



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101993900322753
Data Deposito	29/09/1993
Data Pubblicazione	29/03/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	G		

Titolo

PELLICOLE SOTTILI PROTEICHE E COMPOSIZIONI PER LA LORO PREPARAZIONE.
--

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale
dal titolo:

"Pellicole sottili proteiche e composizioni per la loro
preparazione".

a nome: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale

Avanzata

Inventori: Vakoula Serguei, Erokhine Viktor, Nicolini Claudio

La presente invenzione concerne pellicole sottili
proteiche e composizioni per la loro preparazione.

Il campo della bioelettronica, al momento di grande
attualità, richiede l'uso di strati proteici regolari molto sottili
organizzati in strutture ordinate tridimensionalmente con
supporti molecolari passivi (strati conduttori, strati isolati).
Una delle strade più promettenti è quella di applicare la tecnica
di Langmuir-Blodget (LB) (1). Al momento sembra essere la
migliore procedura che permette la costruzione di strutture
funzionali con una risoluzione molecolare. A causa delle
condizioni relativamente blande del processo, la tecnica è stata
applicata con successo alla produzione di pellicole di parecchie
proteine (2).

E' stato trovato che il metodo di LB può essere
applicato in maniera classica quando si utilizzano proteine di

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

membrana, così come i centri di reazione fotosintetica e le batteriorodopsine (3, 4). E' anche possibile utilizzare tale metodo per alcune delle proteine solubili in acqua che sono stabili alla interfaccia aria/acqua. L'immunoglobuline di classe G sono uno degli esempi per questo tipo di proteine (5). Tuttavia, le proteine solubili in acqua, la cui struttura è mantenuta dalle interazioni polari e idrofobiche, tendono a denaturare all'interfaccia aria/acqua. Le forze che mantengono intatta la struttura di tali proteine sono dello stesso ordine di grandezza della tensione superficiale; pertanto, dopo che una proteina è posta sulla superficie acquosa, l'azione della tensione superficiale dispiega la proteina distruggendo le interazioni intramolecolari esistenti. Ciò ad eccezione delle immunoglobuline, che sono stabilizzate da ponti S-S covalenti all'interno della molecola. Questi legami sono molto più forti della tensione superficiale e quindi mantengono la struttura molecolare della proteina stessa.

Poichè parecchie delle proteine solubili in acqua hanno un interesse funzionale significativo in parecchi campi delle scienze naturali (per esempio citocromi, e altre proteine utilizzabili in bioelettronica (6)), è stata condotta una ricerca per identificare il modo di applicare il metodo LB a queste proteine. Questa ricerca è andata principalmente in due direzioni, in particolare studiando l'uso di interazioni di carica

Ing. Barzani & Zanardo
Roma spa

(7) e di interazioni specifiche (8). In entrambi i casi un monostrato di lipidi si forma alla interfaccia aria/acqua. Nel primo caso, le teste delle molecole lipidiche sono caricate in maniera opposta a quella della superficie della proteina, e nell'ultimo caso i gruppi delle teste lipidiche hanno una affinità specifica per alcune regioni delle proteine. Le molecole di proteine, una volta iniettate sotto il monostrato, sono assorbite regolarmente a livello dei gruppi delle teste lipidiche. Come risultato, si osserva la formazione di domini proteici cristallini a due dimensioni.

Tuttavia, le tecniche utilizzate fino ad ora hanno alcuni svantaggi. Uno dei più importanti è che, durante l'assorbimento alla interfaccia lipide/acqua, si ottiene una distribuzione non omogenea della proteina nella pellicola, come evidenziabile per microscopia a fluorescenza (8). Oltre a zone con domini cristallini proteici regolari, si osservano alcune irregolarità, come regioni vuote senza alcuna molecola proteica. Un altro svantaggio è che non tutte le molecole proteiche sono legate ai gruppi delle teste dei lipidi, a causa della solubilità della proteina nella fase acquosa e pertanto ad una ridistribuzione della maggior parte delle molecole proteiche nella soluzione.

Sommario dell'invenzione

Ing. Pazzano & Zanardo
Roma s.p.a.

La presente invenzione è basata sulla scoperta che micelle inverse di proteine possono essere utilizzate per preparare pellicole sottili che non presentano gli svantaggi sopra descritti. Un primo aspetto della presente invenzione concerne micelle contenenti proteine ed un secondo aspetto pellicole sottili omogenee e la loro preparazione.

Descrizione dell'invenzione

La presente invenzione è particolarmente adatta per uso con proteine del tipo instabile alla interfaccia acqua/aria. Parecchie di tali proteine sono note dalla tecnica anteriore. Esempi illustrativi sono la glucosio ossidasi, il citocromo c e altre metalloproteine.

In maniera simile, i lipidi e i solventi organici che possono essere utilizzati per formare micelle inverse sono noti nel settore. Qui di seguito saranno dati degli esempi. Alla sua introduzione nelle particelle micellari lipidiche, la proteina è nel centro della particella (a contatto con i gruppi delle teste lipidiche) e le catene idrocarburiche sono esposte verso l'esterno. Tali particelle possono essere disciolte in solventi organici e può essere applicata la tecnica LB nella versione classica (cioè dispersione di una soluzione organica, compressione e trasferimento). Sono mostrati degli esperimenti in cui è stato possibile depositare molecole di enzimi in cui l'enzima non ha perso la sua attività nella pellicola LB.

Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

Tuttavia, per ottenere un addensamento delle proteine e per evitare che l'area coperta dai lipidi sia più grande dell'area coperta dalle molecole proteiche, è preferito che la catena organica del lipide sia relativamente corta, per esempio fino a 12 atomi di carbonio (ma anche dipendente in qualche misura dalle dimensioni relative dei componenti).

Una forma di attuazione preferita dell'invenzione sarà ora descritta.

E' stato applicato l'approccio micellare inverso per la costruzione di pellicole LB contenenti citocromo c. Una gran cura è stata data per la conservazione della struttura secondaria della proteina nella pellicola LB e per l'organizzazione molecolare della pellicola stessa.

L'invenzione verrà ora descritta in maniera esemplificativa facendo riferimento alle seguenti figure in cui:

la figura 1 rappresenta il modello della formazione di pellicole di LB utilizzando soluzioni micellari inverse. Inizialmente, molecole di citocromo c sono solubilizzate nella soluzione di micelle inverse AOT in ottano. La distribuzione della soluzione riorganizza le micelle in modo che le molecole di AOT formino un monostrato alla interfaccia aria/acqua e le molecole di citocromo siano attaccate a loro gruppi di testa. L'applicazione di diversi cicli di compressione-espansione provoca la rimozione delle molecole di AOT in eccesso dalla

Ing. Barrano & Barando
Roma s.p.a.

superficie acquosa e la formazione di monostrati addensati sia di AOT alla interfaccia che di proteine nell'acqua in vicin  della superficie.

La figura 2 rappresenta la isoterma π -A del monostrato di micelle inverse con il citocromo c dopo 4 cicli di compressione-espansione: Le frecce indicano la direzione del movimento della barriera (compressione o espansione).

la figura 3 rappresenta la dipendenza del potenziale di superficie del monostrato AOT-citocromo c rispetto all'area per una molecola di citocromo c (due cicli di compressione-espansione). Curve in alto compressione, in basso espansione.

La figura 4 raffigura la dipendenza del potenziale di superficie del monostrato AOT (micelle inverse senza citocromo c) rispetto all'area per molecola di AOT (due cicli di compressione-espansione). Il piccolo valore dell'area per molecola indica che la penetrazione delle molecole di AOT nel volume di acqua ha luogo immediatamente dopo la distribuzione del monostrato.

La figura 5 mostra spettri di dicroismo circolare del citocromo c in tampone fosfato (1), della soluzione di micelle inverse (2), di pellicole LB (9 monostrati) depositate con micelle inverse come soluzione distribuyente (3) e di pellicole LB (12 monostrati) depositate come micelle AOT inverse senza citocromo c come soluzione distribuyente (4).

Ing. Barzani & Ansaldo
Genova s.p.a.

