Biochimica Industriale 2019-2020

Lezione 6

Immobilizzazione

Abbiamo cercato fino ad ora dei metodi per la ricerca di enzimi utili per applicazioni industriali. Vedremo ora come utilizzare gli enzimi nei nostri processi.

L'immobilizzazione consiste nell'associare l'enzima ad una matrice o ad un altro tipo di supporto solido, in modo da confinarlo e ridurne la possibilità di movimento rispetto all'enzima in soluzione.

Una prima conseguenza dell'immobilizzazione è la facilità di recupero del biocatalizzatore dalla miscela di reazione.

Il fatto che il biocatalizzatore sia ristretto nella mobilità può avere conseguenze sulle sue caratteristiche catalitiche.

Spesso l'immobilizzazione migliora la stabilità della proteina. L'aumento di stabilità deriva dalla ridotta mobilità dell'enzima.

L'immobilizzazione può cambiare l'attività o la specificità dell'enzima. La ridotta mobilità limita i riarrangiamenti conformazionali e può aumentare la specificità dell'enzima. Non è una regola generale però, perché si sono osservati casi in cui l'enzima immobilizzato risulta molto meno attivo. Dipende dall'enzima che si immobilizza.

L'immobilizzazione può avere degli effetti positivi sui costi, perché l'enzima può essere facilmente recuperato e riutilizzato. Bisogna valutare sempre se il costo affrontato per immobilizzare l'enzima ha un ritorno effettivo in termini di riutilizzabilità. Molti enzimi industriali sono poco costosi, ed il costo associato ai processi di immobilizzazione potrebbe non essere giustificato.

Nell'uso di enzimi come biosensori, l'immobilizzazione può permettere di orientare l'enzima, che potrebbe essere molto utile in questi processi.

Vantaggi dell'immobilizzazione (da articolo di DiCosimo, come detto a lezione)

- L'enzima immobilizzato può essere usato in diversi protocolli di biocatalisi, potendo essere riutilizzato in più cicli del processo
- L'enzima può essere più stabile rispetto alla forma solubile
- Si possono ottenere miglioramenti in alcune caratteristiche di interesse
- È possibile immobilizzare sullo stesso supporto enzimi diversi che catalizzano una reazione in più step.

Questi vantaggi ovviamente dipendono dall'enzima con cui si lavora. In genere bisogna provare per capire se l'immobilizzazione ha effettivamente dei vantaggi nella nostra reazione

Svantaggi

• Si può osservare una perdita di attività.

L'immobilizzazione dell'enzima limita la mobilità, e questo in alcuni enzimi può comprometterne la funzione, ad esempio l'accesso del substrato al sito catalitico.

• Possono cambiare le proprietà cinetiche in modo negativo

Va sempre misurata l'efficienza dell'enzima immobilizzato

• Il processo di immobilizzazione ha dei costi che vanno valutati e giustificati.

Dai dati della review precedentemente citata, si vede che circa il 20% degli enzimi utilizzati industrialmente sono immobilizzati.

Tra i più importanti troviamo:

Glucosio isomerasi

Usato per produrre dolcificanti per l'industria alimentare

Utilizzata per convertire i trigliceridi, nella produzione di biodiesel. Tra le lipasi più usate c'è la lipasi da Candida antarctica immobilizzata su un supporto di resina acrilica, prodotta da Novozymes, che è l'enzima più usato per la produzione di biodiesel.

Importante leggere articoli sull'immobilizzazione consigliati dalla prof.

Tecniche di immobilizzazione

Ci sono diversi modi per immobilizzare un enzima.

Associazione dell'enzima ad un supporto solido.

Ci sono anche qui vari metodi:

Adsorbimento

Si sfrutta la formazione di legami a idrogeno o interazioni idrofobiche tra l'enzima ed il carrier

- Legame ionico, basati sulle cariche
- Legame covalente

Cross-linking

Si legano gli enzimi tra loro mediante legami covalenti

Intrappolamento

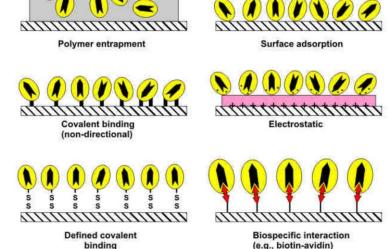
L'enzima non è direttamente associato ad un supporto ma è confinato in una matrice.

