

Immobilizacja -mikrokapsułkowanie

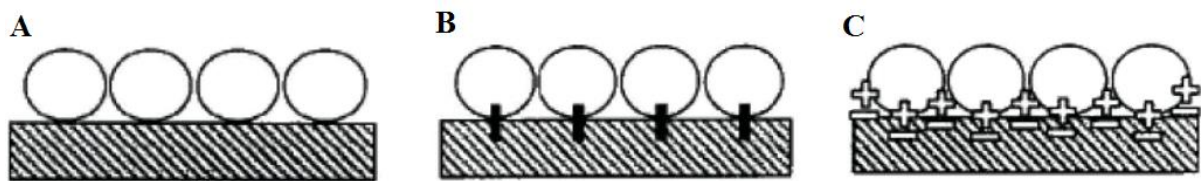
Enzymy są biokatalizatorami, które charakteryzuje wysoka specyficzność działania, kierunkowość działania oraz zdolność do obniżania w istotny sposób energii aktywacji reakcji chemicznych. Dzięki temu znalazły szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu spożywczego, farmaceutycznego, kosmetycznego, chemicznego i w analityce medycznej. Często jednak stosowanie enzymów w formie natywnej wiąże się z wysokimi kosztami prowadzenia procesów, szczególnie wtedy gdy konieczne jest stosowanie preparatu enzymatycznego o wysokim stopniu oczyszczenia, jak np. w farmacji, a także wówczas gdy proces prowadzony jest cyklicznie. Dlatego od lat 60-tych XX wieku coraz większym zainteresowaniem cieszą się enzymy immobilizowane.

Immobilizacją, czyli inaczej unieruchomieniem (łac. *Immobilia* – nieruchomy), można określić zespół metod, które ograniczają całkowicie lub częściowo swobodę poruszania się określonych atomów, cząsteczek, substancji lub materiału biologicznego (enzymów, mikroorganizmów) na podłożu stałym czy też wewnątrz specyficznych struktur. Wyróżniamy trzy główne metody immobilizacji:

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

Unieruchamianie na powierzchni

Unieruchamianie na powierzchni nośnika występuje, gdy komórki wykazują naturalną skłonność przylegania do pewnych powierzchni lub innych organizmów, ewentualnie czynią to po zastosowaniu odpowiedniego chemicznego czynnika wiążącego (Rysunek 1).



Rysunek 1 A – adsorpcja na powierzchni, B – wiązanie kowalencyjne, C – wiązanie elektrostacyjne

W obrębie tej grupy metod wyróżnia się adsorpcję, adhezję i wiązanie kowalencyjne komórek. Ważne jest wysokie powinowactwo komórek do nośnika zapobiegające nadmiernym stratom populacji, szczególnie podczas szybkiego przepływu strumienia substratu w bioreaktorze.

Adsorpcja i adhezja polegają na unieruchamianiu komórek na powierzchni poprzez wiązania wodorowe, oddziaływania sił van der Waalsa, jonowe, hydrofobowe, elektrostacyjne, powinowactwa lub kombinacje różnych sił. Taki sposób immobilizacji jest bardzo prosty i tani, jednak ma podstawowe wady – stosunkowo niskie stężenie biomasy na jednostkę objętości bioreaktora oraz skłonność do desorpcji komórek w wyniku zmian pH, stężenia jonowego i innych czynników. Jako nośników używa się różnych materiałów: drewna, celulozy, jonitów, polimerów syntetycznych, szkła porowatego, spieków ceramicznych, tlenków metali, ziemi okrzemkowej i innych. Z kolei technika oparta na wiązaniu kowalencyjnym polega na odpowiedniej funkcjonalizacji nośnika i późniejszym połączeniu z białkiem. Metoda ta zapewnia trwałe związanie enzymu z powierzchnią nośnika, ale jednocześnie jej zasadniczą wadą są często dość drastyczne warunki, w jakich przebiegają reakcje. Zazwyczaj obserwuje się spadek aktywności enzymu (nawet o 50%) spowodowany zmianami konformacyjnymi i częściową denaturacją. Wybór odpowiedniej metody bywa często przypadkowy, ponieważ prawdopodobieństwo wystąpienia konkretnego aminokwasu na powierzchni białka, jak i jego stabilność w warunkach reakcji,