La figura 6 è quadro ai raggi X del campione, contenente 10 periodi (AOT-citocromo c - AOT), depositato utilizzando micelle inverse come soluzione disperdente.

La figura 7 è un modello, rappresentante la struttura molecolare della pellicola LB, depositata con l'uso di micelle inverse come soluzioni disperdenti - monostrato di citocromo c è posto tra i gruppi delle teste di AOT nei monostrati adiacenti.

DETTAGLI SPERIMENTALI

La proteina citocromo c da cuore di cavallo è ottenuta da Sigma. Prima dell'uso, si scioglieva una preparazione commerciale in tampone fosfato 25 mM, pH 7.5, e si dializzava contro lo stesso tampone, e infine si concentrava. Si utilizzava la soluzione ottenuta ad una concentrazione di 6.8 mg/ml.

Il sodio diisooctilsolfosuccinato (aerosol OT, AOT), e il n-ottano sono ottenuti da Fluka e utilizzati senza ulteriore purificazione.

Le micelle inverse di AOT in ottano sono preparare secondo procedure standard descritte da (6). Il citocroma è solubilizzato ad un grado di idratazione di 8.6 (vedi risultati).

Gli studi sui monostrati e il trasferimento delle pellicole su substrati solidi sono effettuati in contenitori LB MDT (Russia). La dimensione del contenitore è di 240 x 100 mm e il volume è di 150 ml. Il sistema fornisce una compressione

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

bilaterale, con una pressione di superficie, un potenziale di superficie, e una applicanza del punto di deposito posizionati al centro del contenitore. La sensibilità della pressione di superficie è di 0.05 mN/m. Le misure del potenziale di superficie sono effettuate con un elettrodo vibrante e la sensibilità è di 10 mV.

Si utilizza acqua purificata con il sistema MiliQ come subfase (resistività maggiore di 18 M Ω /cm).

I monostrati sono trasferiti su substrati solidi per tecnica di trasferimento orizzontale (metodo di Langmuir-Shaefer) (2). Si utilizzano come substrati dei sottili strati di silicone rifinito chimicamente per il deposito di pellicole LB per studi ai raggi X e si utilizzano strati di quarzo (Suprasil, Hellma) come supporti per studi di dicroismo circolare (CD).

Gli esperimenti strutturali sono effettuati su un diffrattometro a raggi X a piccolo angolo con un evidenziatore sensibile alle posizioni lineari (10). Le misure sono effettuate con una risoluzione angolare di 0.02° (in cui la risoluzione della determinazione dello spazio è di 0.5 Angstrom).

Le misure di dicroismo circolare si effettuano su uno spettropolarimetro Jasco J-710 ad una concentrazione proteina di 0.5 mg/ml nell'intervallo di 190-260 nm ad una risoluzione di 0.1 mdeg/cm e una costante nel tempo di 8 secondi. Lo

Ing. Barzani S. C. Barzani
Roma s.p.a.

strumento è calibrato per artefatti di campioni inattivi con uno standard noto.

RISULTATI

Come primo passaggio, il citocroma c è solubilizzato in micelle inverse di AOT in ottano. Poichè lo stato delle interazioni polari è determinato dall'area di superficie del contatto, oltre che da altri fattori, è conveniente selezionare il punto di compatibilità spaziale della molecola proteica e delle micelle.

La superficie interna della cavità sferica delle micelle inverse è caricata negativamente a causa della presenza dei gruppi delle teste dei tensioattivi. Quando una proteina globulare è solubilizzata nelle micelle inverse, viene circondata dalle molecole di tensioattivo che, pertanto, interagiscono con le cariche di superficie della proteina globulare. Più piccola è la distanza tra le teste polari delle molecole tensioattive e la superficie della proteina, più forte sarà l'interazione risultante.

Le dimensioni della cavità acquosa interna delle micelle inverse di AOT sono determinate principalmente dal contenuto in acqua del sistema, a condizione che le altre condizioni non siano cambiate. Il contenuto di acqua è caratterizzato da un parametro denominato "grado di idratazione", oppure WO, che è un rapporto molare di acqua verso le concentrazioni di tensioattivo nel sistema (6). Pertanto, la scelta di una matrice

micellare in cui la proteina si "adatti" fermamente, un contatto adeguato della proteina e delle molecole di tensioattivo dovrebbero essere ottenuti tutta la superficie interna della micella inversa.

Il citocromo c, che è una proteina globulare con un peso molecolare di circa 12.5 kDa, è in maniera approssimata sufficientemente simile ad una sfera con un diametro di 34 Angstrom (12). Il grado di idratazione di 8.6 corrisponde quasi allo stesso diametro della cavità interna delle micelle. Questo è esattamente il valore che è stato scelto per la solubilizzazione dell'enzima prima della sua dispersione alla subfase dell'acqua.

Il deposito di una piccola goccia di una soluzione micellare inversa sulla superficie acquosa provoca un marcato aumento della pressione di superficie (il deposito di una goccia di 10 μ l provoca un aumento della pressione di superficie di circa 20 mN/m). Questo dovrebbe essere dovuto alla riorganizzazione delle micelle alla interfaccia aria/acqua in modo tale che le molecole di AOT del monostrato sono rivoltate con le code idrofobiche dalla superficie dell'acqua, e le molecole di proteine che sono al disotto dell'acqua, si legano ai gruppi delle teste dei tensioattivi (vedi figura 1).

La isoterma π -A di un monostrato micellare inverso distribuito viene presentata nella figura 2. Durante i cicli iniziali di compressione-espansione la curva non è riproducibile,

Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

probabilmente a causa dei processi di stabilizzazione nella pellicola. La riproducibilità della isoterma π -A è ottenuta dopo 4 cicli di compressione-espansione.

La isoterma π -A delle micelle inverse vuote di AOT (cioè senza citocromo) è simile a quella delle micelle inverse con il citocromo c. Pertanto, la principale regione per l'aumento della pressione di superficie è la presenza del tensioattivo alla interfaccia aria/acqua.

La presenza della proteina nel sistema può essere registrata dalle misure del potenziale di superficie. Le dipendenze del potenziale di superficie delle micelle inverse con o senza il citocromo c sono raffigurate in figura 3 e in figura 4, rispettivamente. E' evidente dalla figura 4 che in micelle inverse che non contengono molecole proteiche, il potenziale di superficie diminuisce in maniera continua nella regione espansa dopo ciascun ciclo di compressione-espansione. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la concentrazione di superficie del tensioattivo diminuisce dopo ciascun ciclo. Il monostrato di AOT non è stabile alla interfaccia aria/acqua e ciascun ciclo di compressione-espansione provoca una diminuzione della quantità efficace delle molecole di tensioattivo a questa interfaccia (molto probabilmente il resto viene disperso nella soluzione in forma di micelle normali almeno alla prossimità dell'interfaccia dove la concentrazione efficace dovrebbe

essere più alta della concentrazione critica di formazione di micelle normali; tuttavia è possibile che molecole di tensioattivo separate si sciolgano in soluzione, o che microparticelle collassate si formino in alcune regioni del monostrato).

Le micelle inverse contenenti proteine non mostrano un simile comportamento cioè, una diminuzione continua del potenziale di superficie non è osservata. Le curve sono riprodotte durante ripetuti cicli di compressione-espansione (figura 3), e indicano in maniera definitiva che il complesso tensioattivo-proteina è più stabile alla interfaccia aria/acqua e, dal momento che i valori del potenziale di superficie per singola area di molecola vengono riprodotti, ciò implica che questo complesso costituisce l'unità di monostrato relativamente stabile.