È importante sempre valutare l'orientamento dell'enzima immobilizzato. Le diverse tecniche di immobilizzazione non sempre permettono di regolare l'orientamento.

Nel legame covalente definito l'enzima viene modificato in modo che sia possibile decidere quale parte della molecola vada ad interagire con il supporto.

Quando parliamo di supporto, ci riferiamo ad un vasto insieme di materiali

Si devono quindi valutare le proprietà



di questi supporti per scegliere quello che più si addice alle condizioni specifiche del nostro processo.

Fondamentali da valutare sono il costo, la disponibilità nell'approvvigionamento e la stabilità nelle condizioni operative.

Caratteristiche importanti risultano anche:

L'area di superficie del supporto

Supporti porosi hanno una maggior superficie rispetto a supporti completamente solidi.

Nanosfere hanno un alto rapporto area/superficie e sono utili per massimizzare la quantità di enzima per volume di solvente. La porosità e l'interconnessione tra i pori del supporto sono parametri da attenzionare per permettere una adeguata diffusione dei substrati di reazione e relativi prodotti (trasferimenti di massa).

• Cariche nella superficie del supporto

È importante valutare le cariche sul supporto, per poter legare al meglio l'enzima di interesse.

Nella produzione di biodiesel in uno step della reazione si produce glicerolo, questo aderisce alla matrice dove l'enzima è immobilizzato, interferendo con l'attività di quest'ultimo.

Di cosa sono fatti i carrier

Andremo a studiare maggiormente i carrier insolubili. Li differenziamo tra carrier organici e carrier inorganici.

Tra i carrier inorganici troviamo:

- Silice
- Farina di diatomee
- Idrossiapatite
- Vetro poroso

La scelta del carrier da utilizzare dipende sia dal costo del carrier sia dalle performance richieste.

Tra i carrier organici sintetici:

- Poliacrilamide
- Resine a scambio ionico
- Resine epossidiche

Tra i carrier organici naturali:

molti polisaccaridi:

- Chitina
- Chitosan

Proteine come:

Collagene

Questi carrier di origine naturale hanno subito una forte spinta nella ricerca, in seguito all'apprezzamento di processi sostenibili e rinnovabili.

L'uso di polimeri di origine naturale permette di realizzare processi di biocatalisi altamente sostenibili.

Supporti

Le resine cromatografiche sono sicuramente interessanti, così come le gelatine

Adsorbimento

Nell'adsorbimento si formano interazioni deboli tra l'enzima ed il suo supporto. Queste interazioni possono essere facilitate da molecole che modificano la superficie del supporto.

Le interazioni sono di solito interazioni deboli. Il vantaggio è che l'enzima non viene danneggiato dall'interazione col supporto, quindi non ci si aspettano di solito alterazioni significative dell'attività enzimatica.

Dato che l'interazione è appunto debole, può succedere che l'enzima si stacchi dal supporto durante il processo di reazione e vada in soluzione. Questo può dare problemi nel momento in cui l'obiettivo è ottenere un prodotto puro, privo dell'enzima, oppure riciclare l'enzima per più cicli. Tra gli esempi più interessanti di enzimi immobilizzati per adsorbimento troviamo la lipasi da *Candida antarctica* adsorbita su resina acrilica prodotta da Novozymes ed utilizzata nella produzione di biodiesel.

Interazioni ioniche

Sono interazioni forti tra supporto ed enzima. Di conseguenza il biocatalizzatore così immobilizzato è sicuramente più stabile.

Un esempio è una lipasi di *Rhizomucor miehei* immobilizzata su resina a scambio anionico macroporosa, prodotta e venduta da Novozymes.

