώσεων, οι οποίες αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους με τα ένζυμα, με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους.
- Η μείωση τέτοιων αλληλεπιδράσεων συνήθως επιτυγχάνεται με προσθήκη συνθετικών πολυαμιδίων (πολυβινυλο-πολυπυρρολιδόνης), τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα φαινολικά υδροξύλια.
- Τρόποι διάρρηξης:
 1. Ταχεία επεξεργασία με εκχυμωτή σε ψυχρό περιβάλλον.
 2. Κονιορτοποίηση μετά από προσθήκη υγρού αζώτου και στη συνέχεια εκχύλιση.



Σχ.3. Συμπλοκοποίηση πολυφαινολών και ενζύμου μέσω δεσμών υδρογόνου.



Σχ.4. Αντίδραση πολυφαινολών με πρωτεΐνες μέσω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών.

Μικροοργανισμοί

- Οι τεχνικές διάρρηξης διακρίνονται σε **μη μηχανικές** και σε **μηχανικές**.

Μη μηχανικές τεχνικές

1. Το ωσμωτικό σοκ χρησιμοποιείται με επιτυχία στα Gram (-) βακτήρια.

- Αντίθετα, δεν έχει αποτέλεσμα στα Gram (+) βακτήρια, λόγω της καλής μηχανικής αντοχής του κυτταρικού τοιχώματος.

- Η τεχνική προβλέπει την έκθεση των κυττάρων σε διάλυμα σακχαρόζης (20-25%), ώστε να συρρικνωθούν τα κύτταρα λόγω αφυδατώσεως, και στη συνέχεια εισαγωγή σε ψυχρό νερό, οπότε και έχουμε διάρρηξη.

2. Επεξεργασία με βάση (pH 11.0-12.5, για 20min) οδηγεί σε κυτταρική λύση, ενώ καταστρέφει ανεπιθύμητες πρωτεάσες.

3. Η χρήση επιφανειοδραστικών ή τασιενεργών ενώσεων (Tween 80, Triton, κλπ) βοηθούν στη διαλυτοποίηση λιπών και λιποπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης και οδηγούν σε αύξηση της διαπερατότητας.

4. Η χρήση οργανικών διαλυτών (τολουόλιο, ακετόνη, κλπ) οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης.

5. Ενζυμική λύση με χρήση λυσοζύμης (υδρολύει τους β -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς των βλεννοπεπτιδίων του κυτταρικού τοιχώματος).

- Συνήθως, η χρήση της λυσοζύμης δεν είναι από μόνη της αρκετή, οπότε χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές, π.χ. ωσμωτικό σοκ.

Μηχανικές τεχνικές

1. Υπέρηχοι.

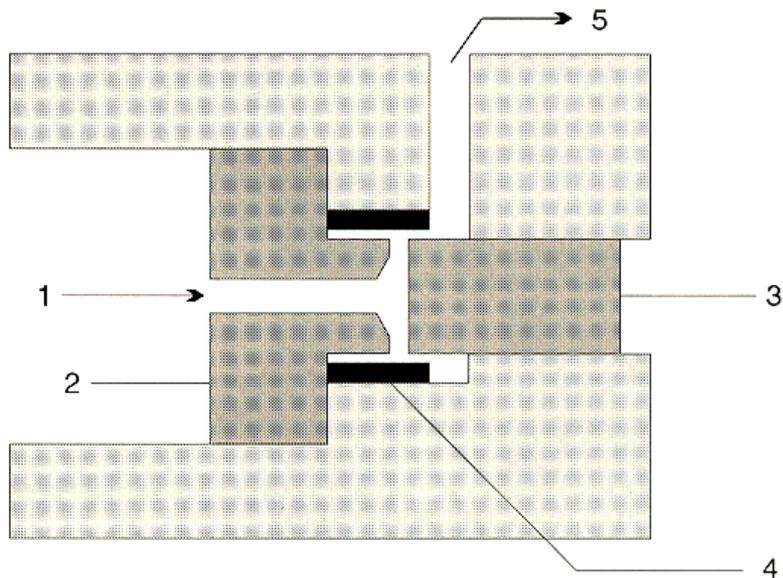
- Πρέπει να εφαρμόζεται παράλληλα και ψύξη ή περιοδικά διακοπή της διεργασίας, γιατί η χρήση υπερήχων οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας.
- Η τεχνική δεν εφαρμόζεται σε βιομηχανική κλίμακα.

2. Ομογενοποίηση με υψηλή πίεση.

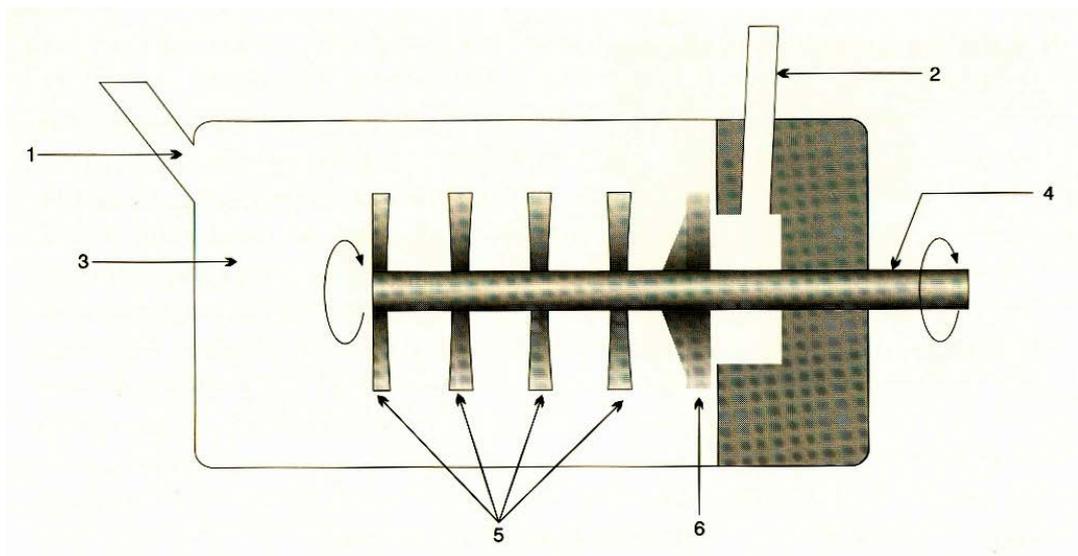
- Η διάρρηξη για τα Gram (-) βακτήρια είναι δυνατόν να φθάσει στο 80%, ενώ για 90% διάρρηξη απαιτείται ανακύκλωση του υλικού.
- Η τεχνική είναι λιγότερο αποτελεσματική για Gram (+) βακτήρια.

3. Μηχανικός θρυμματισμός ή άλεση με κόκκους.

- Εφαρμόζεται βιομηχανικά.
- Οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας, γι' αυτό είναι απαραίτητη η ψύξη.



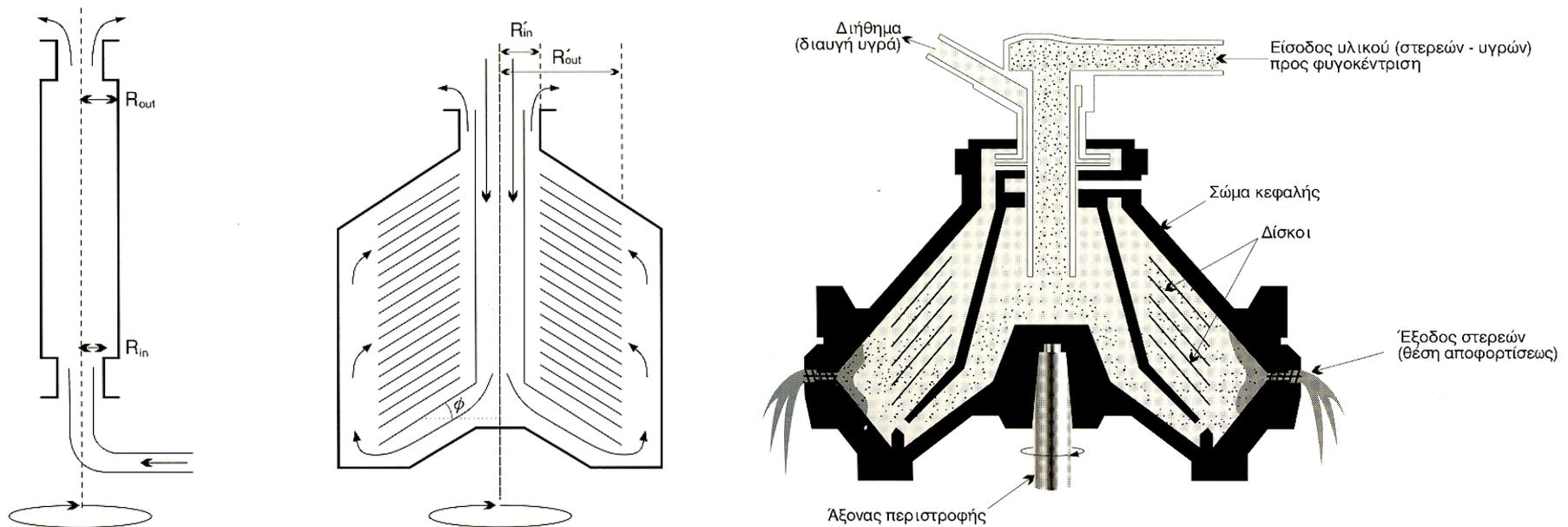
Σχ.5. Ομογενοποίηση υψηλής πίεσης. (1) Είσοδος, (2) Έδρα βαλβίδας, (3) Ράβδος βαλβίδας, (4) Δακτύλιος πρόσκρουσης, (5) Έξοδος.



Σχ.6. Μηχανικός θρυμματιστής. (1) Είσοδος, (2) Έξοδος, (3) Δονούμενος κυλινδρικός θάλαμος, (4) Περιστρεφόμενος άξονας, (5) Πτερύγια, (6) Δυναμικός διαχωριστής.

Φυγοκέντριση

- Η φυγοκέντριση είναι η κύρια μέθοδος, μαζί με την διήθηση που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό στερεών και υγρών.
- Χρησιμοποιείται ευρέως στις διαδικασίες καθαρισμού των ενζύμων.



Σχ.7. Σχηματική παράσταση φυγοκεντρικών διαχωριστήρων συνεχούς ροής.

Στάδιο χαμηλού καθαρισμού

- Στην περίπτωση που το ένζυμο είναι εξωκυτταρικό, μετά την απομάκρυνση των στερεών με φυγοκέντρωση ή διήθηση, η υγρή φάση που περιέχει το ένζυμο προωθείται στο στάδιο του υψηλού καθαρισμού.
- Αν το ένζυμο είναι ενδοκυτταρικό, μετά τη διάρρηξη των κυττάρων και τον διαχωρισμό των στερεών, ακολουθεί προεργασία (χονδροειδής καθαρισμός) πριν το στάδιο του υψηλού καθαρισμού.
- Το στάδιο του χαμηλού καθαρισμού στοχεύει στην απομάκρυνση των νουκλεϊκών οξέων και μέρος των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών.

Απομάκρυνση νουκλεϊκών οξέων

- Τα νουκλεϊκά οξέα, λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους και του ιδιόμορφου σχήματος, προκαλούν αύξηση του ιξώδους, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνουν την επεξεργασία του υλικού.
- Η απομάκρυνσή τους στηρίζεται κυρίως στην κατακρίμνηση (ακολουθεί συνήθως φυγοκέντρωση).
- Οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας σύμπλοκα με αντίθετα φορτισμένες ομάδες κατάλληλων χημικών ουσιών και καταβυθίζονται.
- Συνήθως, χρησιμοποιούνται πολυαιθυλενιμίδιο, βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο, θειική στρεπτομυκίνη, κλπ.
- Το ίζημα περιέχει κυρίως νουκλεϊκά οξέα και εγκλωβισμένες πρωτεΐνες.