Per evidenziare possibili cambi strutturali nelle molecole proteiche, si registrano gli spettri di dicroismo circolare (figura 5). Il primo fatto osservato è un certo cambio nello spettro CD del citocromo solubilizzato in micelle inverse rispetto ad una soluzione acquosa. Questo è evidenziato dall'effetto della matrice micellare, che è nota indurre alcuni cambi conformazionali nelle proteine (11). Tuttavia, è stato anche stabilito che tali cambi non implicano necessariamente la perdita di attività funzionale. Lo spettro della proteina nelle

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

pellicole LB, depositate con la presente tecnica, è simile in tutto rispetto alla proteina delle micelle inverse. Ciò significa che la conformazione del citocromo c della pellicola LB viene mantenuta come quella prima del deposito, in una soluzione micellare inversa. I valori di ellitticità molare di una pellicola LB vuota (senza proteina) depositata da una soluzione costituita originariamente di micelle inverse di AOT vuote, è utilizzata come linea basale per tutte le misure per escludere possibili effetti di adsorbimento, sebbene possano essere anche non significativi. Pertanto, gli spettri qui presentati sono indicativi solo della struttura proteina.

La curva ai raggi X, ottenuta dal campione, contenente 10 periodi, è presentata in figura 6. La posizione dei riflessi di Bragg corrisponde ad uno spazio di 55 Angstrom. Il 50% della ampiezza della riflessione corrisponde all'ordine di lunghezza di circa 400 Angstrom, cioè praticamente allo spessore totale della pellicola.

DISCUSSIONE

Da tutti i dati sopra presentati, poichè il citocromo c è una proteina solubile in acqua, è ragionevole suggerire che la struttura della unità elementare di una pellicola LB è quella proposta nella figura 7: un monostrato composto di molecole proteiche è incluso tra i gruppi delle teste di un monostrato di tensioattivo, del tipo bistrato o tipo sandwich delle membrane

*Ing. Barrano & Anardo
Roma s.p.a.*

biologiche. Pertanto, la lunghezza del periodo dovrebbe rappresentare lo spessore dei due monostrati di tensioattivo e di un monostrato di proteina.

La molecola di citocromo, come già menzionato, è circa una sfera con un diametro di 34 Angstrom. Affinchè il periodo sia uguale a 55 Angstrom, il bistrato di tensioattivo dovrebbe avere uno spessore di circa 20 Angstrom. La catena idrocarburica di molecole di AOT contiene 8 atomi di carbonio, ma solo 6 sono posti in una posizione lineare. Pertanto, se le molecole sono disposte verticalmente nelle pellicole LB, la lunghezza dei bistrati di tensioattivo nel periodo dovrebbe essere di circa 15 Angstrom, che dà ancora un po' di spazio per le dimensioni dei gruppi delle teste che dovrebbero essere anche considerati.

E' possibile proporre il seguente meccanismo di formazione di una pellicola LB di metalloproteina da soluzioni micellari inverse. Dopo che la soluzione di micelle inverse di AOT viene posta all'interfaccia aria/acqua, si autodistribuisce per ricoprire tutta la superficie dell'acqua. Il solvente evapora, e le micelle in contatto con l'acqua si riarrangiano per formare un monostrato di tensioattivo. Le molecole proteiche sono sotto all'interfaccia aria/acqua, ma associate con i gruppi delle teste del tensioattivo a mezzo di interazioni e di carica. All'inizio, vi è un monostrato di AOT con al disotto un

*Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.*

monostrato proteico attaccato in maniera casuale. E' importante avere veramente un monostrato della proteina con nessuna molecola proteica aggiuntiva nella miscela della sottofase, in quanto ciò aumenterebbe un adsorbimento irregolare delle molecole proteiche al monostrato. Pertanto, con l'architettura molecolare che risulta della presente pellicola, si ottiene il deposito degli strati proteici uno dopo l'altro nella variazione desiderata con altri elementi funzionali, tutto con un'alta riproducibilità e affidabilità.

Una ripetuta utilizzazione di cicli di compressione-espansione provoca una diminuzione della concentrazione molecolare di AOT alla superficie acquosa. Poichè la catena idrocarburica ha una piccola lunghezza, le molecole di AOT da sole non possono formare un monostrato stabile alla interfaccia. La concentrazione di superficie delle molecole di AOT diminuisce a causa della penetrazione delle molecole di tensioattivo nella miscela della sottofase durante la compressione, in una forma di micelle usuali. La riduzione della concentrazione in superficie di AOT continua fino al momento in cui la quantità di molecole di AOT è tale che l'addensamento delle molecole all'interfaccia aria/acqua corrisponde all'addensamento delle molecole proteiche sotto la superficie acquosa. Tale complesso monostrato risulta essere più stabile,

Ing. Barzani G. Barzani
Reina s.p.a.

ciò che è confermato dalla isoterma π -A riproducibile e dalle misure del potenziale di superficie.

L'addensamento della proteina nello strato è anche provato da un quadro di diffrazione ai raggi X ottenuto. Se le molecole proteiche nello stadio intermedio non sono addensate in maniera stretta o non sono ordinate, sarebbe impossibile ottenere una curva ai raggi X come quella mostrata nella figura 6. La formazione della struttura, in particolare del monostrato proteico tra i monostrati di tensioattivo, avviene plausibilmente durante la transizione del substrato attraverso il menisco secondo un meccanismo suggerito da Kato (13).

La procedura descritta nella formazione della pellicola LB proteica dà luogo ad una struttura altamente ordinata, rispetto alle pellicole di LB proteiche usuali, in cui la struttura secondaria della proteina è uguale alla struttura nella soluzione iniziale utilizzata per il deposito, cioè micelle inverse di aerosol OT. Il fatto che le molecole proteiche sono intercalate tra i gruppi delle teste del tensioattivo può avere un ruolo importante, in quanto potrebbe fornire uno scudo per la proteina contro fattori esterni non favorevoli. Possono essere previste parecchie applicazioni per tali molecole e pellicole ordinate di metalloproteine, specialmente nel campo della bioelettronica (14).

RIFERIMENTI

Ing. Barrano & Ranardo
Roma s.p.a.

1. K.B. Blodgett, I. Langmuir Phys.Rev. 51 (1937)964.
2. Yu. Lvov, V. Erokhin, S. Zaitsev Biol.Memb. 4(9) (1991) 1477-1513.
3. D. Tiede Biochim. Biophys. Acta 811 (1985) 357-379.
4. V. Erokhin, R. Kayushina, Yu. Lvov, L. Feigin Studia Biophysica 139 (1989) 120-129.
5. V. Erokhin, R. Kayushina, Yu. Lvov, L. Feigin Il Nuovo Cimento 12 D(1990)1253.
6. K. Martinek, A.V. Ievashov, N. L. Klyachko, I. V. Berezin Dokl. Acad. Nauk USSR 236 (1977) 920-923.
7. Z. Kozarac, A. Dhathathreyan, D. Mobius FEFS Lett 229 (1988) 372.
8. S.A. Darst, M. Ahlers, P.H. Meller, E. W. Kubalek, R. Blankenburg, H. O. Ribi, H. Ringsdorf, R. d. Kornberg Biophys.J.59(1991)387.
9. Y. Okahata, T. Tsuruta, K. Ijiko, O. Mergura-ku Langmuir 4 (1988) 1373.
10. L. Yu. Mogilevsky, A. T. Dembo, D. I. Svergun, L. a. Feigin Crystallographia 29 (1984) 587.
11. L.Magid, P. Walde, G. Zampiere, E. Battistel, Q. Pend, E. Trotta, M. Maestro, P.L. Luisi Colloids and Surfaces, 30 (1988) 193-207.
12. L. Strayer Biochemistry, Freeman W.H. and Co, New York, 1988, p. 470

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

13. T.Kato Jap.J.Appl. Phys. 27 (1988) 1358.

14. C. Nicolini, M. Adami, F. Antolini, F. Beltram, M. Sartore,

S. Vakula Physics World 5 (1992) 30-34.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscri. 171)

Talierno

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.



RIVENDICAZIONI

1. Una composizione comprendente una proteina solubilizzata in micelle inverse di un lipide in un solvente, detto lipide avente un gruppo alla testa con una affinità per detta proteina.

2. Una composizione secondo la rivendicazione 1, in cui detta proteina è del tipo instabile alla interfaccia acqua/aria.

3. Una pellicola sottile uniforme comprendente uno strato di una proteina, come definita nella rivendicazione 2 interposta tra strati di un lipide avente un gruppo di testa con affinità per detta proteina.