często nie jest znane. Do wytwarzania wiązań najczęściej wykorzystuje się grupy nukleofilowe aminokwasów: imidazolowe (His), fenyłowe (Tyr), -SH (Cys), -NH₂ (Lys).

Ogólnie immobilizacja tą metodą przebiega w dwóch etapach:

- aktywacja nośnika przez przyłączenie reaktywnej grupy łączącej,
- przyłączenie enzymu.

Jako nośniki wykorzystuje się nośniki nieorganiczne typu krzemionka (porowate szkło), polimery naturalne (celuloza, dekstran, agaroz, skrobia), polimery syntetyczne.

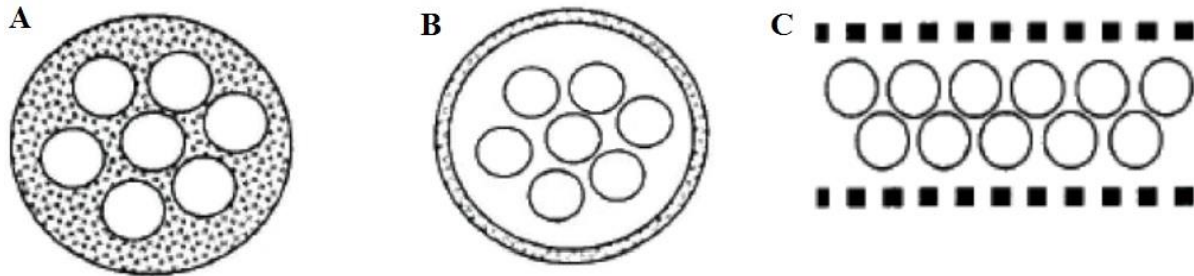
W przypadku unieruchamiania organizmów, takich jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, kluczową rolę w wiązaniu odgrywają oddziaływania jonowe między nośnikiem o dużej gęstości ładunków dodatnich, a licznymi ujemnymi ładunkami na ścianie komórkowej drożdży. Aby zwiększyć zdolność unieruchamiania, sugeruje się zredukowanie siły elektrostatycznego odpychania komórka-nośnik. Ewentualnie dąży się do nadania powierzchni komórki lub nośnika ładunku dodatniego, przez zastosowanie np. polietylenoiminy (PEI) lub aldehydu glutarowego. Modyfikacja nośnika musi być jednak indywidualnie dobierana do unieruchamianych organizmów, ponieważ dodatek czynników aktywnych może powodować redukcję żywotności komórek lub na przykład obniżenie ilości otrzymywanego etanolu. Wiązanie drożdży można zwiększyć także w wyniku dehydratacji powierzchni komórkowej. Dehydratacja może być wynikiem suszenia konwekcyjnego lub liofilizacji, co jest związane z niszczeniem fragmentów struktury komórkowej. Następuje zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych i 10-30% składników wewnątrzkomórkowych przedostaje się do otaczającego podłoża, wchodząc w interakcje z powierzchnią nośnika. W zależności od rodzaju użytego nośnika ilość unieruchomionych komórek jest różna, co wskazuje że immobilizacja zależy od struktury chemicznej nośnika. Natomiast wydajność adsorpcji drobnoustrojów zależy od ich rodzaju, metabolizmu i wieku oraz cech środowiska. Sposób unieruchamiania jest bardzo prosty i polega na tym, że do roztworu z namnożonym materiałem biologicznym wprowadza się nośnik i pozostawia na pewien czas, bez mieszania lub z mieszaniem, w celu osadzenia się komórek. W drugim sposobie bioreaktor wypełnia się nośnikiem i wtlacza od góry lub od dołu, namnożone na podłożu płynnym komórki.