Απομάκρυνση πρωτεϊνών

- Στη φάση αυτή αφαιρείται μέρος μόνο των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών.
- Στο διάλυμα παραμένει το ένζυμο που μας ενδιαφέρει και πρωτεΐνες που θα απομακρυνθούν στο στάδιο του υψηλού καθαρισμού.
- Οι κύριες τεχνικές κατακρήμνισης πρωτεϊνών είναι:

1. Κατακρήμνιση με άλατα.

- Σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμένων αλάτων συνεπάγεται ενυδάτωση των αντίστοιχων ιόντων και σταδιακή μείωση των ελεύθερων μορίων νερού.
- Τελικά απομακρύνονται και μόρια νερού από τις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών, οι οποίες σχηματίζονται από τις πλευρικές ομάδες διάφορων αμινοξέων, όπως Phe, Tyr, Leu, Ile, Met, και Val, στις οποίες υπάρχουν μόρια νερού.

- Οι υδρόφοβες περιοχές είναι πλέον ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν σχηματίζοντας σύμπλοκα και τελικά κατακρημνίζονται (salting out).
- Όσο περισσότερες υδρόφοβες περιοχές έχει μια πρωτεΐνη, τόσο το φαινόμενο της κατακρήμνισης είναι εντονότερο.
- Τα πιο αποτελεσματικά ανιόντα είναι τα φωσφορικά, θειικά, και κιτρικά και τα πιο αποτελεσματικά κατιόντα είναι του αμμωνίου, καλίου, και νατρίου.
- Μεταβολή του pH ενδεχομένως να οδηγήσει σε εξάλειψη φορτίων, ελάττωση της πολικότητας της επιφάνειας της πρωτεΐνης και μεταβολή της διαλυτότητας του μορίου.
- Γι' αυτό, ευκολότερη κατακρήμνιση επιτυγχάνεται πλησίον του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης, όπου το συνολικό φορτίο του μορίου τείνει στο μηδέν.
- Αύξηση της θερμοκρασίας γενικά οδηγεί σε αύξηση των αλληλοεπιδράσεων μεταξύ των υδρόφοβων περιοχών, ευκολότερο σχηματισμό συμπλόκων, και μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης.

2. Κατακρήμιση με οργανικούς διαλύτες.

- Η προσθήκη ορισμένων οργανικών διαλυτών (αιθανόλης, ακετόνης, κλπ) σε υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα ελαττώνει τη διηλεκτρική σταθερά και το βαθμό ενυδάτωσης των πρωτεϊνών.
- Έτσι, αναπτύσσονται ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων πρωτεϊνικών μορίων, με αποτέλεσμα την κατακρήμισή τους.
- Αντιθέτως, τα μόρια νερού που βρίσκονται στις υδρόφοβες περιοχές του πρωτεϊνικού μορίου αντικαθίστανται από τα μόρια του οργανικού διαλύτη, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαλυτότητά τους.
- Τα δύο αυτά φαινόμενα ανταγωνίζονται μεταξύ τους.
- Πιστεύεται, όμως, ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις δεν διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην κατακρήμιση (πιο σημαντικές θεωρούνται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις).
- Στο ισοηλεκτρικό σημείο η κατακρήμιση των πρωτεϊνών παρουσία του κατάλληλου οργανικού διαλύτη είναι αποτελεσματικότερη.

3. Κατανομή σε υδατικά διφασικά συστήματα.

- Αν προστεθεί κατάλληλη ποσότητα άλατος (π.χ. φωσφορικό κάλιο) σε διάλυμα κατάλληλης συγκέντρωσης πολυαιθυλενο-γλυκόλης (PEG), ακολουθήσει ανάμιξη και το σύστημα αφεθεί σε ηρεμία, θα σχηματιστούν δύο φάσεις:

A. Η άνω φάση πλούσια σε PEG, και

B. Η κάτω φάση πλούσια σε άλας.

- Η κατανομή πρωτεϊνών μεταξύ των δύο φάσεων περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής K_p :

$$K_p = C_t / C_b$$

- όπου:

C_t : συγκέντρωση πρωτεΐνης στην άνω φάση (PEG)

C_b : συγκέντρωση πρωτεΐνης στην κάτω φάση.

- Προφανώς, αν $K_p=1$, τότε η κατανομή στις δυο φάσεις είναι 1:1, ενώ αν $K_p=1000$, τότε η πρωτεΐνη βρίσκεται στην άνω φάση σε συγκέντρωση 1000 φορές μεγαλύτερη από την κάτω φάση.
- Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η κλασμάτωση και ο μερικός διαχωρισμός των ενζύμων.
- Οι υδρόφιλες ή φορτισμένες πρωτεΐνες τείνουν να κατανεμηθούν στη φάση του άλατος, ενώ οι υδρόφοβες στη φάση της PEG.
- Διφασικά συστήματα σχηματίζονται και μεταξύ PEG και παραγώγων αμύλου ή κυτταρίνης ή δεξτρανών (η PEG βρίσκεται πάντα στην πάνω φάση).
- Πρωτεΐνες μεγάλου MB είναι πιο ευαίσθητες στο φαινόμενο αυτό.

- Αν κατά την ανάμιξη των συστατικών του διφασικού συστήματος προστεθεί και το υλικό που προκύπτει από την διάρρηξη των κυττάρων ή των ιστών, τότε σχηματίζεται μια επιπλέον φάση μεταξύ των δύο προηγούμενα αναφερθέντων φάσεων.
- Η ενδιάμεση φάση περιέχει τα κύτταρα, μεμβράνες, θραύσματα, κλπ, ενώ οι διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες κατανέμονται μεταξύ των δύο αρχικών φάσεων.

4. Θερμική επεξεργασία.

- Προϋπόθεση εφαρμογής είναι η καταλυτική σταθερότητα του ενζύμου που μας ενδιαφέρει έναντι της θερμοκρασίας.
- Στην περίπτωση αυτή, οι υπόλοιπες πρωτεΐνες μετουσιώνονται, κατακρημνίζονται, και απομακρύνονται.

Στάδιο υψηλού καθαρισμού

- Το ένζυμο βρίσκεται τώρα στην κατάλληλη μορφή διαλύματος για το επόμενο στάδιο υψηλού καθαρισμού.
- Σε αυτή τη φάση το ενζυμικό διάλυμα:
 1. Δεν περιέχει αδιάλυτα συστατικά,
 2. Έχει χαμηλό ιξώδες,
 3. Έχει κατάλληλα ρυθμισμένους διάφορους παράγοντες, όπως pH, ιοντική ισχύ, θερμοκρασία, μεταλοϊόντα, και σταθεροποιητές ενζυμικής δραστηριότητας.
- Το στάδιο υψηλού καθαρισμού βασίζεται κυρίως σε τεχνικές χρωματογραφίας στήλης.

- Οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι συνήθως τρεις:
 1. Χρωματογραφία διαπερατότητας ή αποκλεισμού μεγέθους ή μοριακού ηθμού,
 2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, και
 3. Χρωματογραφία συγγένειας ή αγκιστείας.

Χρωματογραφία Διαπερατότητας

- Τα συστατικά του ενζυμικού διαλύματος διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους μέγεθος.
- Σε αυτό τον τύπο χρωματογραφίας το ένζυμο δεν αλληλεπιδρά με την πολυμερή δομή του χρωματογραφικού υλικού, αλλά κατανέμεται μεταξύ των δύο φάσεων.
- Ο όγκος και ο χρόνος έκλουσης εξαρτώνται από το μοριακό μέγεθος του ενζύμου.
- Βιομόρια μεγέθους μεγαλύτερου από τους πόρους του χρωματογραφικού υλικού αποκλείονται από το εσωτερικό των σφαιριδίων, κινούνται με την ταχύτητα του μετώπου του διαλύτη και εκλούνται γρήγορα.
- Αντίθετα, μόρια μικρότερου μεγέθους από τους πόρους του υλικού διαχέονται στο εσωτερικό των σφαιριδίων και καθυστερούν να κινηθούν μέσα στη στήλη.

- Τα ανωτέρω ισχύουν για μόρια διαφορετικού μοριακού μεγέθους ή μοριακού βάρους σφαιρικής μορφής.
- Ραβδοειδή και μετουσιωμένα μόρια, καθώς και πολλές γλυκοπρωτεΐνες εμφανίζουν ανώμαλη χρωματογραφική συμπεριφορά.
- Ο όγκος διαλύματος που φορτώνεται στη στήλη πρέπει να είναι μικρός (1-5% του συνολικού όγκου της στήλης) για την ελαχιστοποίηση φαινομένων διάχυσης, τα οποία οφείλονται σε μη ιδανική ροή και σε ατέλειες πλήρωσης του υλικού μέσα στη στήλη.
- Μόρια μεγάλου μεγέθους παραμένουν για λιγότερο χρόνο μέσα στη στήλη και συνεπώς υφίστανται σε μικρότερο βαθμό τα φαινόμενα διάχυσης.
- Συνεπώς εκκλούνται πρώτα και εμφανίζουν οξείες κορυφές.
- Αντιθέτως, μόρια μικρού μεγέθους εκκλούνται αργότερα και εμφανίζουν αμβλείες κορυφές.

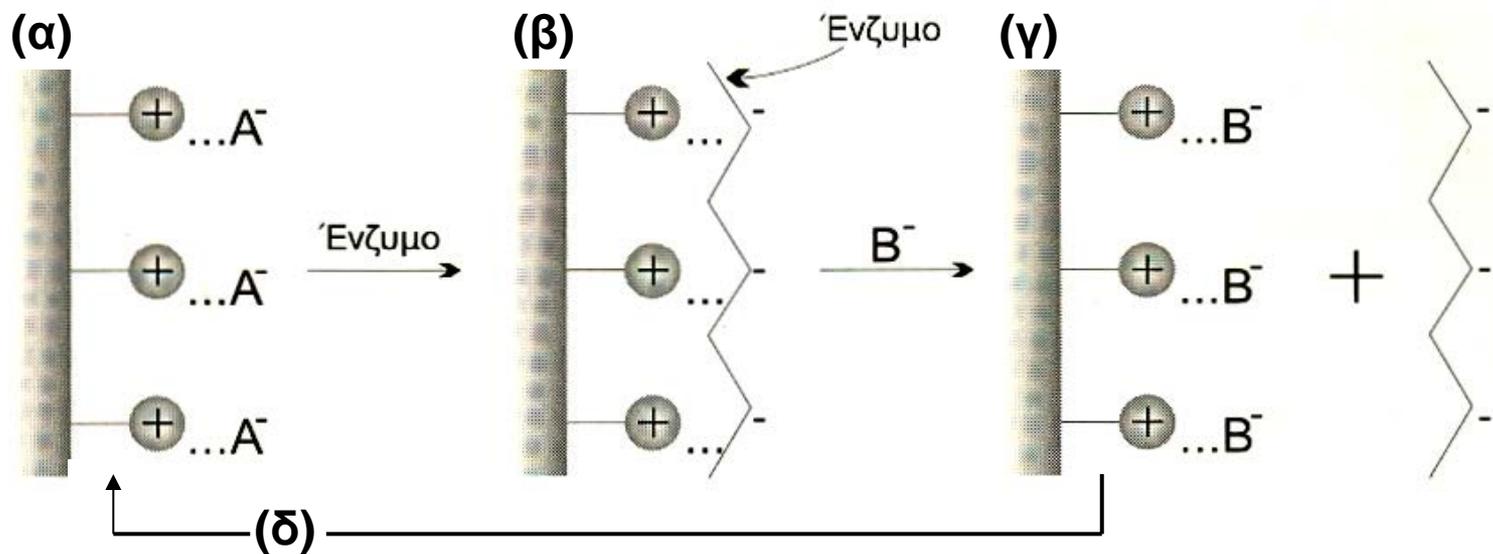
- Σημαντικό ρόλο παίζει και η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος (δεν πρέπει να ξεπερνά τα 30mg/mL).
- Επιπλέον, το μήκος της στήλης πρέπει να είναι 20-40 φορές μεγαλύτερο από τη διάμετρο.
- Τα ανωτέρω αποτελούν σημαντικό μειονέκτημα για βιομηχανική εφαρμογή της χρωματογραφίας διαπερατότητας, η εφαρμογή της οποίας περιορίζεται κυρίως σε εργαστηριακή κλίμακα.
- Σε παρασκευαστική κλίμακα καθαρισμού, η χρωματογραφία διαπερατότητας χρησιμοποιείται κυρίως για απομάκρυνση μικρομοριακών ουσιών (π.χ. αλάτων, μετάλλων, αναστολέων, συνενζύμων, κλπ) από το ενζυμικό διάλυμα, καθώς και για την ανταλλαγή της υγρής φάσης του ενζυμικού διαλύματος, αφού αυτή αποτελείται από συστατικά μικρού μοριακού μεγέθους.

Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

- Είναι η πιο συνηθισμένη χρωματογραφική τεχνική για καθαρισμό ενζύμων, ιδίως σε βιομηχανική κλίμακα.
- Το ενζυμικό μόριο δύναται να προσροφηθεί αντιστρεπτά σε κατάλληλο ιοντοανταλλάκτη, λόγω της αμφοτέρης φύσης του.
- Ειδικοί ιοντοανταλλάκτες εξασφαλίζουν τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας και δραστηριότητας του ενζύμου.
- Το αντίθετο συμβαίνει σε περιπτώσεις καθαρισμού νερού και διάφορων οργανικών ουσιών.
- Ανάλογα με το pH του διαλύματος, οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων του ενζύμου είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένες.
- Ο ιοντοανταλλάκτης, επίσης, φέρει φορτισμένες ομάδες, π.χ. καρβοξυλομάδες, τριτοταγείς αμινομάδες, κλπ.

- Κάθε τέτοια ομάδα εμφανίζεται εξουδετερωμένη, λόγω ηλεκτροστατικά δεσμευμένου ιόντος αντίθετου φορτίου (π.χ. Na^+ , Cl^-), γνωστό ως αντισταθμιστικό ιόν.
- Περιοχές του ενζύμου με αντίθετο φορτίο προς το φορτίο των ομάδων του ιοντοανταλλάκτη συναγωνίζονται με το αντισταθμιστικό ιόν, με αποτέλεσμα τη δέσμευση (προσρόφηση) του ενζύμου στον ιοντοανταλλάκτη.
- Τα μη προσροφημένα μόρια απομακρύνονται από τη στήλη με έκπλυση.
- Στη συνέχεια, το προσροφημένο ένζυμο εκλούεται, είτε αυξάνοντας την ιοντική ισχύ, οπότε και μειώνονται οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις, είτε με μεταβολή του pH, οπότε μεταβάλλεται το ηλεκτρικό φορτίο του ενζύμου.
- Είναι προφανές ότι το υλικό του ιοντοανταλλάκτη δεν τροποποιείται, απλά το αντισταθμιστικό ιόν υποκαθίσταται κάθε φορά από άλλο ιόν που εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για την αντίθετα φορτισμένη ομάδα του ιοντοανταλλάκτη.

- Ως γνωστόν, το συνολικό φορτίο του ενζύμου εξαρτάται από το pH του διαλύματος.
- Σε pH ίσο με το ισοηλεκτρικό σημείο pI , το συνολικό φορτίο του ενζυμικού μορίου είναι μηδέν.
- Σε $pH < pI$ το ένζυμο έχει συνολικά θετικό φορτίο, οπότε προσροφάται σε αρνητικά φορτισμένο κατιοντοανταλλάκτη.
- Σε $pH > pI$ το ένζυμο έχει συνολικά αρνητικό φορτίο, οπότε προσροφάται σε θετικά φορτισμένο ανιοντοανταλλάκτη.



Σχ.8. Αρχή λειτουργίας χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής. (α) αρχική κατάσταση υλικού ανιοντοανταλλαγής. Τα θετικά φορτία του ιοντοανταλλάκτη αντισταθμίζονται από αρνητικά ιόντα A^- της υγρής φάσης, (β) Προσρόφηση ενζύμου μέσω των αρνητικών του ομάδων, (γ) Έκλυση προσροφημένου ενζύμου λόγω παρουσίας ιόντων B^- της υγρής φάσης, (δ) Στάδιο αναγέννησης υλικού του ιοντοανταλλάκτη στην αρχική κατάσταση.

- Όταν $pH=pI$ οπότε το συνολικό φορτίο του ενζύμου είναι μηδέν, δεδομένου ότι η κατανομή φορτίων στο ενζυμικό μόριο δεν είναι ομοιόμορφη, θα υπάρχουν θετικά ή αρνητικά φορτισμένες ομάδες, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προβλεφθεί επακριβώς το pH στο οποίο δεν θα παρουσιάζεται αλληλεπίδραση ενζύμου-ιοντοανταλλάκτη.
- Οι ιοντοανταλλάκτες διακρίνονται σε ισχυρούς και ασθενείς, ανάλογα από το εύρος pH στο οποίο διατηρούν το φορτίο τους.

Πίνακας 3. Τα κυριότερα είδη ομάδων ιοντοανταλλακτών.

| Είδος | Όνομα ομάδας και συμβολισμός | Χημικός τύπος | pK |
|-------|------------------------------|---|---------|
| IK | (μεθυλο)σουλφονική (S) | $-OCH_2SO_3^-$ | 2 |
| IK | προπυλοσουλφονική (SP) | $-O(CH_2)_3SO_3^-$ | 2-2,5 |
| AK | μεθυλοκαρβοξυλική (CM) | $-OCH_2COO^-$ | 3,5-4 |
| AK | ορθοφωσφορική (P) | $-OPO_3H^-$ | 3 και 6 |
| IA | τεταρτοταγής αμίνη (Q) | $-OCH_2N^+(CH_3)_3$ | - |
| IA | τεταρτοταγής αμίνη (QAE) | $-O(CH_2)_2N^+(CH_2CH_3)_2CH_2CH(OH)CH_3$ | - |
| AA | δαιθυλοαιθυλαμίνη (DEAE) | $-OCH_2CH_2N^+(CH_2CH_3)_2H$ | 9-9,5 |

IK=ισχυρός κατιοντοανταλλάκτης, AK=ασθενής κατιοντοανταλλάκτης, IA=ισχυρός ανιοντοανταλλάκτης, AA=ασθενής ανιοντοανταλλάκτης.

- Ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος ιοντοανταλλάκτης είναι του είδους DEAE, με εύρος pH λειτουργίας 6-9.
- Γενικά, τα ένζυμα είναι σταθερότερα σε αλκαλικά pH (8-10), παρά σε όξινα (4-6).
- Οι ισχυροί ιοντοαντοανταλλάκτες, σε αντίθεση με τους ασθενείς, έχουν την τάση να αποδιατάσσουν το ενζυμικό μόριο, διατηρώντας, όμως, την χωρητικότητά τους ακόμα και σε περιβάλλοντα αυξημένης ιοντικής ισχύος, γεγονός με ιδιαίτερη πρακτική σημασία για ένζυμα ασταθή σε περιβάλλοντα χαμηλής ιοντικής ισχύος.
- Ως **χωρητικότητα (capacity) ιοντοανταλλάκτη** ορίζεται η μέγιστη ποσότητα ενζύμου ή άλλης ουσίας η οποία δεσμεύεται ανά μονάδα βάρους προσροφητή σε ορισμένες συνθήκες.
- Εκφράζεται σε mg φορτισμένων ομάδων/mL προσροφητή ή σε g πρωτεΐνης/mL προσροφητή.

- Ο προσδιορισμός της επιτυγχάνεται φορτώνοντας την στήλη συνεχώς με ενζυμικό διάλυμα έως ότου οι ελεύθερες φορτισμένες ομάδες του προσροφητή μειωθούν σε τέτοιο βαθμό, ώστε το ένζυμο να διέρχεται πλέον αδέσμευτο από τη στήλη.
- Γενικά, το pH του μικροπεριβάλλοντος του ιοντοανταλλάκτη διαφέρει από το pH της κύριας υγρής φάσης, λόγω απώθησης ή έλξης πρωτονίων από τις φορτισμένες ομάδες του προσροφητή (φαινόμενο *Donnan*).
- Έτσι, το pH του μικροπεριβάλλοντος ενδέχεται να είναι έως και μία μονάδα υψηλότερο από εκείνο της κύριας υγρής φάσης στους ανιοντοανταλλάκτες, λόγω απωστικών δυνάμεων πρωτονίων και θετικά φορτισμένων ομάδων του προσροφητή.
- Ανάλογα, το pH του μικροπεριβάλλοντος ενδέχεται να είναι έως και μία μονάδα χαμηλότερο από εκείνο της κύριας υγρής φάσης στους κατιοντοανταλλάκτες, λόγω αντίστοιχων ελκτικών δυνάμεων.

- Όσο αυξάνεται η ιοντική ισχύς της υγρής φάσης, τόσο το φαινόμενο *Donnan* εξασθενεί, και αντίστροφα.
- Το φαινόμενο *Donnan* έχει μεγάλη σημασία για ευαίσθητα στο pH ένζυμα, π.χ. αν κάποιο ένζυμο είναι σταθερό σε pH: 5.5, αλλά αδρανοποιείται μη αντιστρεπτά σε pH: 4.5, τότε πιθανόν να έχουμε αδρανοποίησή του εάν χρησιμοποιηθεί κατιοντοανταλλάκτης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH: 5.5.
- Η φόρτωση του ενζύμου πραγματοποιείται υπό κατάλληλα επιλεγμένες συνθήκες ιοντικής ισχύος και pH.
- Η ιοντική ισχύς είναι συνήθως χαμηλή (10-100mM ρυθμιστικού διαλύματος).
- Συνήθως, χρησιμοποιείται η υψηλότερη ιοντική ισχύς στην οποία προσροφάται το ένζυμο και αποτρέπεται ή περιορίζεται η προσρόφηση άλλων πρωτεϊνών.

- Στη συνέχεια, απομακρύνονται από τη στήλη όλες οι μη προσροφημένες ουσίες με έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φορτώσεως.
- Εκτός από το ένζυμο-στόχο, στη στήλη δεσμεύονται και άλλα ανεπιθύμητα μόρια, τα οποία διαχωρίζονται στο επόμενο στάδιο της έκλουσης.
- Η έκλουση επιτελείται είτε με συνεχή διαβάθμιση, είτε με σταδιακή διαβάθμιση της υγρής φάσης της στήλης.
- Ο όρος διαβάθμιση αναφέρεται στη μεταβολή της σύστασης της υγρής φάσης ως προς το pH, την ιοντική ισχύ ή κάποιας άλλης ουσίας που βοηθά στην έκλουση του ενζύμου.
- Η συνεχής διαβάθμιση pH συνήθως αποφεύγεται, γιατί επιτυγχάνεται δύσκολα, λόγω της ισχυρής ρυθμιστικής ικανότητας που παρουσιάζουν οι ιοντοανταλλάκτες, οπότε το pH επί της στήλης διαφέρει από αυτό που εφαρμόζεται εξωτερικά.
- Αντίθετα, χρησιμοποιείται ευρέως η σταδιακή διαβάθμιση pH, αφού το παραπάνω πρόβλημα αντιμετωπίζεται με μεγαλύτερη επιτυχία.