4. Uso di una composizione secondo la rivendicazione 1 o 2, per la preparazione, dietro rimozione di un solvente, di una pellicola sottile secondo la rivendicazione 3 alla interfaccia aria/acqua.

5. Uso secondo la rivendicazione 4, comprendente uno o più cicli di compressione-espansione.

Roma, 29 SET. 1993

p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale

Avanzata

Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

OC/gr.

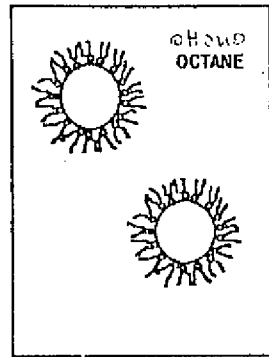


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscr. 171)

Talierno

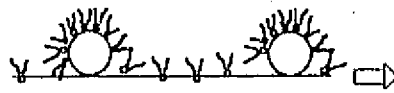
*Ing. Barzanò & Zanardo
Roma S.p.A.*

RM93 A 000659



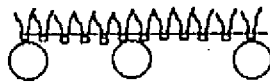
SOLUTION
soluzione

dopo
diffusione
AFTER
SPREADING



WATER
acqua

dopo
stabilizzazione
AFTER
STABILIZATION



WATER
acqua

dopo cicli di
compressione - espansione
AFTER COMPRESSION-
EXPANSION CYCLES



WATER
acqua

Fig. 1

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(No. disc. 171)

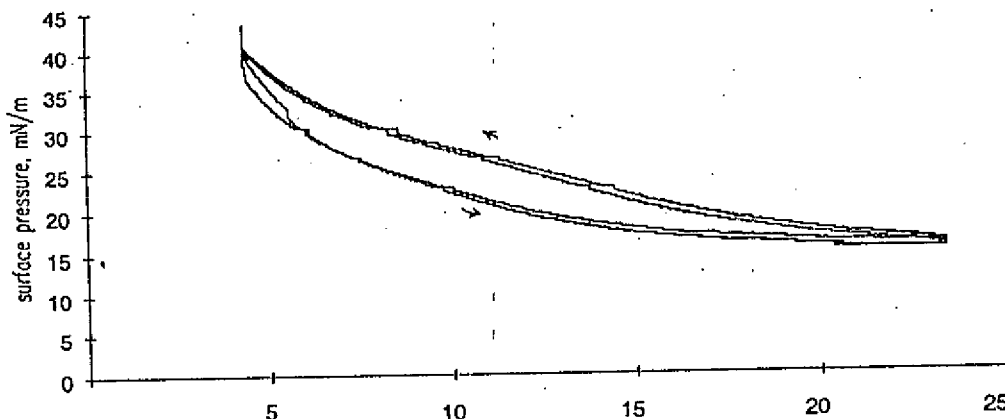
p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



RM93 A 000659

pressione di superficie mN/m

micelle inverse con cit. c, 30 μ l
reversed micelles with cyt c, 30 μ l



area per one cytochrome c molecule, nm²
area per una molecola di citocromo c, nm²

T. g. 2

p.p.a.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N. d'iscr. 171)

Talierno



RM93 A 000659

potenziale di superficie, mV

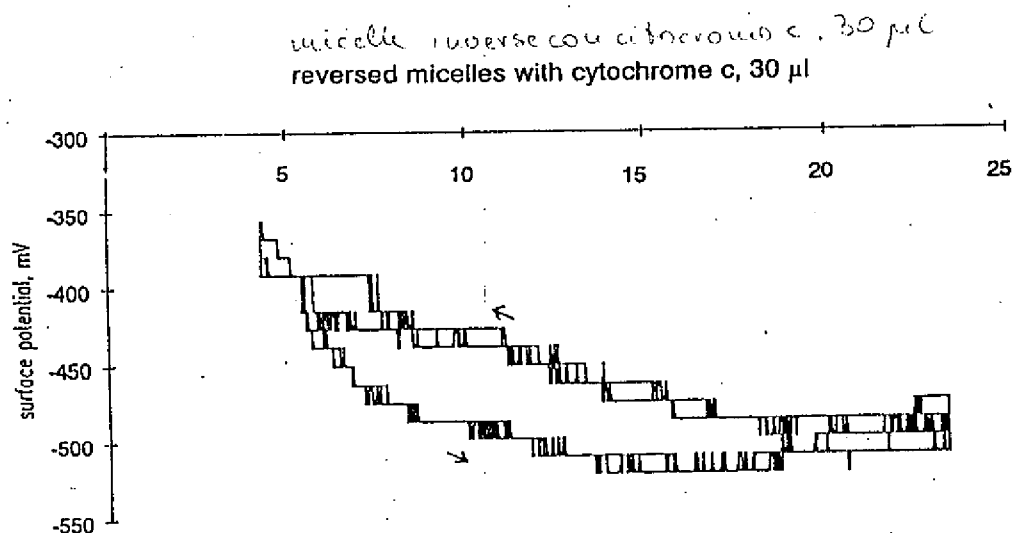


Fig. 3



**p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.**

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliervo
(N° d'iscr. 171)