Interazioni covalenti

Si formano legami covalenti tra l'enzima e il suo supporto; questo è un modo di associazione più robusto dei precedenti.

Perché sia possibile utilizzare questo metodo è necessario che l'enzima abbia esposti sulla superficie dei gruppi funzionali che possano partecipare alla formazione del legame covalente. Nelle catene laterali degli amminoacidi troviamo gruppi utili, quali:

- Gruppi amminici
- Gruppi carbossilici
- Gruppi sulfidrilici
- Gruppi idrossilici
- Gruppi imidazolici
- Gruppi fenolici
- Gruppi tiolici

e altri gruppi.

Quando si genera un legame covalente ci sono sia vantaggi che svantaggi. L'associazione tra enzima e supporto è forte, quindi non si verifica il distacco dell'enzima dal supporto. Lo svantaggio è che la formazione del legame può creare alterazioni strutturali nell'enzima, che ne alterano la capacità catalitica.

I metodi per formare il legame sono diversi, tra questi l'uso di glutaraldeide.

Il rapporto tra enzima e supporto può avere caratteristiche diverse. Una caratteristica importante è l'orientazione dell'enzima rispetto al supporto. Possiamo utilizzare metodi che permettono di regolare l'orientamento dell'enzima, ad esempio usando gruppi tiolici possiamo creare ponti disolfuro tra l'enzima ed il supporto. Dobbiamo accertarci che questi gruppi siano presenti nella regione della proteina che vogliamo che aderisca al supporto. Se questi gruppi non sono presenti possiamo inserirli con metodi di ingegneria proteica.

Incapsulamento

Consiste nell'inglobare l'enzima all'interno, ad esempio, di una membrana di nitrocellulosa, nylon o altri materiali.

Intrappolamento

Consiste nel creare ad esempio una matrice o un gel, con dei compartimenti in cui l'enzima viene incluso. Alcuni materiali per realizzare la matrice sono poliacrilammide, triacetato di cellulosa, l'alginato di calcio, la gelatina, i carragenani ed altri.

L'alginato di calcio è molto usato per formare questi gel, perché la procedura è semplice da eseguire ed economica. È adatto a molecole di dimensioni relativamente grandi, perché i pori sono relativamente grandi (dipende dalla concentrazione di alginato).

È possibile intrappolare gli enzimi in *bioreattori a membrana*. La membrana è semipermeabile e permette il passaggio di substrati e prodotti, ma non dell'enzima, che è intrappolato all'interno della membrana.

Un esempio interessante di questo metodo è la formazione dei GOS (*pre biotics galacto oligosaccharides*) per mezzo dell'enzima beta-galattosidasi ricavato da *Bacillus circulans*, che è stata realizzata proprio in un reattore a membrana.

Cross-Linked Enzymes Aggregates (CLEA)

La tecnica consiste nel legare in maniera covalente gli enzimi tra loro. Non c'è un supporto. Questi aggregati possono essere realizzati con enzimi in soluzione, a cui viene aggiunta glutaraldeide per realizzare il crosslinking. Questi enzimi sono molto stabili. I CLEA possono essere usati in combinazione con altri metodi di immobilizzazione.

Stabilità

La stabilità è uno degli elementi chiave perché un enzima sia interessante dal punto di vista applicativo. Spesso l'enzima non è abbastanza stabile nelle condizioni di reazione. Si possono utilizzare varie strategie per aumentare la stabilità degli enzimi:

• Medium engineering

Si adattano le condizioni di reazioni all'enzima

- Ingegneria proteica
- Immobilizzazione

Cosa intendiamo per stabilità? (leggere articolo di bommarius, stabilizing biocatalist)

• Stabilità Termodinamica

cioè la temperatura di melting (Tm)

• Stabilità cinetica

Emivita dell'enzima

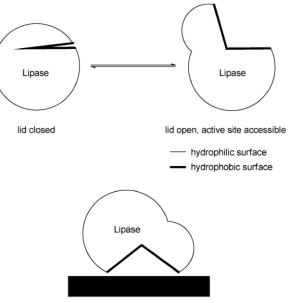
• Stabilità di processo

Valuta la resistenza (in termini di tempo) del biocatalizzatore nelle condizioni di reazione.