- Στις περισσότερες περιπτώσεις, όμως, προτιμάται η μεταβολή της ιοντικής ισχύος.
- Αύξηση της ιοντικής ισχύος συνεπάγεται μείωση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων που συγκρατούν προσροφημένα τα μόρια του ενζύμου.
- Η χρήση μεγάλου όγκου, ως προς τον συνολικό όγκο του υλικού της στήλης, ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης κατά τη συνεχή διαβάθμιση, είναι δυνατόν να οδηγήσει σε υποδεέστερο διαχωρισμό και σχηματισμό αμβλείων κορυφών.
- Στην πράξη, ένας καλός συνολικός όγκος συστήματος συνεχούς έκλουσης πρέπει να είναι μέχρι 5 φορές του συνολικού όγκου της στήλης.
- Η τεχνική της συνεχούς διαβάθμισης εφαρμόζεται μόνο σε εργαστηριακή κλίμακα.

- Σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιείται η τεχνική της σταδιακής διαβάθμισης.
- Η τεχνική της σταδιακής διαβάθμισης προβλέπει ασυνεχή, βήμα προς βήμα, μεταβολή της ιοντικής ισχύς της υγρής φάσης της στήλης.
- Σε κάθε βήμα ιοντικής ισχύς εκλούονται και διαφορετικές προσροφημένες πρωτεΐνες.
- Το βήμα της ιοντικής ισχύς που εκλούεται το ένζυμο που μας ενδιαφέρει έχει προηγουμένως προσδιορισθεί πειραματικά.
- Αρχικά, εφαρμόζεται στη στήλη ρυθμιστικό διάλυμα σταθερής ιοντικής ισχύς, οπότε εκλούονται οι ασθενέστερα του ενζύμου προσροφημένες ανεπιθύμητες πρωτεΐνες.
- Στη συνέχεια, σε νέο βήμα εφαρμόζεται ρυθμιστικό διάλυμα ισχυρότερης ρυθμιστικής ισχύος, μόλις ικανής να εκλούσει το ένζυμο.

- Τέλος, η στήλη απαλλάσσεται από τις λοιπές προσροφημένες ουσίες με εφαρμογή υψηλότερης συγκέντρωσης άλατος διαλύματος και ακολουθεί αναγέννηση του προσροφητή.
- Ικανοποιητικότερα αποτελέσματα καθαρισμού λαμβάνονται υπό συνθήκες στις οποίες το ένζυμο εκλούεται πρώτο.
- Ένας διαφορετικός τρόπος παραλαβής του προσροφημένου ενζύμου είναι η έκλυση **συγγένειας**.
- Κατά την έκλυση, προστίθεται στην υγρή φάση κατάλληλο μόριο-δεσμευτής (ligand), το οποίο αναγνωρίζει εκλεκτικά το προσροφημένο ένζυμο και σχηματίζει σύμπλοκο δεσμευτή-ενζύμου.

- Ο δεσμευτής έχει φορτίο αντίθετο από το συνολικό φορτίο του ενζύμου, οπότε το ένζυμο εμφανίζει μειωμένο συνολικό φορτίο, οδηγώντας σε μείωση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ ενζύμου-προσροφητή, υποβοηθώντας έτσι την έκλυση.
- Παράδειγμα αποτελεί η έκλυση από κατιοντοανταλλάκτη του ενζύμου αλδολάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης.
- Το ένζυμο είναι τετραμερές και σε κάθε υπομονάδα δεσμεύεται ένα μόριο 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης, η οποία έχει 4 αρνητικά φορτία, μειώνοντας το συνολικό φορτίο του τετραμερούς ενζύμου κατά 16 θετικά φορτία.

Χρωματογραφία συγγένειας

- Είναι η πιο αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού ενζύμων.
- Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στη **βιολογική συγγένεια** των ενζύμων, κατά την οποία αναγνωρίζουν και δεσμεύουν εκλεκτικά και αντιστρεπτά συγκεκριμένα **μόρια-δεσμευτές**.
- Συγκεκριμένο μόριο-δεσμευτής (ενζυμικό υπόστρωμα, αναστολέας, συνένζυμο, αντίσωμα, μέταλλο, κλπ) δεσμεύεται χημικά σε κατάλληλο στερεό υλικό (φορέας), οπότε λαμβάνεται ο **προσροφητής συγγένειας**.
- Σε πολλές περιπτώσεις, μεταξύ φορέα και δεσμευτή παρεμβάλλεται ένας βραχίονας.
- Λόγω της συγγένειας και της εκλεκτικής αλληλοαναγνώρισης μεταξύ του ακινητοποιημένου δεσμευτή και του ενζύμου-στόχου, σχηματίζεται σύμπλοκο μέσα στη στήλη.

- Μόρια που δεν εμφανίζουν συγγένεια περνούν αδέσμευτα από τη στήλη.
- Η στήλη εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν τα αδέσμευτα μόρια και στη συνέχεια το προσροφημένο ένζυμο εκλούεται λόγω μεταβολής της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος.
- Οι ιδιότητες του φορέα έχουν καθοριστική σημασία για τη δυνατότητα βιομηχανικής εφαρμογής της τεχνικής.
- Ο **φορέας** πρέπει να εκπληρεί τις παρακάτω **προϋποθέσεις**:
 1. Να αποτελείται από μικροσφαιρίδια, ώστε η στήλη να παρουσιάζει καλή χρωματογραφική συμπεριφορά,
 2. Να είναι υδρόφιλος για να μην αναπτύσσονται μη εκλεκτικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και για να είναι συμβατός με υδατικές φάσεις,
 3. Να μην φέρει φορτισμένες ομάδες, οι οποίες πιθανόν να δημιουργήσουν μη εκλεκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις τύπου χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής,

4. Τα σφαιρίδα να είναι μεγαλοπορώδη ώστε:

(α) τα προς καθαρισμό μόρια του ενζύμου να μπορούν να εισχωρούν ελεύθερα στο εσωτερικό του φορέα, χωρίς να υφίστανται περιορισμούς μεγέθους τύπου χρωματογραφίας διαπερατότητας, και

(β) να αλληλεπιδρούν με όσο το δυνατόν περισσότερα μόρια ακινητοποιημένου δεσμευτή,

5. Να φέρει ελεύθερες υδροξυλομάδες (κατά προτίμηση πρωτοταγείς) στις οποίες θα μπορεί να ακινητοποιηθεί ο δεσμευτής,

6. Να παρουσιάζει χημική σταθερότητα σε ποικιλία συνθηκών ακινητοποιήσεως του δεσμευτή, αποστείρωσεως σε ακραίες τιμές pH και αναγεννήσεως με μετουσιωτικούς παράγοντες,

7. Να παρουσιάζει μηχανική σταθερότητα στις αυξημένες πιέσεις που συνήθως αναπτύσσονται σε στήλες μεγάλης κλίμακας, αλλά και σε υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. 120°C) που εφαρμόζονται κατά την αποστείρωση,

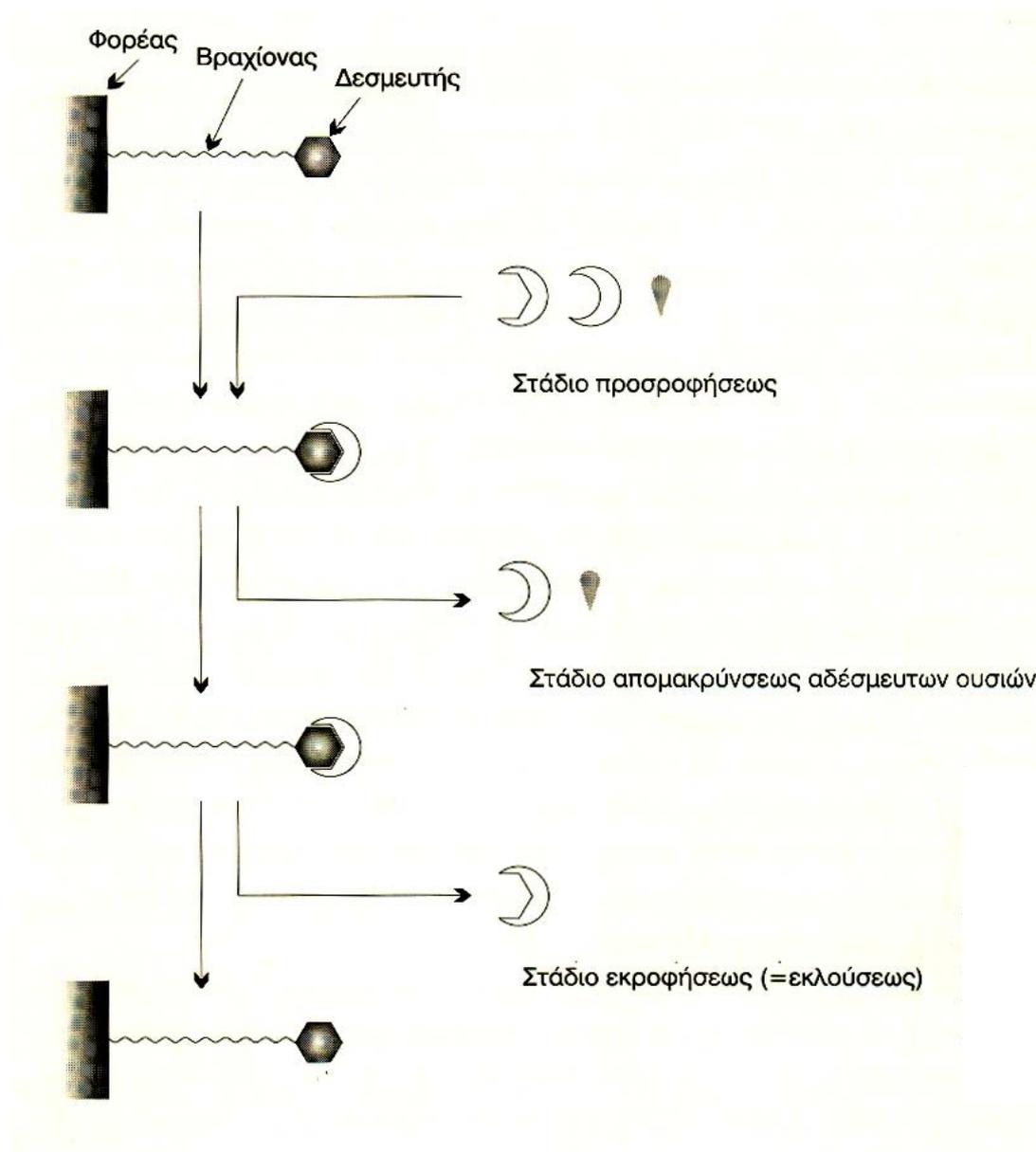
8. Να παρουσιάζει βιολογική σταθερότητα και να μην ενθαρρύνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών, και

9. Να είναι χαμηλού κόστους, ώστε να επιτρέπει τη βιομηχανική εφαρμογή της τεχνικής και να παρουσιάζει υψηλό λόγο χρόνου ζωής/κόστους αγοράς.

• Τα **μόρια-δεσμευτές** διακρίνονται:

A. Στα **υψηλής συγγένειας** και **εκλεκτικότητας**, τα οποία αναγνωρίζουν και δεσμεύουν ένα και μόνο ένζυμο, και

B. Στα **γενικής συγγένειας** ή **συγγένειας ομάδας**, τα οποία αναγνωρίζουν περισσότερα του ενός βιομόρια, συνήθως, με διαφορετικό βαθμό εκλεκτικότητας.