Unieruchamianie wewnątrz nośnika

Zamykanie wewnątrz nośnika opiera się na wykorzystaniu materiałów, które tworzą porowate, półprzepuszczalne membrany, umożliwiające dyfuzję. W metodzie tej wyróżniamy trzy grupy: pułapkowanie, mikrokapsułkowanie oraz unieruchomienie pomiędzy membranami. Pułapkowanie (inkluzyja) jest metodą, w której dana substancja zostaje zawieszona w żelu naturalnym bądź syntetycznym, po czym powstała mieszanina poddawana jest sieciowaniu. W wyniku tego powstają najczęściej kuleczki o wielkości rzędu kilkudziesięciu µm do paru mm. Mikrokapsułkowanie polega na utworzeniu kapsułek, w których wyróżniono dwie warstwy; pierwszą jest rdzeń, który może występować w postaci gazowej, ciekłej lub stałej, natomiast drugą warstwę stanowi otoczka utworzona z żelowego polimeru lub półprzepuszczalnej membrany. W metodzie tej możliwe jest utworzenie kilku warstw otoczki, których zadaniem jest lepsza ochrona materiału w rdzeniu przed oddziaływaniem czynników zewnętrznych. Kolejnym sposobem unieruchomienia jest zamykanie biokatalizatorów wewnątrz przegród zbudowanych z półprzepuszczalnych membran, co umożliwia swobodny przepływ małowcząsteczkowych substratów i produktów. W przypadku zastosowania mikroorganizmów, metoda ta nie zmniejsza ich aktywności oraz nie hamuje ich wzrostu.

Wyżej wymienione metody nie wymagają użycia skomplikowanych urządzeń, cechują się prostotą oraz są ekonomiczne, jednak posiadają kilka istotnych wad, uniemożliwiających ich szersze zastosowanie. Kapsuły niecałkowicie spełniają swoją rolę w przypadku immobilizacji mikroorganizmów, gdyż ograniczają ich wzrost i aktywność, a ponadto część komórek przenika do pożywki. Bardzo często już sam proces sieciowania, przy zastosowaniu syntetycznych nośników, wykazuje toksyczność. W

przypadku półprzepuszczalnych membran, dużym minusem jest przenikanie jedynie małych cząsteczkowych substancji; cząsteczki o większych rozmiarach uniemożliwiają swobodny przepływ metabolitów. Jako nośniki w powyższych metodach stosuje się: alginian, karageny, agar, chitozan, pektynę, żelatynę, poliakryloamid, poliuretan, pochodne celulozy, membrany nylonowe, silikonowe, liposomowe, poliwęglanowe.



Rysunek 2 Immobilizacja wewnątrz nośnika: A) pułapkowanie, B) mikrokapsułkowanie, C) unieruchomienie pomiędzy membranami.

Unieruchamianie bez udziału nośnika

Immobilizacja bez udziału nośnika, zwana inaczej flokulacją, polega na tworzeniu agregatów przez drobnoustroje. W tym procesie wykorzystywana jest naturalna zdolność mikroorganizmów do oddziaływania fizycznego lub chemicznego z grupami funkcyjnymi ścian komórkowych, w wyniku czego zostają one połączone. W celu zwiększenia tego zjawiska stosuje się zmianę pH, składu pożywki, stężenia tlenu, a także innych czynników. Zaletą tej metody jest znaczne zwiększenie koncentracji biomasy, a co za tym idzie aktywności mikroorganizmów, bez stosowania nośników.

W obrębie tej grupy metod wyróżnia się następujące sposoby:

- sieciowanie przestrzenne,
- flokulacja komórek przy udziale elektrolitów,
- naturalna flokulacja (samoagregacja) oraz wzrost drobnoustrojów w postaci kuleczek lub kłaczek biomasy.