In alcuni casi l'immobilizzazione ha portato ad ultimi risultati. In ogni caso è necessario provare per comprendere gli effetti dell'immobilizzazione o di altre metodiche sull'enzima di interesse.

Si è inoltre cercato di modulare le proprietà dell'enzima.

Le lipasi sono enzimi particolari. Funzionano su substrati insolubili, quindi idrofobici, che in soluzione formano delle micelle. La maggior parte delle lipasi ha una struttura principale ed una parte mobile, detta lid (coperchio). L'enzima è inattivo quando il lid è chiuso, ed è attivo quando il lid è aperto. Nella forma attiva l'enzima aderisce alle micelle ed esercita la sua attività idrolitica. Si è visto che quando la lipasi veniva immobilizzata su supporti idrofobici, l'enzima si immobilizzava con il lid aperto, quindi come enzima attivo.



Solubilità

Si è visto che l'immobilizzazione può aumentare la solubilità. Quando l'enzima si mette in sistemi anidri, dove l'enzima non è solubile e ci sono condizioni sfavorevoli per la solubilità, l'enzima tende a precipitare, o ad aggregare (che è diverso).

Se l'enzima è immobilizzato, non può precipitare.

Prevenzione dell'inibizione

A volte gli enzimi possono essere inibiti da prodotti che si trovano nella miscela di reazione. Nel caso in cui un sito allosterico di inibizione si trovi nella zona dell'enzima che viene immobilizzata, il sito non sarà più accessibile all'inibitore, e quindi non risentirà della sua presenza.

Alterazione della struttura dell'enzima

Si è visto che immobilizzando l'enzima attraverso più legami con il supporto (Multipoint covalently Immobilized Enzyme) tende a preservarne la struttura.

Enzimi oligomerici

Quando enzimi formati da più subunità operano in condizioni di reazione non ottimali tendono a dissociarsi. L'immobilizzazione delle subunità l'una vicino all'altra evita la dissociazione del complesso.

Reazioni multi-enzimatiche

Possiamo anche immobilizzare in cluster degli enzimi che operano in sequenza, per effettuare reazioni complesse a più passaggi

Corpi di inclusione

I corpi di inclusione sono aggregati proteici che si possono formare in molte condizioni. Un caso frequente è l'espressione di proteine ricombinanti. La produzione di queste proteine, espresse in altre concentrazioni, può saturare il sistema di folding della cellula, per cui la proteina aggrega.

L'aggregato di enzimi è da certi punti di vista simile ai CLEA precedentemente descritti, dove le proteine in soluzione vengono crosslinkate tra loro.

Quando delle proteine aggregano, vuol dire che c'è qualcosa che non va nella loro struttura nativa. Tipicamente le proteine aggregano quando mostrano zone idrofobiche esposte che tendono ad aggregarsi tra loro.

Si pensava che le proteine aggregate fossero denaturate, e quindi inattive. Si è visto invece che queste proteine possono mantenere una parte della loro struttura nativa, con relativa attività. Si è pensato di usare i corpi di inclusione direttamente come catalizzatori, ma si è visto poi che nelle condizioni di reazione l'aggregato può dissociarsi. Il concetto però stato mantenuto, cercando di stabilizzare questi corpi di inclusione.

Questo approccio è quello che si chiama *Moduli di Precipitazione* (pull-down module). In questa tecnica l'enzima viene modificato, aggiungendo un modulo che facilita l'aggregazione in maniera stabile e predicibile. Gli aggregati così prodotti sono già stabili, ma possono essere ulteriormente stabilizzati ed immobilizzati con le tecniche precedentemente descritte, spesso con crosslinking.

Corpi di inclusione come biomateriali

I corpi di inclusione possono anche essere utilizzati come scaffold per l'ingegneria tissutale, utilizzando peptidi e proteine che si assemblano a formare un supporto che guida la differenziazione e la crescita cellulare.