Σχ.9. Αρχή και στάδια λειτουργίας χρωματογραφίας συγγένειας.

Παραδείγματα υψηλής συγγένειας μορίων-δεσμευτών

1. Σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου, όπου το ρόλο του αντιγόνου παίζει το ένζυμο.

- Ο δεσμευτής-αντίσωμα ακινητοποιείται στον φορέα και χρησιμοποιείται ως προσροφητής συγγένειας.

2. DNA εκλεκτικής αλληλουχίας που αναγνωρίζει και δεσμεύει μόνο την αντίστοιχη περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία είναι εκλεκτική μόνο έναντι της συγκεκριμένης αλληλουχίας.

Παραδείγματα γενικής συγγένειας μορίων-δεσμευτών

1. Πολλαπλές εκλεκτικές αλληλουχίες DNA, που δεσμεύουν περισσότερα του ενός περιοριστικά ένζυμα, συνήθως, με διαφορετικό βαθμό εκλεκτικότητας.

2. Συνθετικές τριαζινοχρωστικές. Βρίσκουν μεγάλη βιομηχανική εφαρμογή επειδή:

A. Έχουν χαμηλό κόστος,

B. Διατίθενται σε μεγάλη ποσότητα,

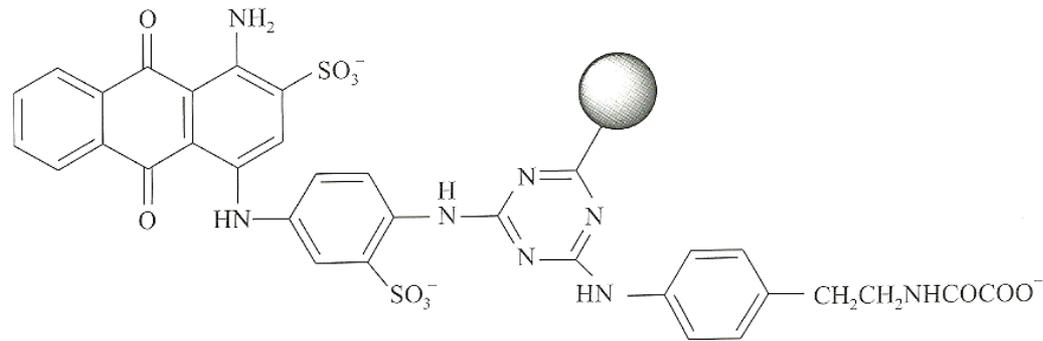
Γ. Παρουσιάζουν χημική και βιολογική σταθερότητα,

Δ. Ακίνητοποιούνται εύκολα, και

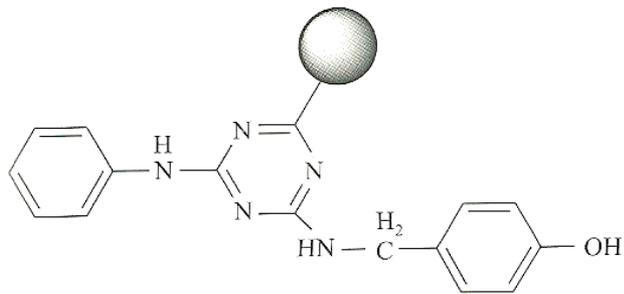
Ε. Οι παραγόμενοι προσροφητές παρουσιάζουν μεγάλη χωρητικότητα δέσμευσης πρωτεΐνης.

- Κατάλληλη τροποποίηση ορισμένων χρωστικών οδηγεί σε υψηλότερης συγγένειας μόρια-δεσμευτές (βιομιμητικές χρωστικές).

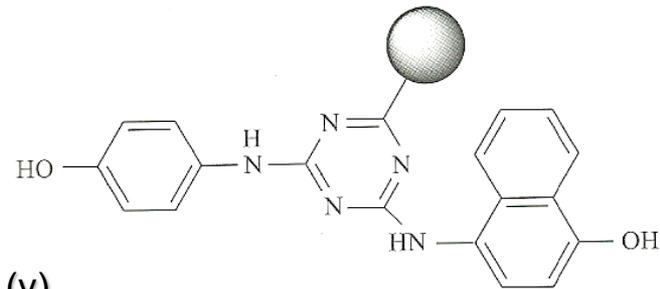
3. Μεταλλοχηλικά σύμπλοκα. Το μεταλλοκατιόν δεσμεύεται στον φορέα και στη συνέχεια το ένζυμο δεσμεύεται στο μέταλλο μέσω σχηματισμού χηλικών συμπλόκων.



(α)



(β)



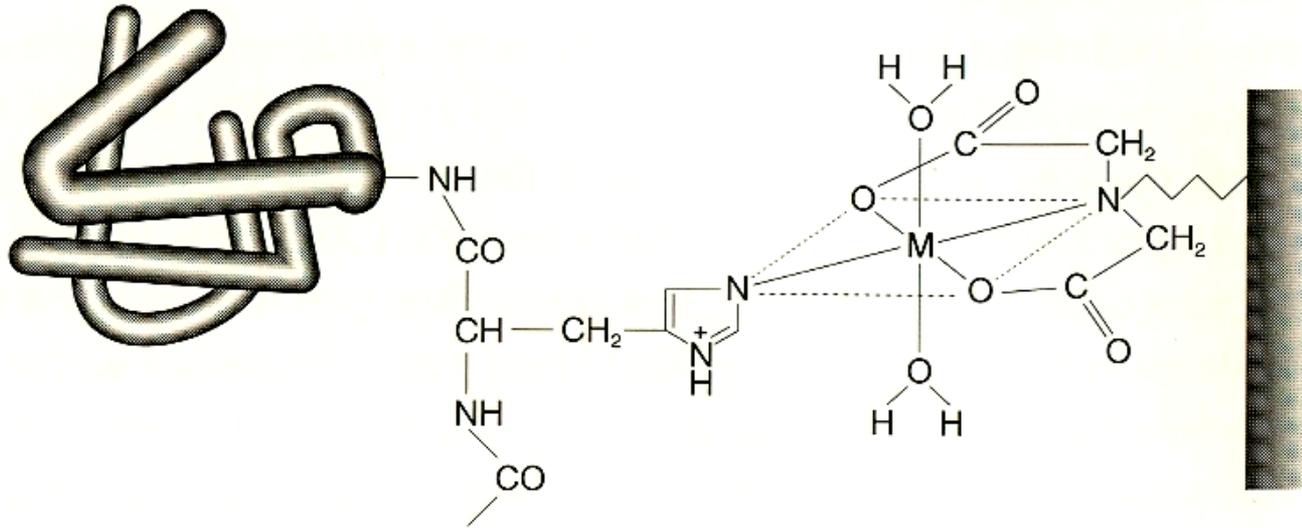
(γ)

Σχ.10. Βιομημικοί δεσμευτές.

(α) Ανθρακινονο-διαμινοβενζοσουλφο-
τριαζινο-αμινοβενζοαιθυλοξαμικό οξύ.

(β) Ανιλινο-τυραμινο-τριαξίνη.

(γ) Αμινοφαινολο-αμινονοναφθολο-
τριαξίνη.

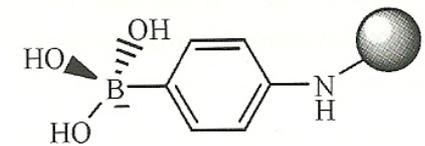


Σχ.11. Μεταλλοχηλικά σύμπλοκα ως δεσμευτές συγγενείας. Το μεταλλοκατιόν M αλληλεπιδρά με την ιστοιδίνη του ενζύμου.

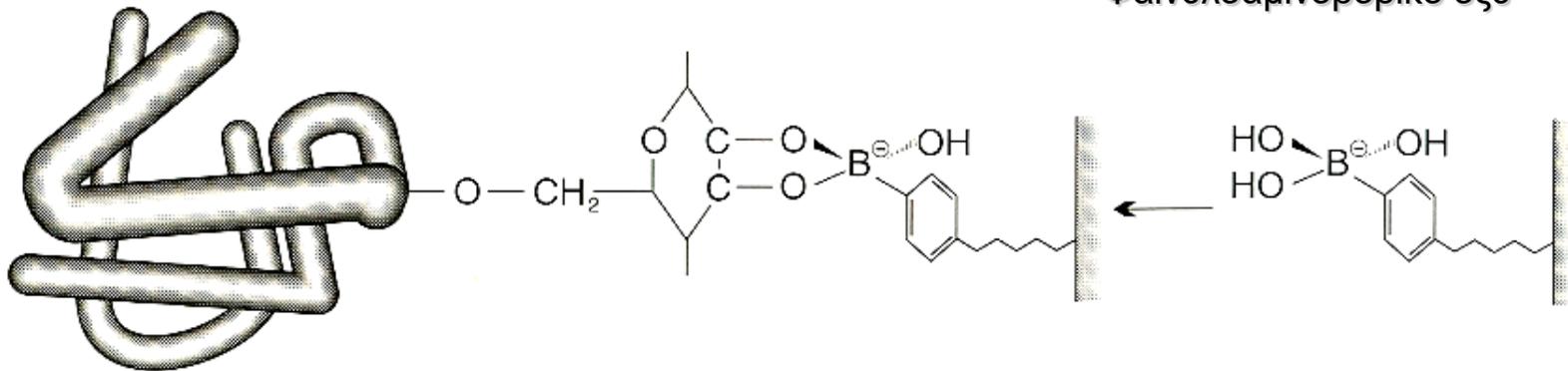
4. Λεκτίνες (γλυκοπρωτεΐνες) και το φαινυλοαμινοβορικό οξύ που αναγνωρίζουν εκλεκτικά πολυσακχαριτικές περιοχές διάφορων πρωτεϊνών.

- Χαρακτηριστικό των λεκτινών είναι ότι αλληλεπιδρούν εκλεκτικά με σάκχαρα δεσμεύοντας γλυκοένζυμα, π.χ. η κονκαναβαλίνη Α αναγνωρίζει ελεύθερα υδροξύλια θέσεων C-3, C-4, και C-5 α-D-μαννοπυρανόζης και α-D-γλυκοπυρανόζης.

- Το φαινυλοαμινοβορικό οξύ αλληλεπιδρά με γειτονικά υδροξύλια *cis*-διόλης (πολυ)σακχαρικών περιοχών γλυκοπρωτεϊνών, γλυκοενζύμων, συνενζύμων, και νουκλεοτιδίων.
- Η όλη διεργασία πρέπει να λαμβάνει χώρα σε αλκαλικό pH, ώστε το φαινυλοαμινοβορικό οξύ να βρίσκεται στη λειτουργική ανιοντική του μορφή.



Φαινυλοαμινοβορικό οξύ



Σχ.12. Φαινυλοαμινοβορικό οξύ ως δεσμευτής συγγένειας.

- Οι παράγοντες που έχουν σημασία και πρέπει να ρυθμίζονται πριν από την προσρόφηση του ενζύμου από το βιολογικό υλικό είναι:

1. Η συγκέντρωση του ακινητοποιημένου δεσμευτή στον φορέα,

2. Η ιοντική ισχύς,

3. Το pH,

4. Η θερμοκρασία, και

5. Η παρουσία μεταλλοιδίων.