Flokulacja definiowana jest jako zdolność zawieszonych komórek do tworzenia większych skupień i konglomeratów w postaci kłaczek, które ulegają szybkiej sedymentacji. Procesy flokulacji pozwalają utrzymać wysoką gęstość populacji drobnoustrojów w bioreaktorze, bez stosowania nośników i innych materiałów. Przyspieszenie procesu samoagregacji można spowodować poprzez regulację pH, skład pożywki, stężenie rozpuszczonego tlenu i inne czynniki (np. dodatek polielektrolitów).

Nośniki organiczne

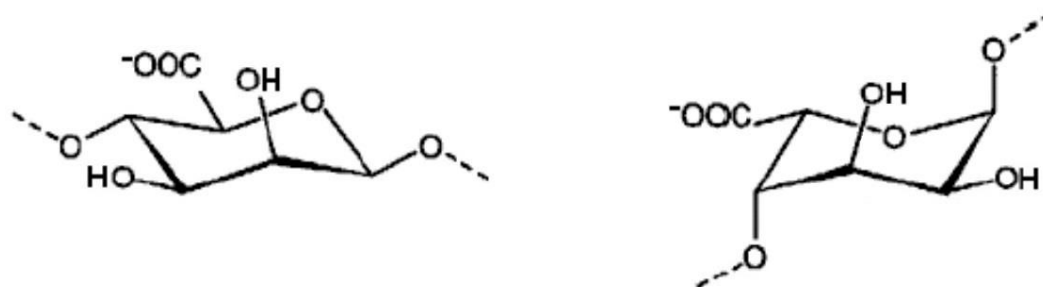
Naturalne biopolimery cieszą się dużym zainteresowaniem w procesach immobilizacji ze względu na szereg zalet. Posiadają wiele grup funkcyjnych, co wpływa na stabilizację biokatalizatorów/substancji w strukturze żelu. Układy takie są hydrofilowe, biodegradowalne, biokompatybilne oraz tanie. Jednak ich niska odporność mikrobiologiczna, wrażliwość na rozpuszczalniki organiczne oraz wąski zakres pH, w którym nośniki są stabilne, niestety bardzo często przekreśla możliwość ich zastosowania. Najchętniej stosowanymi biopolimerami są: agar, chitozan, alginian, karageny, pochodne celulozy i inne. W celu polepszenia ich właściwości naturalnych polimerów stosuje się liczne modyfikacje, np. nośniki hybrydowe, kopolimery, nowe czynniki sieciujące.

W ostatnim czasie coraz więcej uwagi zwraca się na możliwość zastosowania syntetycznych polimerów. Podobnie jak naturalne, posiadają liczne oraz o zróżnicowanym charakterze grupy funkcyjne. Dodatkowo niewątpliwie ich zaletą jest możliwość regulowania ich struktury na poziomie makromolekularnym, a mianowicie dobór właściwej masy cząsteczkowej, struktury przestrzennej oraz

sposób i kolejność rozmieszczenia poszczególnych aktywnych grup funkcyjnych w łańcuchu. Na etapie ich syntezy można wpływać na ich budowę, co może z kolei w konsekwencji regulować porowatość, średnicę porów oraz inne właściwości fizyczne nośnika, takie jak jego polarność, hydrofobowość, a także zmieniać charakter chemiczny powierzchni poprzez występujące określone grupy funkcyjne. Ponadto nośniki takie mogą przybierać najróżniejsze kształty (rurki, membrany, powłoki, nośniki o różnych kształtach od kulistych do owalnych), są łatwo dostępne i stosunkowo tanie, jednak mają ograniczoną możliwość regeneracji, a sam proces ich sieciowania zazwyczaj jest toksyczny. Dodatkowo polimery takie nie są z reguły biodegradowalne. Najczęściej stosowanymi polimerami syntetycznymi jako nośniki, są pochodne polimetakrylanów, poliamin, poliakrylany.