italiano

RM93 A 000659

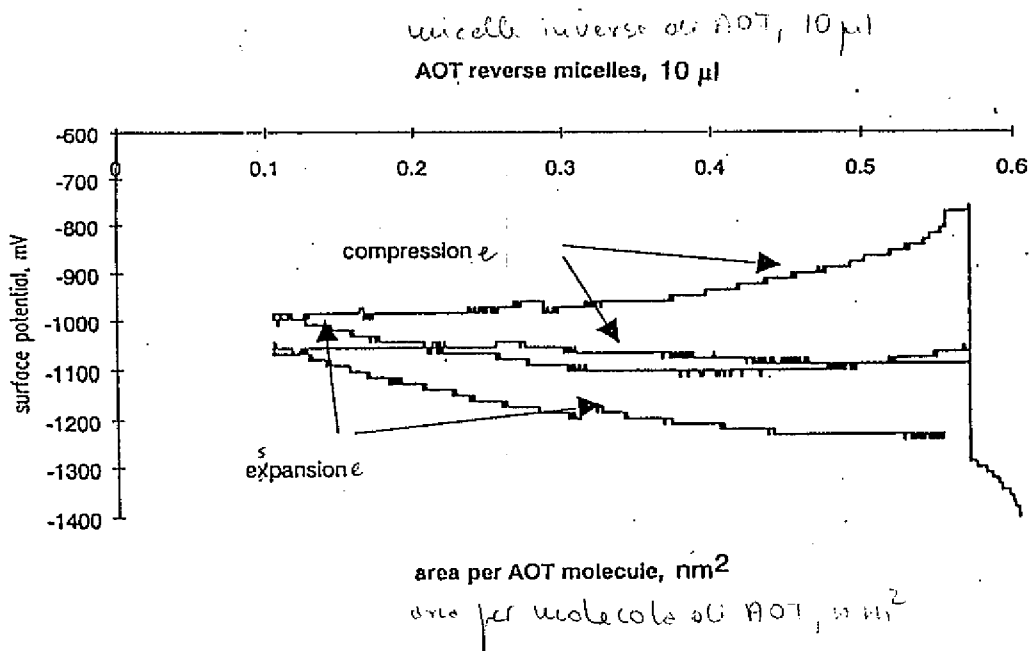


Fig. 4

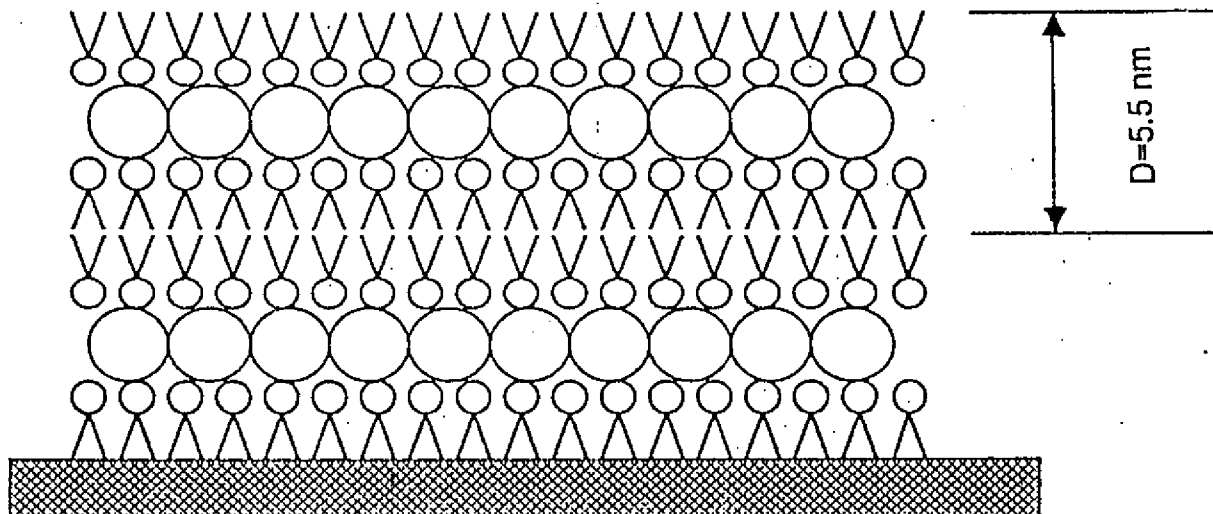
P.A.A.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliencio
(N° d'iscr. 171)

Taliencio

RM93 A 000659



p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

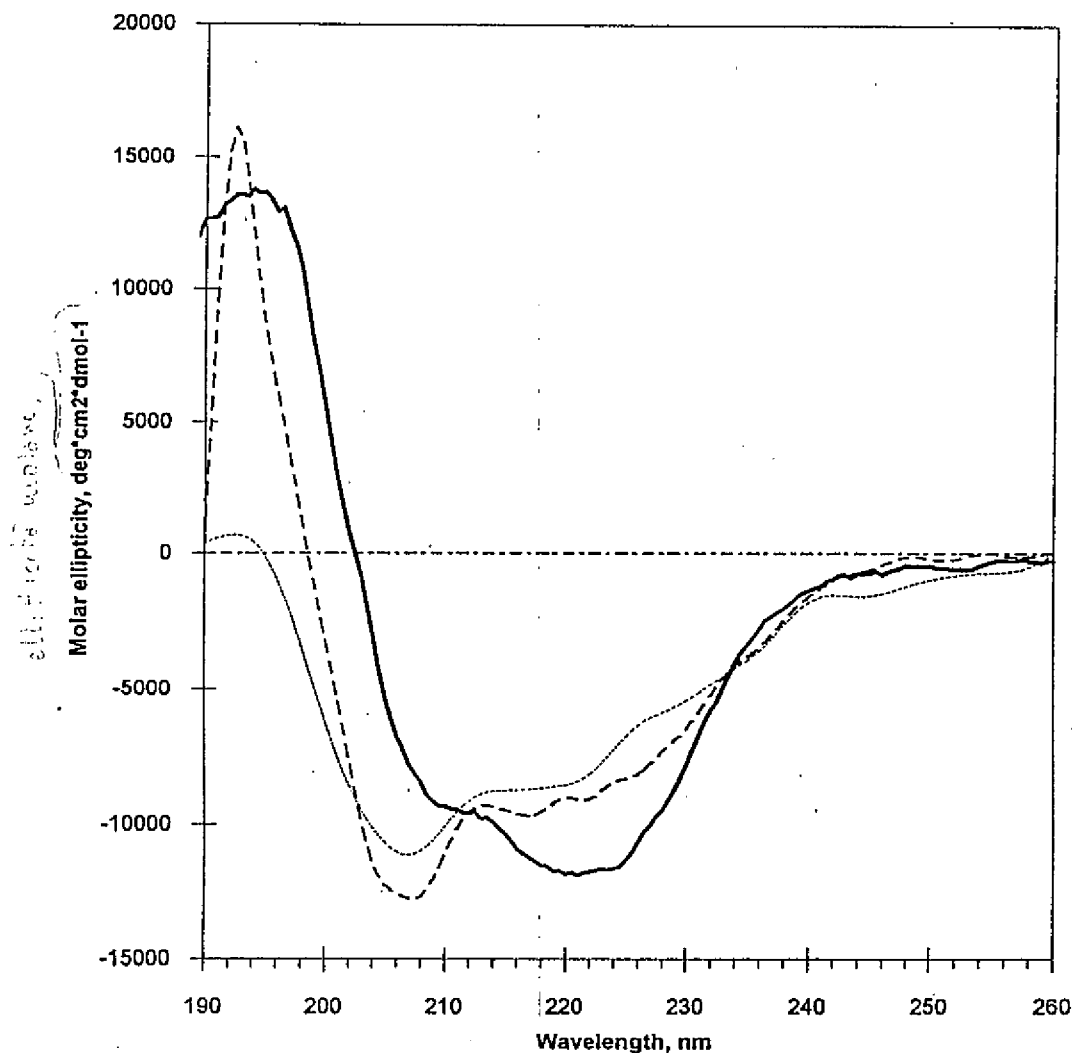
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliencio
(N° d'iscr. 171)

Taliencio

Fig. 7

Spettro del citocromo c
Spectra of cytochrome c

RM93 A 000659



— Cytochrome c in solution (phosphate buffer) cit. c in soluzione	- - - Cytochrome c in reversed micelles, hydration degree=8.6 cit. c in	 Langmuir-Blodgett film of cytochrome c, 9 monolayers	- . - . - Reversed micelles baseline
--	--	--	--------------------------------------

(cit. c in soluzione)

in micelle diverse grado di idratazione 8.6 Fig. 5

pellicole Langmuir-Blodgett di cit. c, 9 monostrati

linea basale delle micelle reverse



p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MINISTERO
per se e per gli altri
Antonio Taliencio
(N° d'iscr. 171)

Taliencio

RM93 A 000659

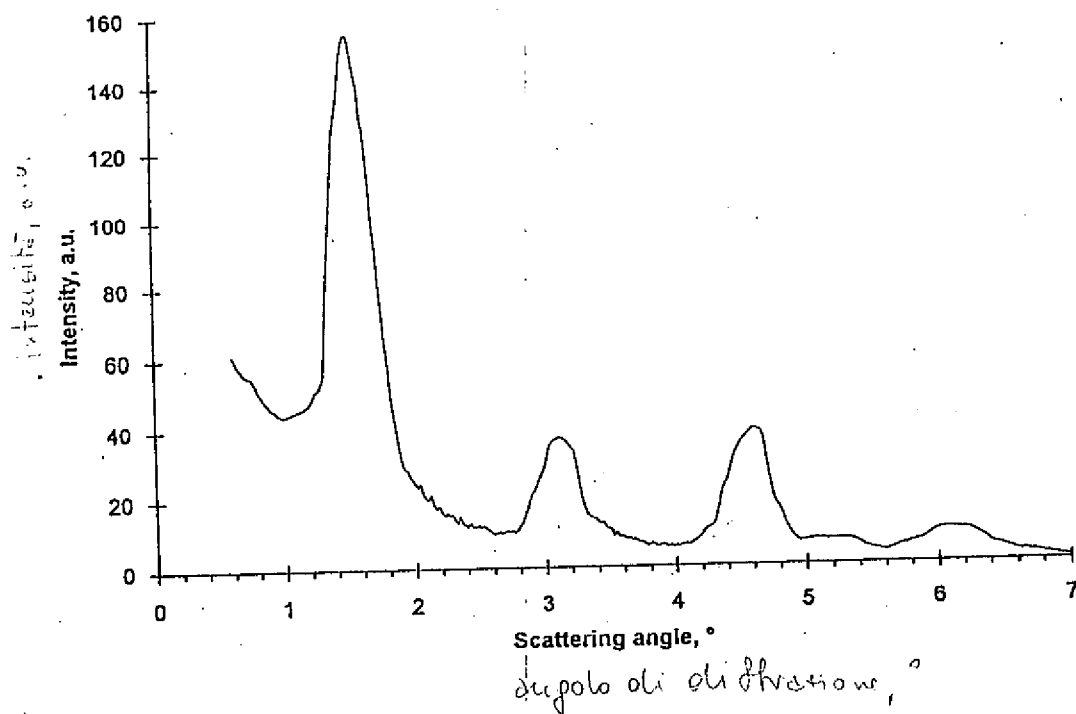


Fig. 6



p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscl. 171)