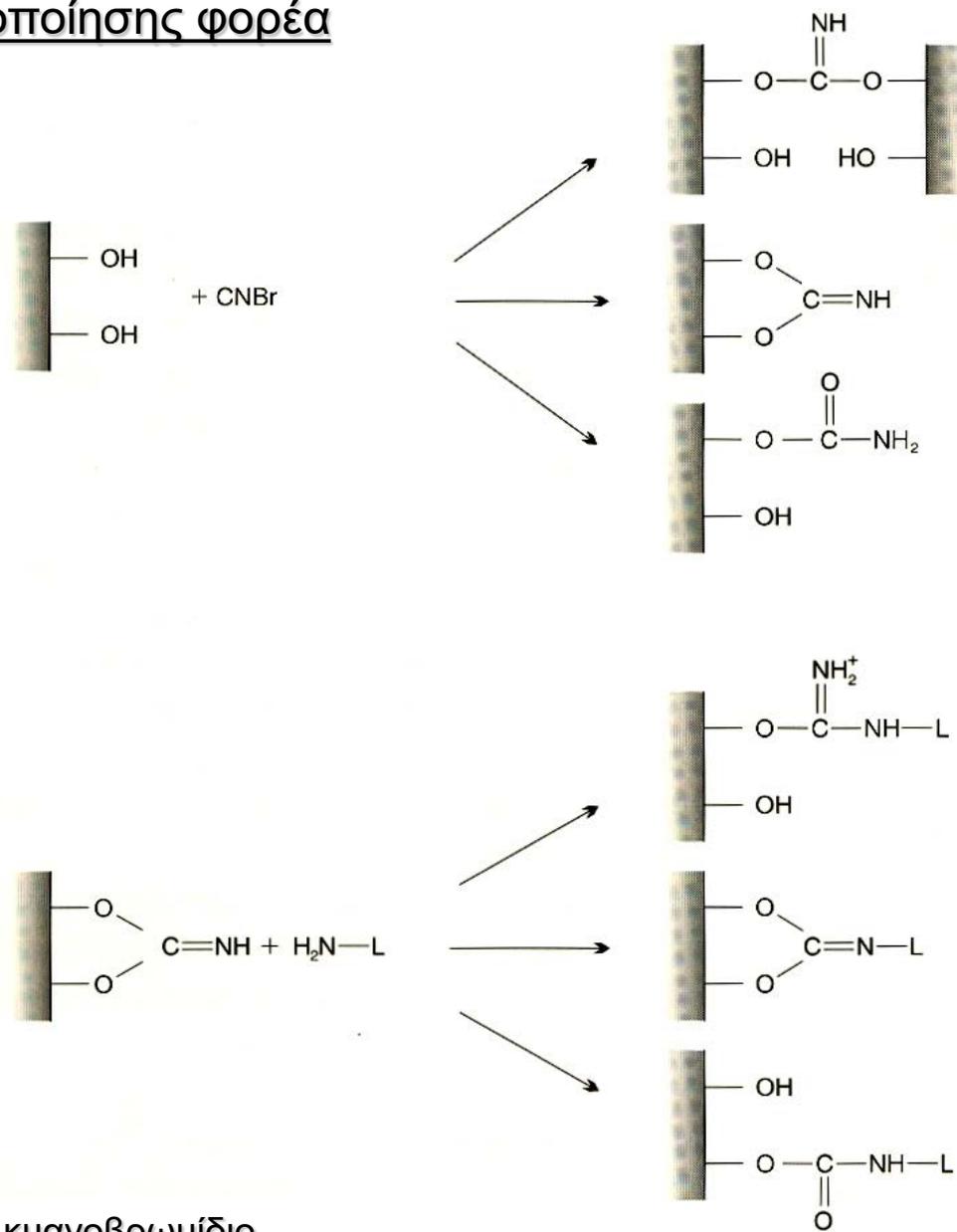
- Οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζονται έτσι ώστε να προσροφάται η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα ενζύμου, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιείται η δέσμευση των ανεπιθύμητων ουσιών.

- Σημαντικό ρόλο παίζει και η χωρητικότητα του προσροφητή, η οποία εξαρτάται και επηρεάζεται από τους παραπάνω πειραματικούς παράγοντες.

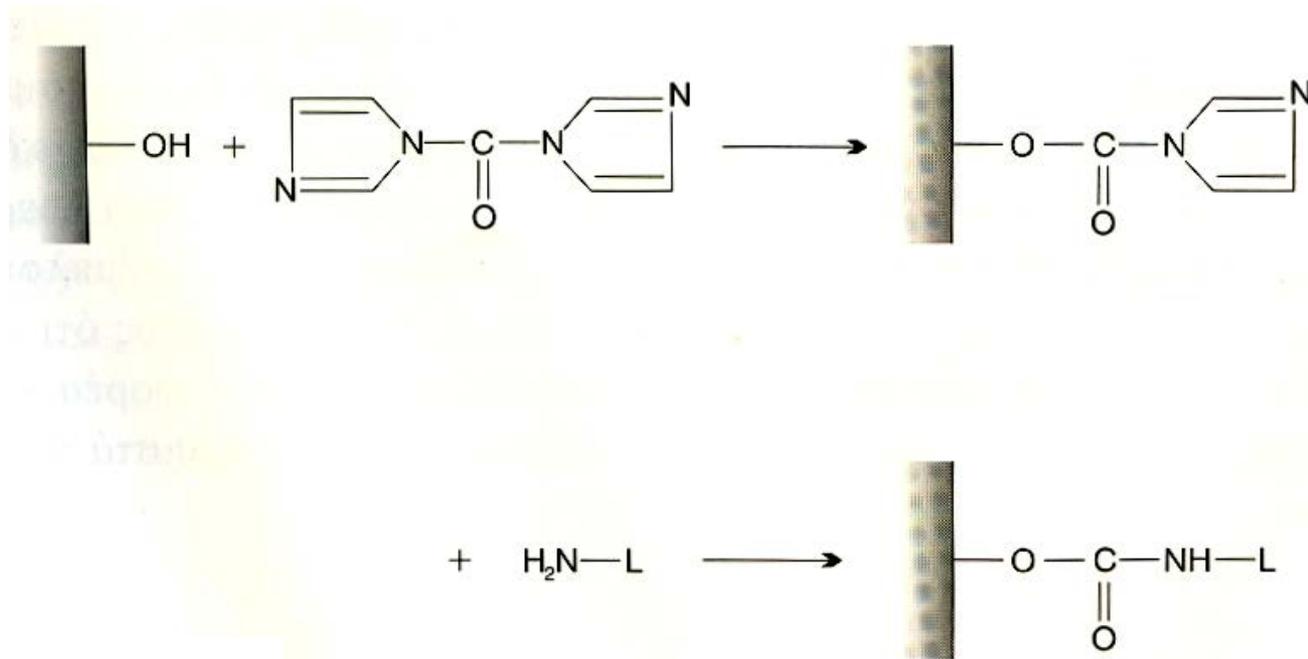
- Πρέπει, επίσης, να λαμβάνεται υπ' όψιν και το ισοηλεκτρικό σημείο του ενζύμου, η εξάρτηση του ενζύμου από μεταλλοϊόντα ή άλλα μόρια που οδηγούν στον σχηματισμό συμπλόκου, και ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ενζύμου-προσροφητή.
- Συχνά, πριν την έκλυση του ενζύμου, η στήλη εκπλένεται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν πολλές συμπροσροφημένες ουσίες, οι οποίες ενδεχομένως να συνεκλούονταν αργότερα με το ένζυμο.
- Η έκλυση του ενζύμου πραγματοποιείται:
 1. Μη εκλεκτικά, συνήθως με μεταβολή της ιοντικής ισχύς ή/και του pH, ή
 2. Εκλεκτικά, χρησιμοποιώντας μόρια (υποστρώματα, αναστολείς, συνένζυμα, ενώσεις που αλληλεπιδρούν με μεταλλοϊόντα, κλπ) που αλληλεπιδρούν εκλεκτικά με το προσροφημένο ένζυμο κατά τρόπο ανάλογο και συχνά συναγωνιστικό του δεσμευτή.

- Οι μη εκλεκτικές μέθοδοι είναι οικονομικότερες, αλλά το ένζυμο είναι μικρότερης καθαρότητας λόγω συνεκλούσεως και άλλων συμπροσροφημένων ουσιών.
- Οι μη εκλεκτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται σε συστήματα υψηλής συγγένειας.
- Αντίθετα, οι εκλεκτικές μέθοδοι παρέχουν καθαρότερο προϊόν και προτιμώνται σε συστήματα γενικής συγγένειας.
- Η δέσμευση του δεσμευτή στον φορέα, συνήθως, γίνεται μέσω προηγούμενης ενεργοποίησής του με κατάλληλα αντιδραστήρια.