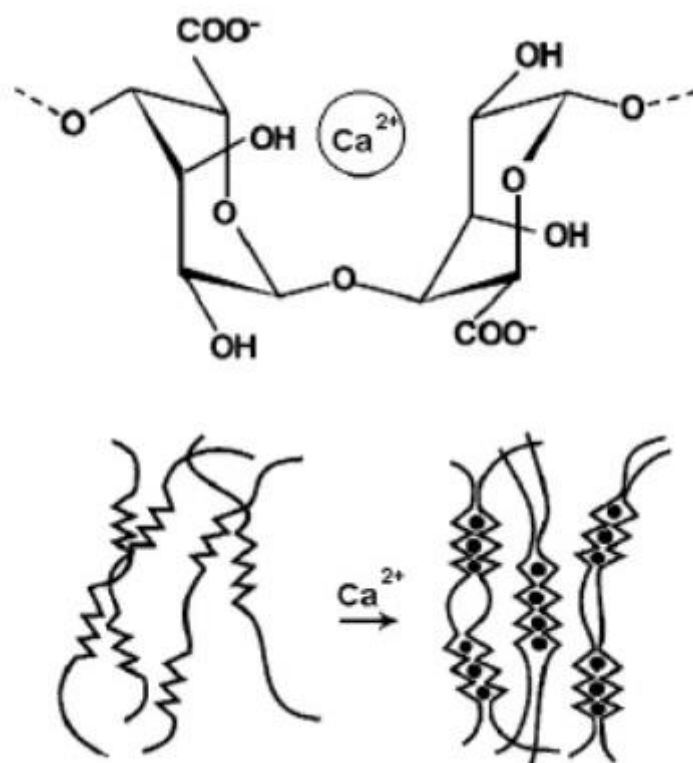
Alginiany

Alginiany są jednymi z najczęściej stosowanych polimerów naturalnych do immobilizacji. Pozyskiwane są w wyniku ekstrakcji ze ścian komórkowych alg, należących do klasy Brunatnic (*Phaeophyceae*). Tworzą one jednowartościowe sole kwasu alginowego, np. alginian sodu, który jest szeroko wykorzystywany w różnych dziedzinach przemysłu. Częsteczką alginianu jest liniowym kopolimerem zbudowanym z kwasu α -L-guluronowego (G) i β -D-mannuronowego (M). Te dwa monomery zawierające grupy karboksylowe powodują, iż alginian jest typowym polianionem.



Rysunek 3 Monomery alginianu: z lewej kwas β -D-mannuronowy (M), po prawej kwas α -L-guluronowy (G).

W cząsteczce alginianu można wyróżnić trzy regiony: region zbudowany z kwasu guluronowego (G) lub mannuronowego (M) oraz region mieszany (MG). Zawartość poszczególnych monomerów oraz długość regionów uzależniona jest od gatunku i rodzaju tkanki, z jakiej został pozyskany alginian. Skład chemiczny różnych typów alginianów wpływa na ich właściwości, a także na żele, które tworzą. Alginiany zawierające w swoim składzie dużą ilość regionów G formują żele sztywne i kruche, które ulegają synerezie (kurczenie się żelu z wydzieleniem wody), natomiast alginiany zawierające dużo regionów M oraz MG, tworzą żele słabe, lecz elastyczne, które łatwo się deformują. Monomery alginianu różnią się między sobą sposobem wiązania oraz strukturą przestrzenną. Dlatego regiony M przybierają kształt rozciągniętej wstążki, natomiast regiony G są regularnie pozaginane. Skutkiem tego jest tworzenie pustych przestrzeni pomiędzy dwoma monomerami G, odpowiadającymi idealnie rozmiarom jonu wapnia, co wiąże się z wykazywaniem większego ich powinowactwa do tych jonów (niż do jonów sodu). Dodanie jonów wapnia do alginianu bogatego w regiony G powoduje powstanie żelu. Regiony M posiadają słabe powinowactwo do jonów wapnia, przez co w żelu będą tworzyły się rejony plastyczne lub wręcz ciekłe. Alginian sodu dodatkowo tworzy żele w obecności jonów innych metali wielowartościowych, np.: baru, kobaltu, cynku, miedzi, żelaza, glinu, jednak brak biokompatybilności tak wytworzonych żeli, powoduje, iż nie są one stosowane.