Talierno

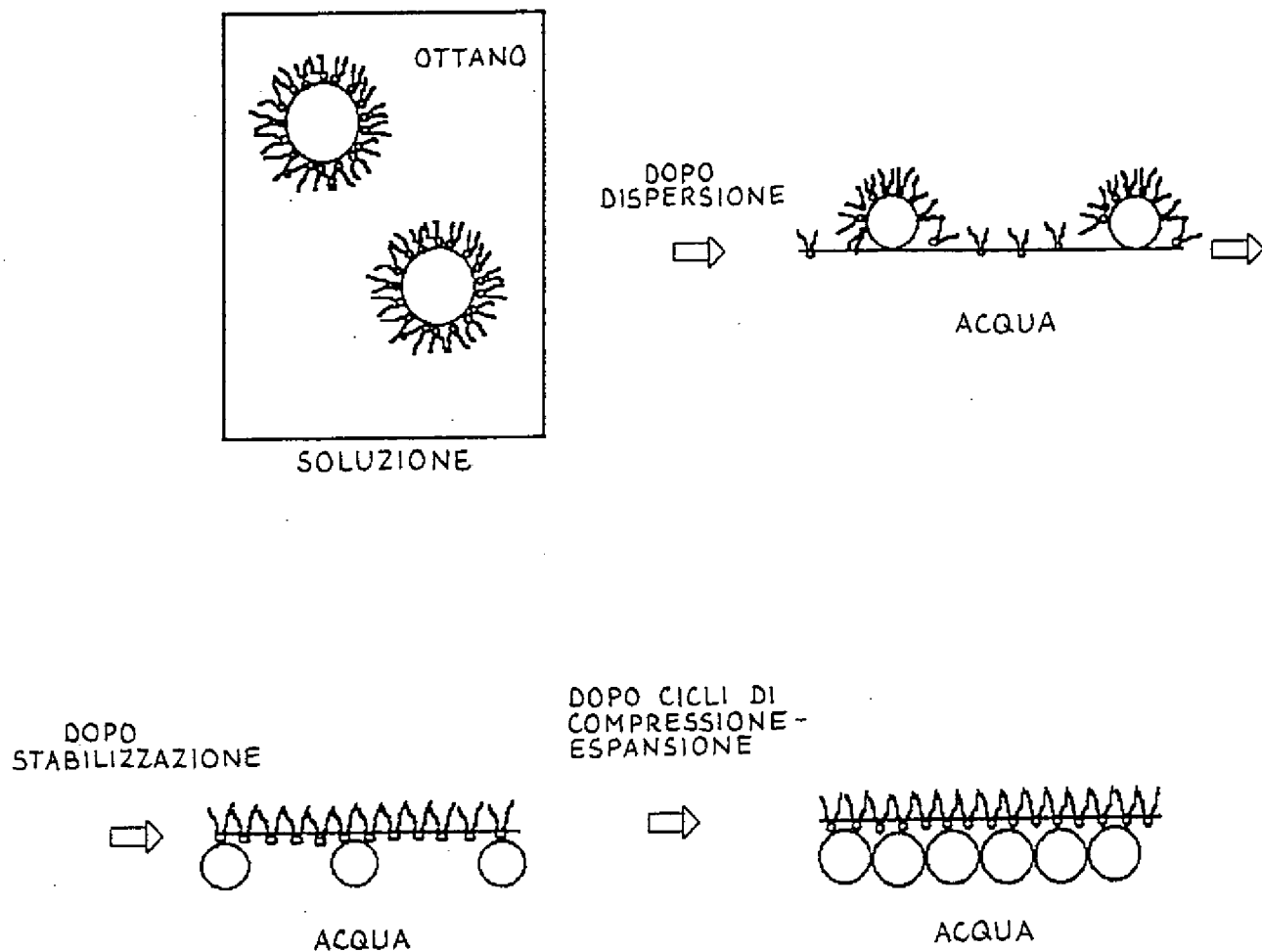


FIG. 1

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscr. 171)

Talierno

p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



2/7

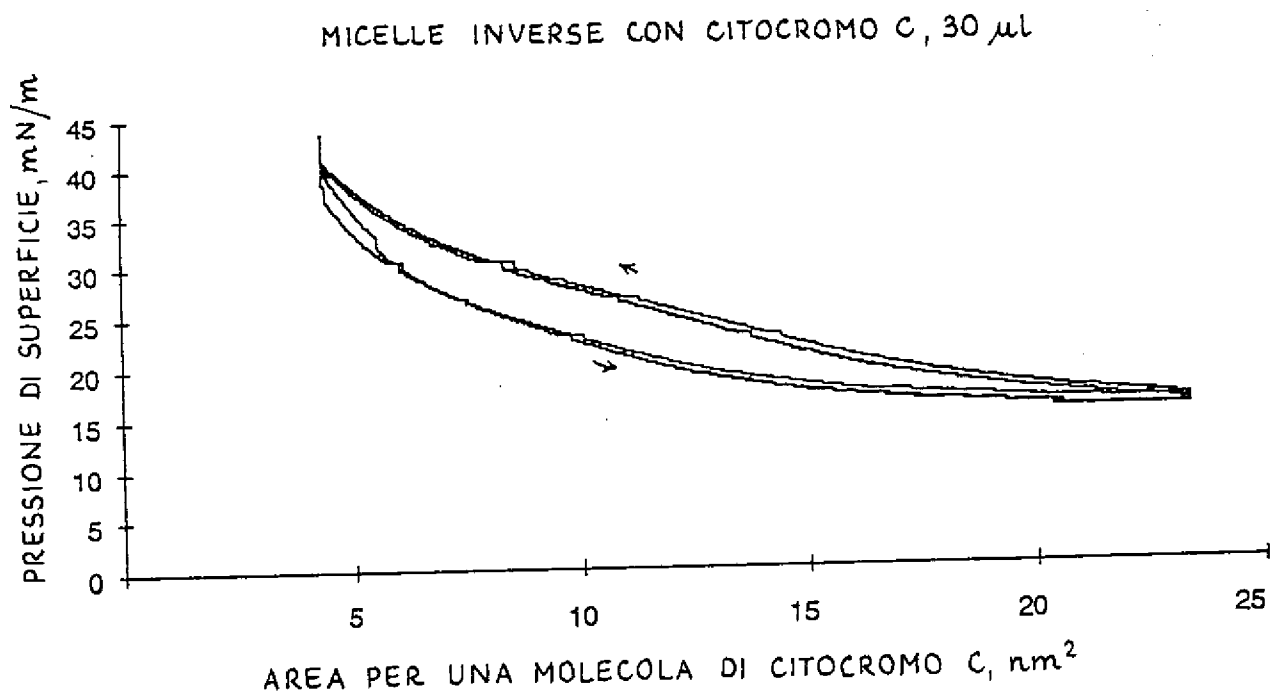
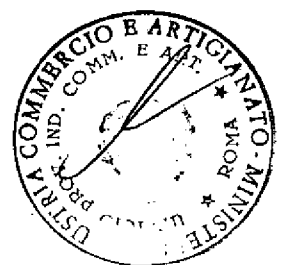


FIG. 2

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliencio
(N° d'iscr. 171)