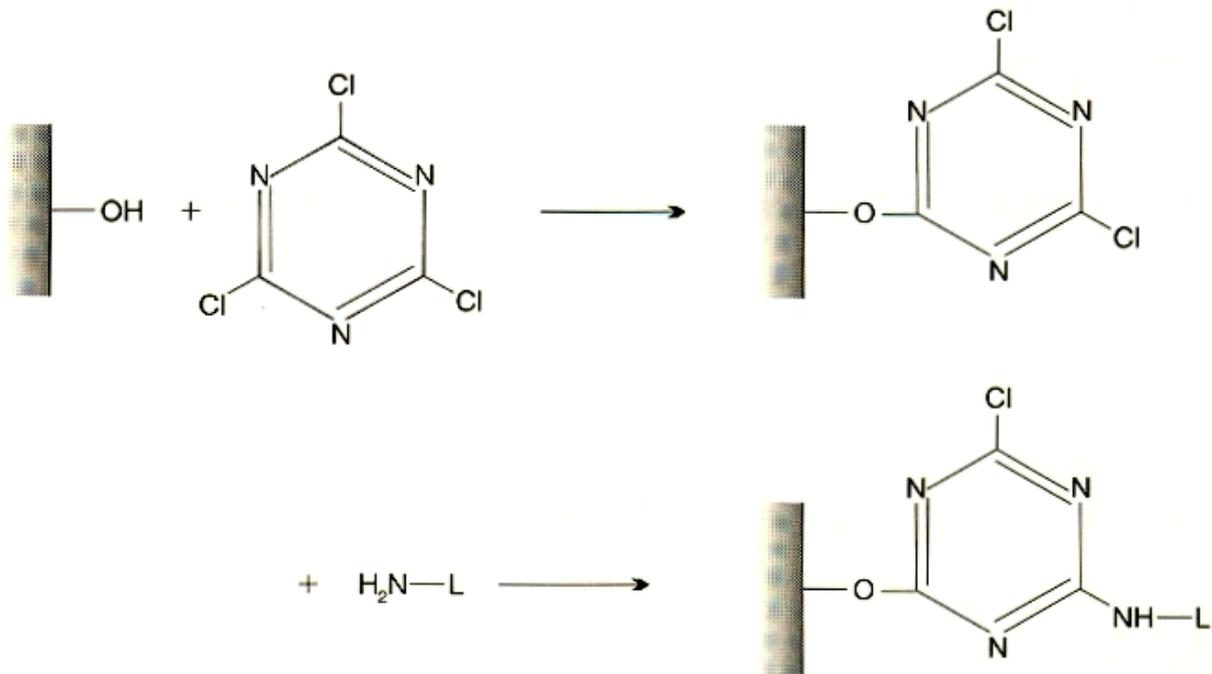
Παραδείγματα ενεργοποίησης φορέα



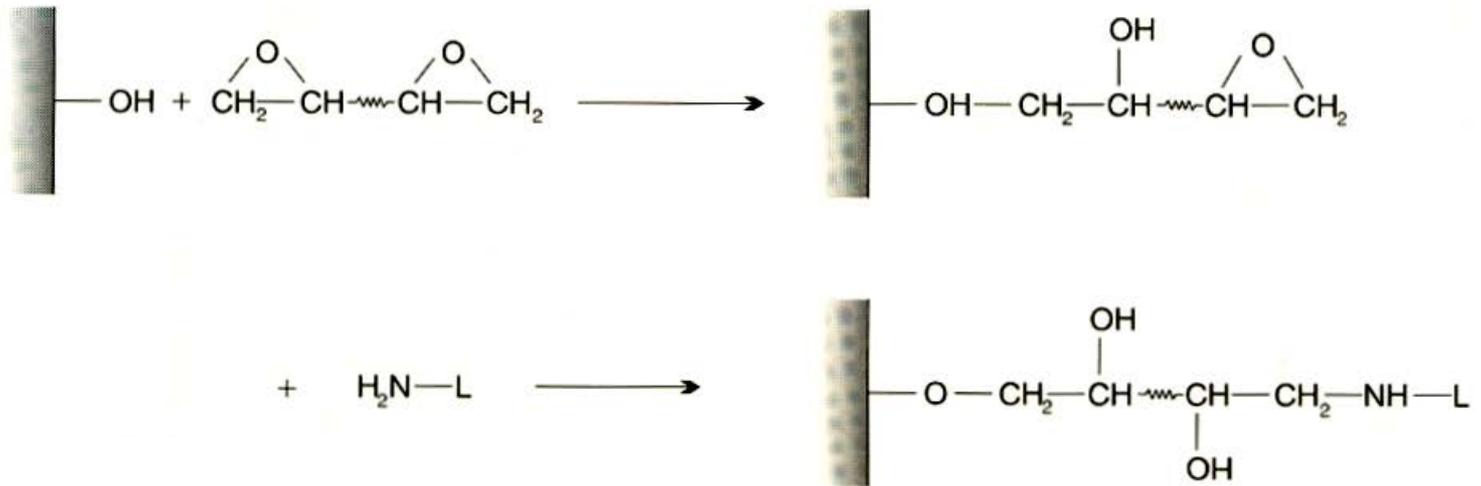
Σχ.13. Ενεργοποίηση με κυανοβρωμίδιο.



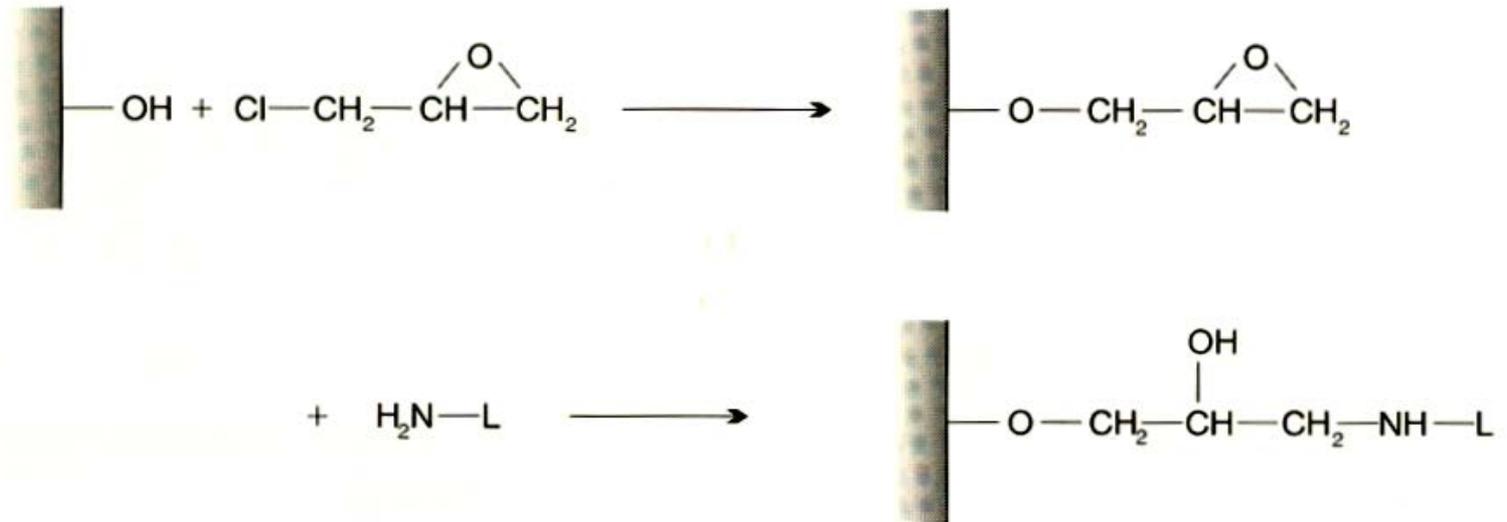
Σχ.14. Ενεργοποίηση με 1,1'-καρβονυλοδιιμιδαζόλιο.



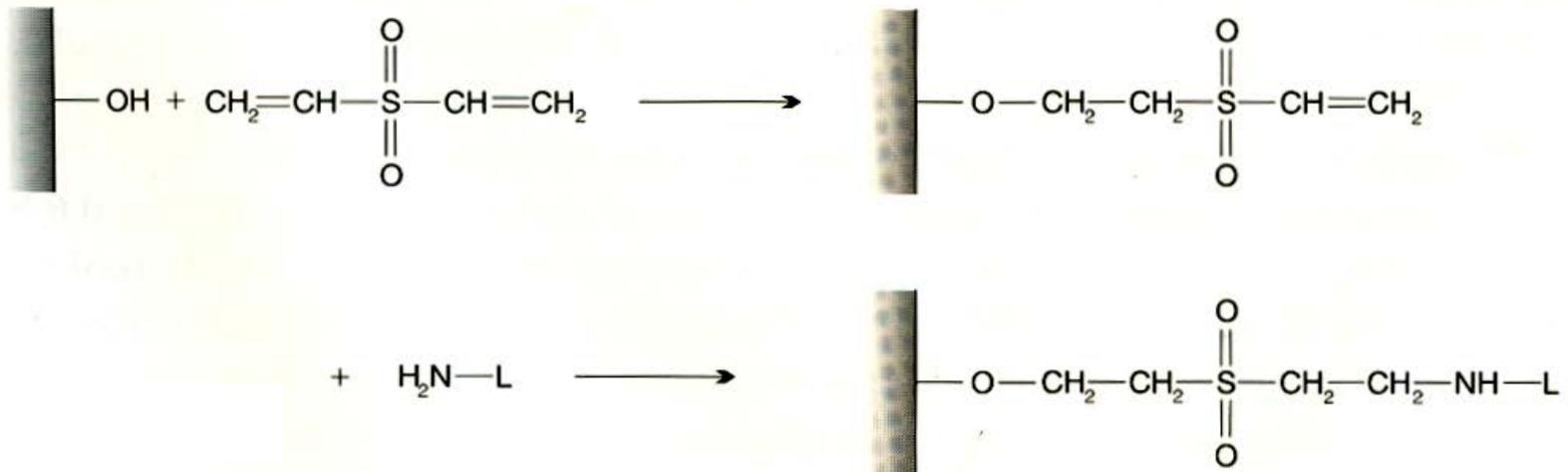
Σχ.15. Ενεργοποίηση με κυανουρικό οξύ.



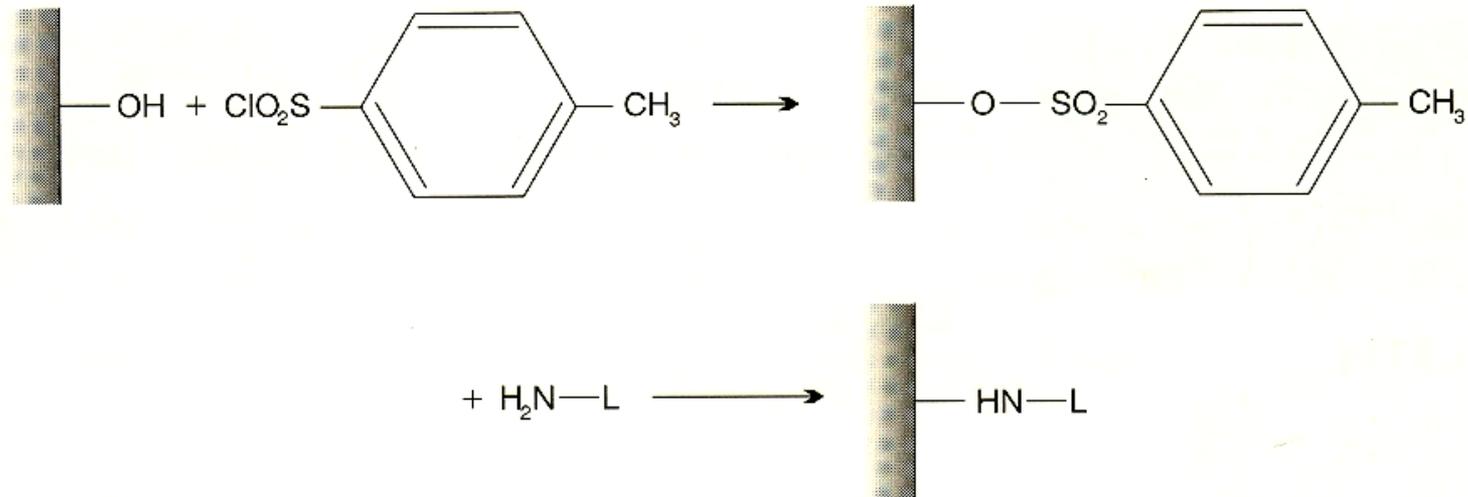
Σχ.16. Ενεργοποίηση με δις-εποξιράνιο.



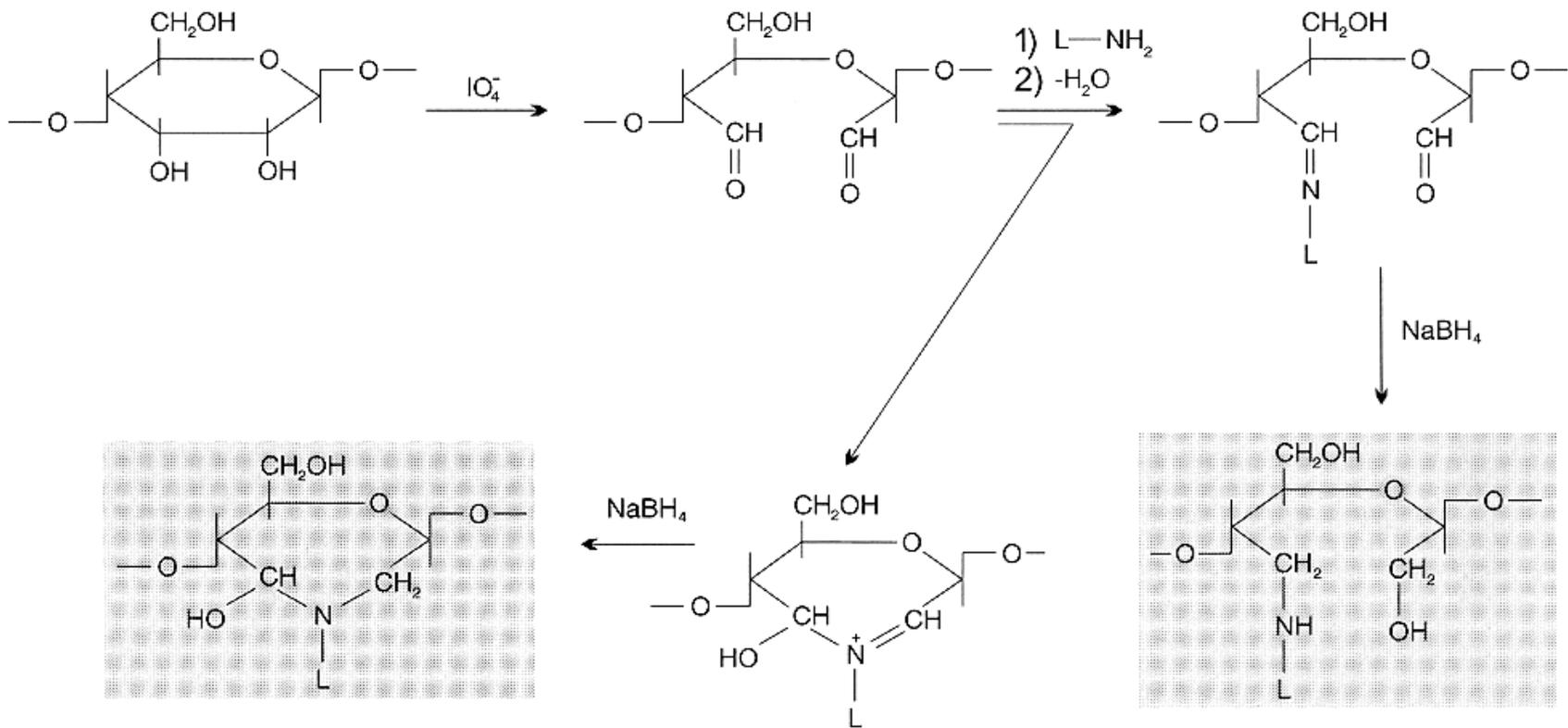
Σχ.17. Ενεργοποίηση με χλωροεποξυ-πυροπάνιο.