Rysunek 4 Schemat reakcji żelowania alginianu sodu.

Alginian wapnia jest jednym z lepszych nośników do immobilizacji biokatalizatorów. Na fakt ten wpływają takie czynniki, jak: obecność grup karboksylowych, hydrofilowość, naturalne pochodzenie, stosunkowo dobra wytrzymałość mechaniczna, a także bardzo tania i łatwa procedura otrzymania żelu, który jest nietoksyczny i łagodny dla immobilizowanego materiału.

Nośniki nieorganiczne

Nośniki nieorganiczne posiadają dużą odporność chemiczną, fizyczną oraz biologiczną. Istotną wadą tych nośników jest występowanie małej liczby grup funkcyjnych, co uniemożliwia dostateczne związanie biokatalizatora, dlatego najczęściej wykorzystuje się je w tworzeniu nośników hybrydowych, zarówno z polimerami naturalnymi, jak i syntetycznymi. Najczęściej stosowanymi nośnikami nieorganicznymi są: krzemionka, tlenki metali, ceramika lub szkło porowate.

Wady i zalety immobilizacji

Obecnie w różnych gałęziach przemysłu dąży się do obniżenia kosztów produkcji oraz osiągnięcia przewagi technologicznej poprzez wdrażanie innowacyjnych rozwiązań, dzięki czemu rośnie konkurencyjność danej firmy. Dogodne warunki ku temu stwarza zastosowanie procesów immobilizacji. Immobilizacja zapewnia:

- możliwość wielokrotnego wykorzystania biokatalizatora,
- zwiększenie stabilności biokatalizatora, ponieważ nośnik może działać ochronnie w przypadku zmian pH, temperatury i składu podłoża,
- łatwiejsze oddzielenie końcowego produktu od biomasy,
- eliminacja fazy namnażania, dzięki czemu niemal od razu mikroorganizmy przystępują do produkcji pożądaney substancji (dodatkowo ulega skróceniu czas fermentacji),
- zwiększenie koncentracji pożądaney substancji w bioreaktorze, zwiększenie gęstości komórek w przeliczeniu na jednostkę objętości fermentora, co prowadzi do wyższej produktywności,
- ułatwienie prowadzenia procesów ciągłych, ich automatyzację i kontrolę,

- zmniejszenie występowania zakażeń mikrobiologicznych,
- eliminacja niektórych etapów produkcji (mniejsze zapotrzebowanie na energię, sprzęt, siłę roboczą),
- lepsze wykorzystanie substratu, w związku z czym proces przebiega z wyższą wydajnością,
- możliwość zastosowania wydajniejszego mieszania i napowietrzania medium, co może sprzyjać lepszemu wykorzystaniu substratów,
- ochrona immobilizowanej substancji,
- kontrolowane uwalnianie produktów.

Obok zalet pojawiają się pewne problemy, które nie występują w układach z komórkami wolnymi. Do wad zaliczyć można:

- ograniczenia dyfuzyjne dot. przenikania substratów i produktów,
- trudności z utrzymaniem długotrwałej stabilności nośnika,
- zmiany metaboliczne wywołane unieruchomieniem i długotrwałym wykorzystaniem tych samych komórek,
- wymywanie/uwalnianie komórek do pożywki, przyczyną tego zjawiska są znaczne opory w transporcie substratów i produktów pomiędzy matrycą i nośnikiem; w rezultacie prawie cała biomasakoncentruje się w pobliżu powierzchni kulek.
- strata aktywności biokatalizatorów wraz z upływem czasu.