Taliencio

p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



3/7

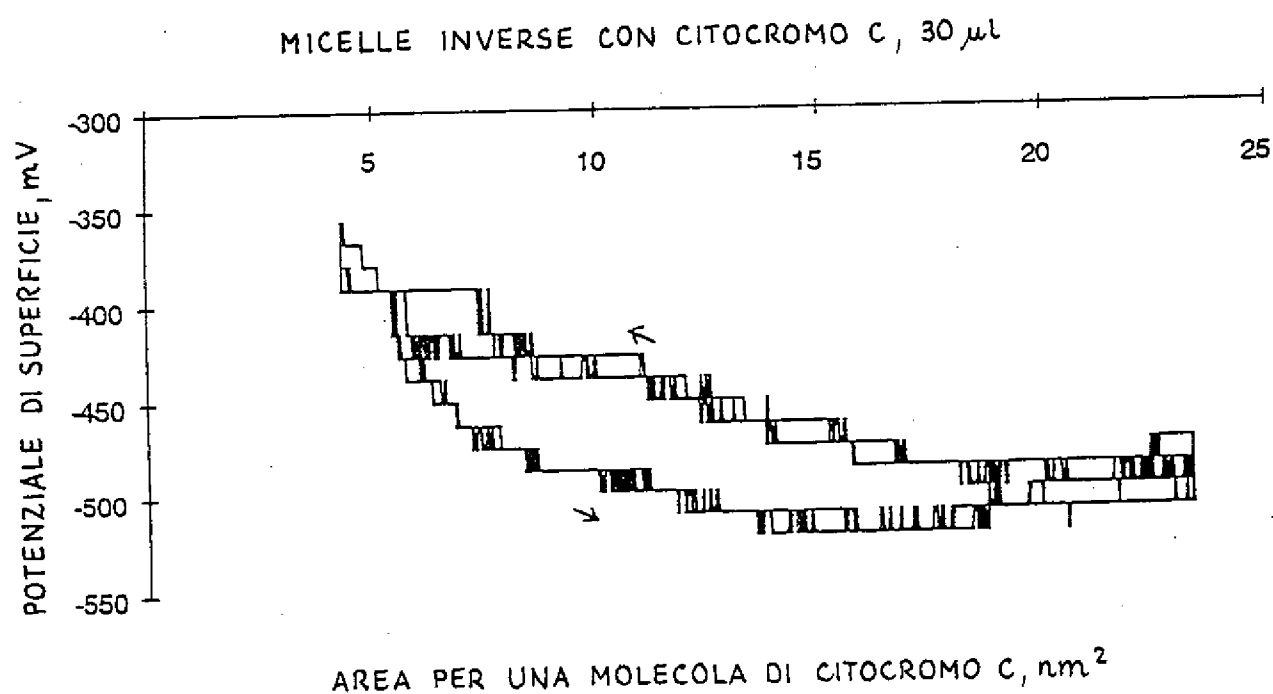


FIG. 3

p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscr. 171)

Talierno

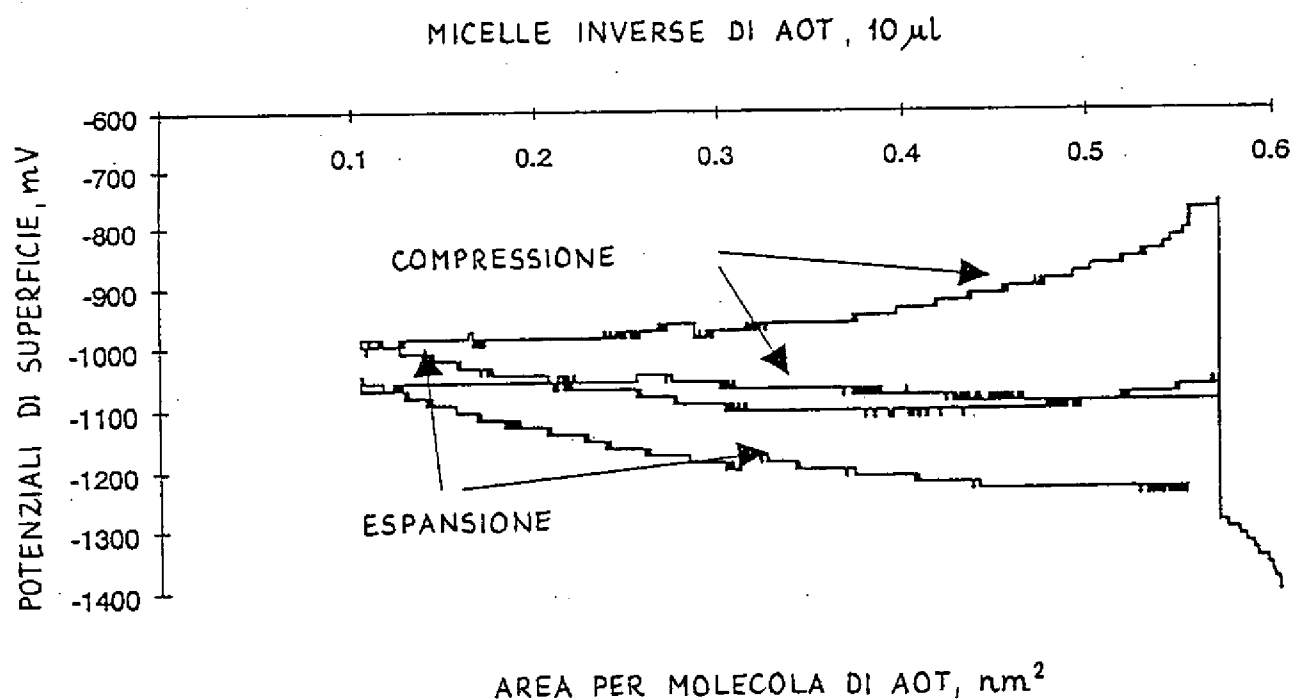


FIG. 4



p.p./ TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N. d'iscr. 171)

Talierno

5/7

SPETTRO DEL CITOCROMO C

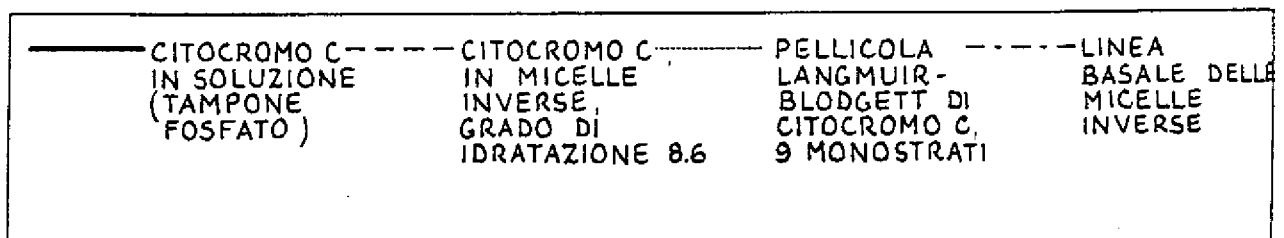
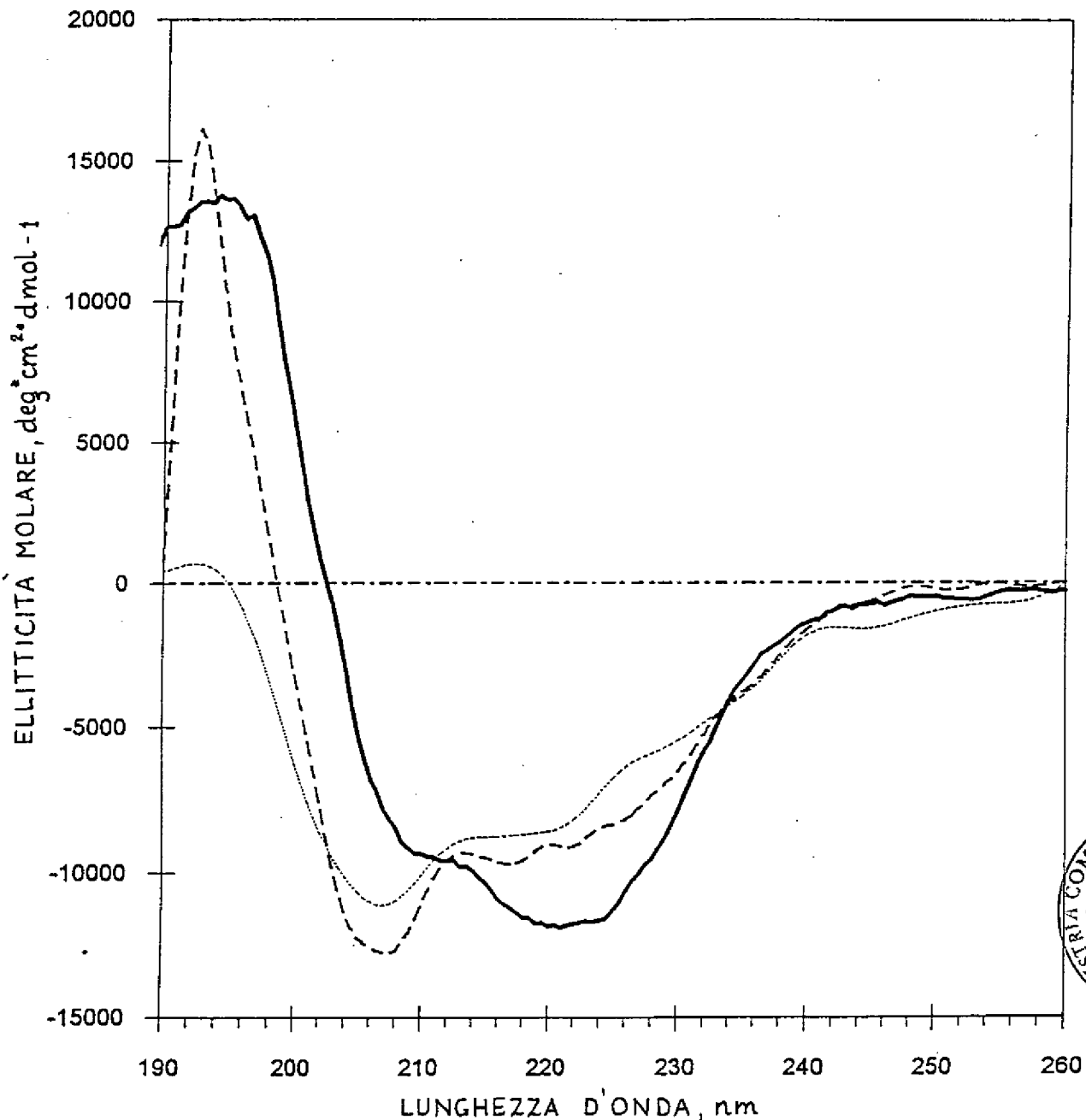