Σχ.18. Ενεργοποίηση με διβινυλο-σουλφόνη.



Σχ.19. Ενεργοποίηση με χλωροσουλφονεστέρες.



Σχ.20. Ενεργοποίηση με υπεριοδικό νάτριο.

Κλιμάκωση υγρής χρωματογραφίας στήλης

- Η παραγωγικότητα χρωματογραφίας στήλης εξαρτάται από τη χωρητικότητα σε ένζυμο και αποτελεί σημαντικό οικονομικό μέγεθος.
- Μεγαλύτερη συνολική επιφάνεια χρωματογραφικού υλικού (δηλ. μικρότερη διάμετρο σφαιριδίων) οδηγεί σε μεγαλύτερη χωρητικότητα και συνήθως σε μεγαλύτερη παραγωγικότητα.
- Η αύξηση της ροής οδηγεί επίσης σε αύξηση της παραγωγικότητας, η οποία βέβαια πρέπει να είναι τέτοια ώστε:
 - A. Να μην έχουμε αύξηση της πίεσης, και
 - B. Να παρέχεται ικανός χρόνος στο ένζυμο να διαχυθεί στο εσωτερικό των σφαιριδίων και να δεσμευθεί.
- Συνήθως, εφαρμόζονται ταχύτητες ροής ίσες με την ταχύτητα διαχύσεως.

- Η κλιμάκωση από την εργαστηριακή στη βιομηχανική κλίμακα γίνεται με αύξηση της διαμέτρου της στήλης και όχι με την αύξηση του μήκους για να αποφευχθεί ο κίνδυνος παραμορφώσεως του υλικού, λόγω παραμορφωτικών δυνάμεων.

- Οι παραμορφωτικές δυνάμεις εξαρτώνται:

1. Από το ιξώδες,

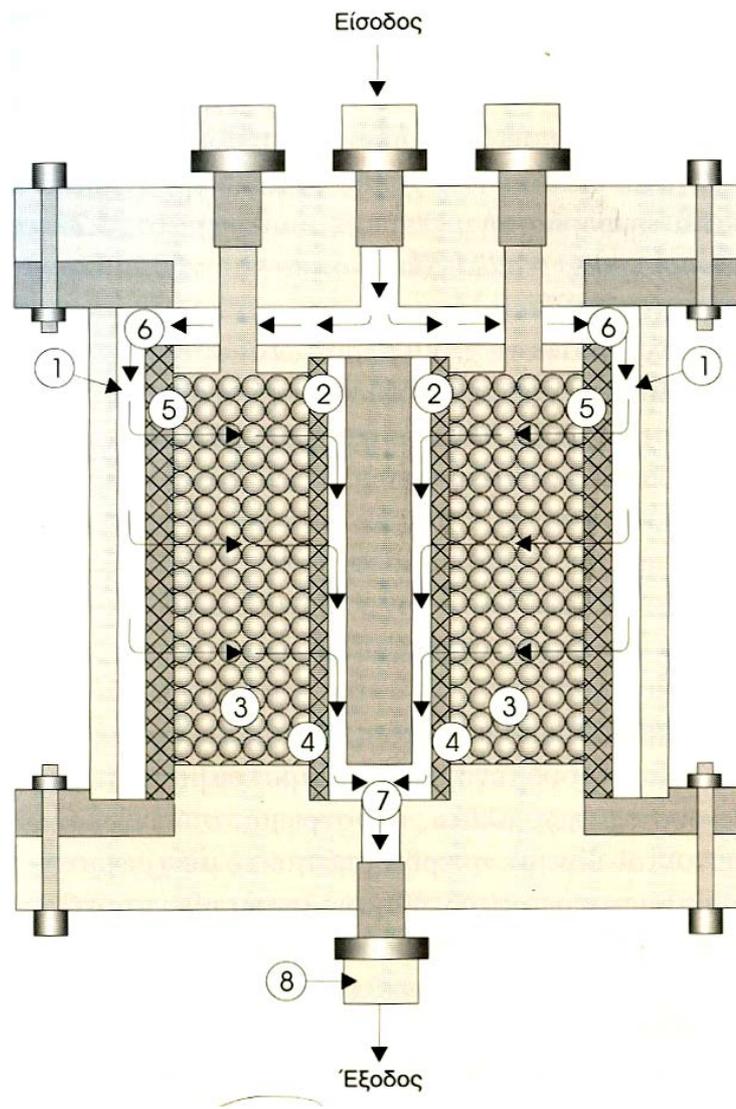
2. Από τη ροή, και

3. Από τη συνολική επιφάνεια του υλικού, η οποία περιλαμβάνεται μεταξύ τυχαίου σημείου της στήλης και της επιφάνειάς της.

- Η διάμετρος της στήλης σε μεγάλη κλίμακα προσδιορίζεται από το γινόμενο της διαμέτρου της εργαστηριακής στήλης επί την τετραγωνική ρίζα του παράγοντα κλιμακώσεως.

Παράδειγμα

- Έστω εργαστηριακή στήλη μήκους 10cm και διαμέτρου 2.5cm (όγκος 49mL), η οποία επεξεργάζεται 10mL δείγματος συγκέντρωσης 10mg ενζύμου/mL διαλύματος.
- Αν η επιθυμητή κλιμάκωση είναι 10g ενζύμου (παράγοντας κλιμακώσεως 10^3), τότε η διάμετρος της στήλης θα πρέπει να είναι $2.5\sqrt{10^3} = 79\text{cm}$ και συνεπώς ο όγκος της «μεγάλης» στήλης θα είναι πλέον 49L.
- Στη βιομηχανία συνήθως χρησιμοποιούνται:
 - A. Ο τύπος της «κοντής και παχιάς» στήλης,
 - B. Η διαμερισμένη στήλη, η οποία αποτελείται από στήλες εν σειρά, και
 - Γ. Η στήλη ακτινικής ροής.



Σχ. 21. Στήλη ακτινικής ροής: (1) διάυλος εισόδου δείγματος, (2) εσωτερικός διάυλος εξόδου εκλούσματος από το χρωματογραφικό υλικό, (3) χρωματογραφικό υλικό, (4) και (5) πορώδεις επιφάνειες (πλέγμα) συγκράτησης χρωματογραφικού υλικού, (6) διανεμητής δείγματος, (7) περιοχή συλλογής εκλούσματος και (8) διάυλος εξόδου από τη στήλη.

Μορφοποίηση προϊόντος

- Το εκλουόμενο ένζυμο μετά το τελευταίο στάδιο καθαρισμού παραλαμβάνεται σε διάλυμα μαζί με μικρομοριακές ουσίες (άλατα, υποστρώματα, συνένζυμο, αναστολέα, κλπ).

- Αυτές απομακρύνονται είτε:

1. Με **υπερδιήθηση**, είτε

2. Με **χρωματογραφία διαπερατότητας**.

- Στην περίπτωση της **υπερδιήθησης** ακολουθεί επεξεργασία του ενζύμου με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος, στο οποίο τελικά θα συντηρηθεί το ένζυμο, οδηγώντας σε συμπύκνωση τελικά του ενζυμικού διαλύματος.

- Στη συνέχεια, το ένζυμο κατακρημνίζεται με θειικό αμμώνιο (συνήθως 3.4M περίπου), είτε το ενζυμικό διάλυμα υπόκειται σε διαπίδυση έναντι γλυκερόλης (20-50%).

- Αποθηκεύεται σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C για ίζημα με θειικό αμμώνιο, $\leq -25^\circ\text{C}$ σε γλυκερόλη).
- Στην περίπτωση της **χρωματογραφίας διαπερατότητας** έχουμε αναπόφευκτα αύξηση του αρχικού όγκου του ενζυμικού διαλύματος κατά 30% περίπου.
- Συχνά, η υψηλή καθαρότητα ενζύμων έχει ως επακόλουθο τη μείωση της δραστηριότητας του παρασκευάσματος, λόγω μειωμένης ενζυμικής σταθερότητας.
- Για αυτόν τον λόγο, απαιτείται η προσθήκη κατάλληλων σταθεροποιητών ενζυμικής σταθερότητας, όπως υποστρωμάτων, συνενζύμων, πολυαιθυλενογλυκόλης, γλυκερόλης, σακχάρων (σακχαρόζης), αλάτων $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{NaCl}]$, πρωτεϊνών (αλβουμίνης), κλπ.
- Μια άλλη τεχνική που εφαρμόζεται τόσο σε εργαστηριακή, όσο και σε βιομηχανική κλίμακα είναι η λυοφιλίωση.

- Οι προσμίξεις που συνήθως απαντώνται σε ενζυμικά παρασκευάσματα είναι κυρίως άλατα, νουκλεϊκά οξέα, άλλες πρωτεΐνες, πυρετογόνες ουσίες (λιποπολυσακχαρίτες), και χημικά συστατικά που προέρχονται από τη σταδιακή καταστροφή χρωματογραφικών υλικών.
- Ένζυμα που προορίζονται για ασθενείς και διάφορες θεραπευτικές πρωτεΐνες πρέπει να είναι απολύτως καθαρά προϊόντα.
- Αντίθετα, τα βιομηχανικά ένζυμα είναι συνήθως παρασκευάσματα περιορισμένης καθαρότητας.
- Τη βιομηχανία την ενδιαφέρει να υπάρχει συγκεκριμένη καταλυτική δραστηριότητα/μονάδα βάρους παρασκευάσματος και οι προσμίξεις να μην επηρεάζουν την καταλυτική δράση.

- Είναι προφανές ότι οι βιοκαταλύτες με περισσότερες προσμίξεις έχουν χαμηλότερο κόστος, γεγονός που συνεπάγεται φθηνότερο τελικό προϊόν.
- Τα αναλυτικά και διαγνωστικά ένζυμα είναι υψηλής σχετικά καθαρότητας.
- Σημαντικός παράγοντας είναι και οι **ειδικές προσμίξεις**, δηλαδή το ποσοστό προσμίξεων σε άλλα ένζυμα, τα οποία επηρεάζουν την αντίδραση του κυρίως ενζύμου του παρασκευάσματος.
- Τα περιοριστικά ένζυμα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από ανεπιθύμητες μη εκλεκτικές νουκλεάσες.