Zastosowanie immobilizacji drobnoustrojów

Od wielu lat trwają prace nad możliwością szerszego wykorzystania komórek unieruchomionych w procesach technologicznych. Duży wzrost zainteresowania aplikacją takich systemów w różnych procesach biotechnologicznych, głównie w przemyśle spożywczym, wynika z korzyści, jakie można osiągnąć z użycia immobilizowanej biomasy. Największe szanse przemysłowego wykorzystania istnieją w procesach biosyntezy witamin, aminokwasów i kwasów organicznych, a szczególnie fermentacji etanolowej. Kapsułkowanie jest wykorzystywane na szeroką skalę w medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i chemicznym, w systemach kontrolowanego uwalniania substancji czynnych (np. enzymów, leków) i konstruowaniu sztucznych organów. Zakapsułkowane środki farmakologiczne są uwalniane stopniowo, w ilościach umożliwiającym utrzymanie ich stężenia w organizmach ludzi i zwierząt na poziomie leczniczym przez dłuższy okres. Szczególnie interesującą aplikacją, która zapoczątkowała kapsułkowanie komórek zwierzęcych, jest unieruchamianie w kapsułkach fragmentów trzustki produkujących insulinę (tzw. wysepek Langerhansa) w terapii cukrzycy. Podawanie insuliny za pomocą iniekcji nie zapewnia równego poziomu glukozy we krwi i z czasem prowadzi do uszkodzeń wielu tkanek i organów, głównie nerek. Rozwiązaniem może być zastosowanie „sztucznej trzustki” czyli wszczepienie kapsułek z komórkami wytwarzającymi insulinę ludziom, u których trzustka nie produkuje tego hormonu lub produkuje jej zbyt mało.

W biotechnologii dominuje unieruchamianie komórek i innych substancji aktywnych w pełnych żelach, głównie z alginianu wapnia. Wynika to z prostoty i niskiego kosztu tej metody. Istnieją jednak prace badawcze, w których stosuje się z powodzeniem kapsułkowanie materiałów biologicznych, np. produkcja przeciwciał monoklonalnych, hodowla komórek zwierzęcych, wspólne unieruchomienie drożdży i enzymu oraz kapsułkowanie komórek bakterii.

Innym przykładem zastosowania unieruchomionych drobnoustrojów jest hodowla bakterii fermentacji mlekowej w pełnych żelach, w której łączy się etap namnażania komórek z ich zagęszczaniem. Proces ten okazał się także korzystny w produkcji starterów mleczarskich, ponieważ zagęszczenie komórek

hodowanych w żelach alginianowych było do 100 razy wyższe niż w tradycyjnych hodowlach zawiesinowych.

komórki	produkty lub miejsce zastosowania	komórki	produkty lub miejsce zastosowania
bakterie		glony	
<i>Erwinia rhapontici</i>	izomaltuloza	<i>Botryococcus braunii</i>	węglowodany
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	oczyszczanie wody pitnej	komórki roślinne	
<i>Zymomonas mobilis</i>	etanol	<i>Chatharanthus roseus</i>	alkaloidy do terapii nowotworów
sinice		różne gatunki	sztuczne nasiona
<i>Anabaena</i> sp.	amoniak	protoplasty komórek roślinnych	manipulacje komórkami, mikroskopia
grzyby		komórki zwierzęce	
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	hydroliza laktozy	hybrydy	przeciwciała monoklonalne
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	etanol	wyspy Langerhansa	insulina/implantacja
<i>Saccharomyces bajanus</i>	produkcja szampana	fibroblasty lub komórki limfy	interferony (α lub β)