FIG. 5

p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliencio
(n° d'iscr. 171)

Taliencio

6/7

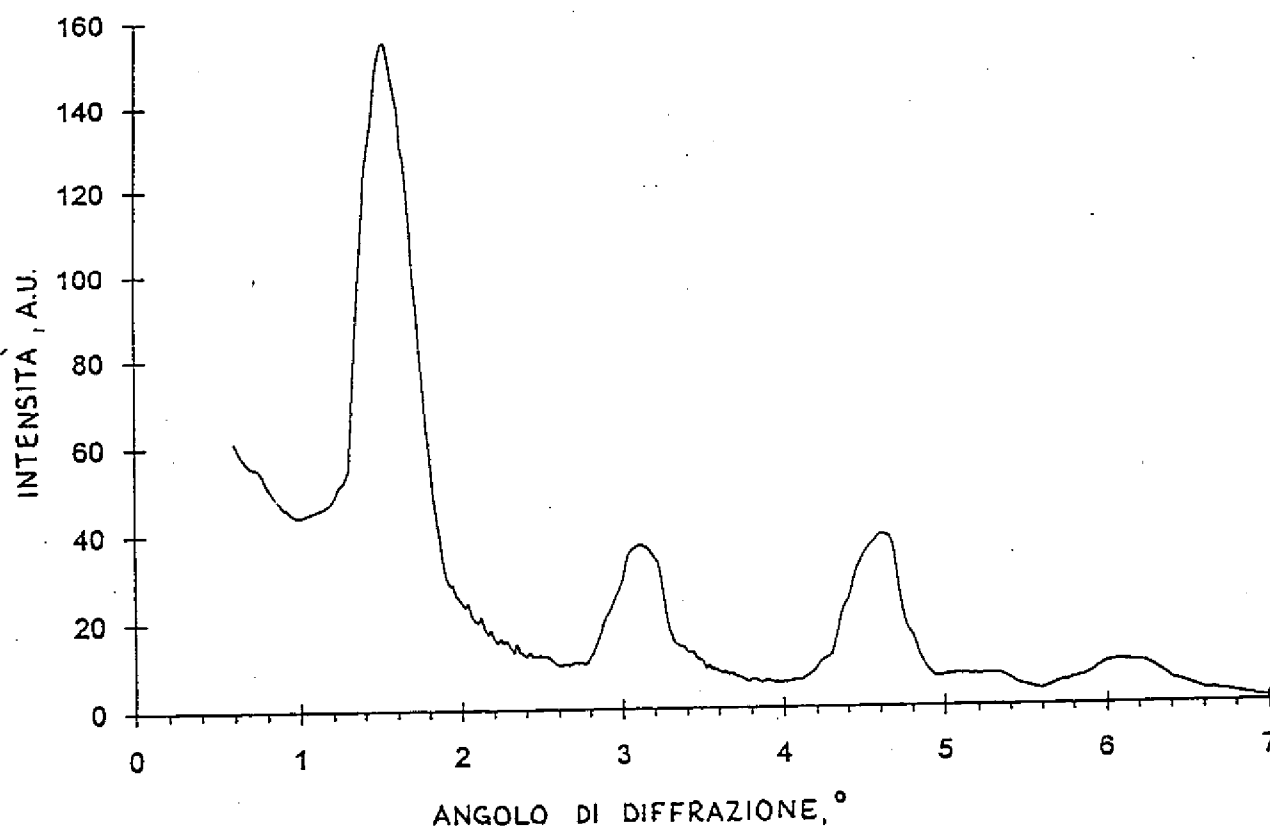


FIG. 6



p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(n° d'iscr. 174)

Talierno

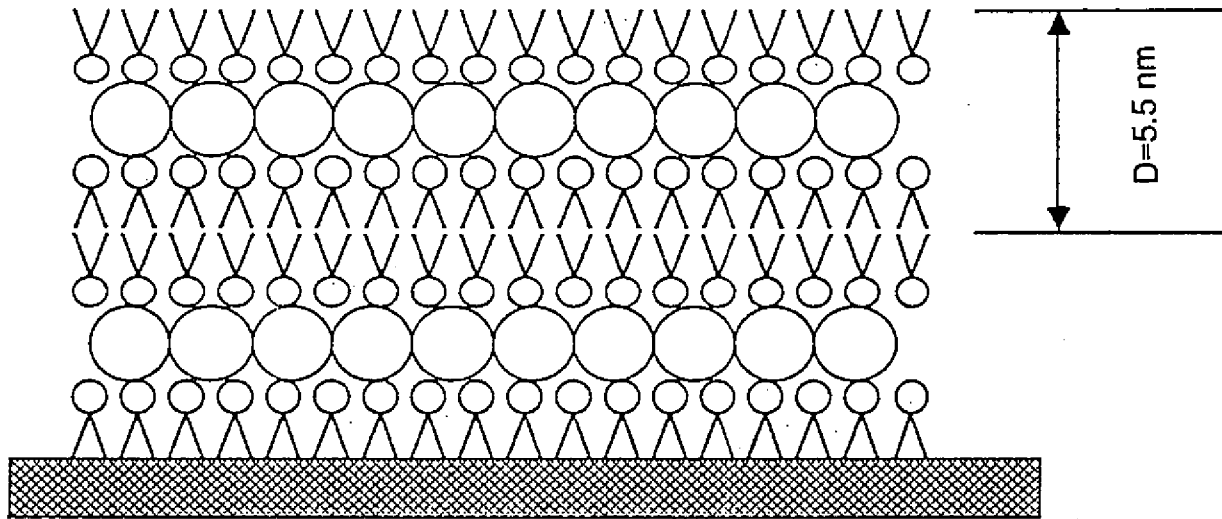


FIG. 7



p.p.: TECHNOBIOCHIP, Società di Ricerca Industriale Avanzata
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
N° d'iscr. 1711
Talierno