

***CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA
SOSTENIBILITÀ***



***BIOCHIMICA APPLICATA
(6 CFU)***

LEZIONE 13

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

Applicazioni degli Enzimi

Vantaggi

- Specificità
- Sottoprodotti limitati o nulli
- rese di reazione ottimali anche in condizioni blande
- Facilità di separazione del prodotto
- Facilità di manipolazione
- In alcuni casi miglioramento delle caratteristiche (attività e stabilità)

Problemi

- costi di preparazione elevati
- instabilità intrinseca degli enzimi
- inibizione da parte di intermedi di reazione
- problemi connessi a substrati e/o prodotti poco solubili in acqua
- Difficoltà di recupero dopo la reazione

Enzimi Immobilizzati (EI)

- Enzima fisicamente **CONFINATO**: i suoi movimenti sono stati ristretti, completamente o parzialmente, ad una limitata regione di spazio
- Enzima legato ad una matrice insolubile che rende possibile:
 1. Conservarne l'attività
 2. Recuperarlo e separarlo dall'ambiente di reazione
 3. Riutilizzarlo più volte
 4. Utilizzarlo in continuo

Vantaggi degli enzimi immobilizzati

- **Usò multiplo e ripetitivo dello stesso enzima**
- **Possibilità di recupero, riutilizzo e di allontanamento dopo la reazione**
- **Possibilità di bloccare rapidamente e in qualsiasi momento la reazione**
- **Possibilità di impiego in processi continui o multi-step**

Vantaggi degli enzimi immobilizzati

- Condizioni operative più favorevoli per la reazione
- Purezza del prodotto finale non contaminato dall'enzima e sua formazione controllata
- Aumento della stabilità
- In applicazioni mediche, l'EI non entra in circolo nel paziente

Requisiti di una immobilizzazione enzimatica

- Enzima stabile nelle condizioni di reazione
- Sito attivo non coinvolto, ma protetto
- Lavaggio non deve rimuovere E
- Stabilità meccanica del supporto
- Favorire legame al Substrato
- Diminuzione di inibizione da Prodotto
- Spostare pH a condizioni più favorevoli
- Eliminare contaminazione batterica
- Non indurre risposta immunitaria

Fattori determinanti l'economicità del processo

Attività specifica del catalizzatore

- Caratteristiche della metodologia di immobilizzazione
- Quantità di enzima caricata
- Attività specifica della preparazione enzimatica

Stabilità operativa del catalizzatore

- Stabilità dell'enzima
- Quantità di enzima rilasciato
- Resistenza del supporto

Possibilità di rigenerare il catalizzatore

- Numero di volte che il catalizzatore può essere rigenerato
- Complessità della procedura

Fattori determinanti l'economicità del processo

Pulizia

- Frequenza di pulizia richiesta
- Complessità della pulizia

Upstream processing

- Ridurre le contaminazioni batteriche
- Rimuovere inibitori (metalli pesanti, sali, etc.)
- Aggiungere cofattori o attivatori richiesti dall'enzima

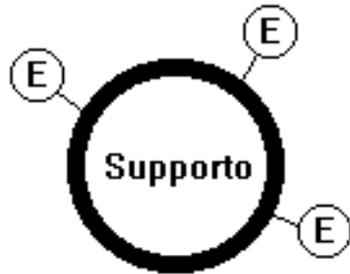
Enzimi Immobilizzati

1. Enzimi modificati in forme non solubili in acqua

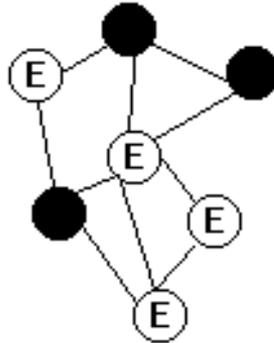
2. Enzimi solubili confinati in membrane selettivamente permeabili

3. Enzimi (solubili) a mobilità ridotta per legame/interazione con altre macromolecole (che vengono definite il 'supporto')

I supporti per la preparazione di enzimi immobilizzati (S.E.I.)



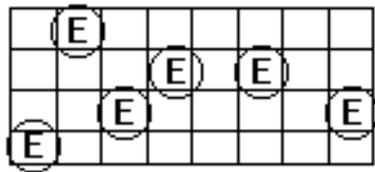
Legame covalente



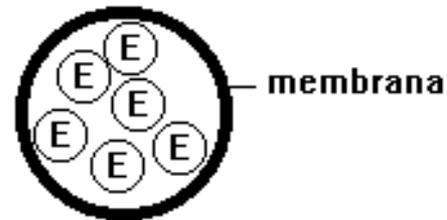
Reticolazione



Adsorbimento



Intrappolamento su gel



Incapsulamento

I supporti per la preparazione di enzimi immobilizzati (S.E.I.)

Il supporto ed il metodo di immobilizzazione sono tra loro connessi; spesso, il supporto viene sintetizzato durante la stessa reazione di immobilizzazione dell'enzima.

Una proteina può essere immobilizzata in tanti modi differenti:

- Intrappolamento in gel polimerici o in microcapsule
- Adsorbimenti forti su materiali insolubili (argille, amidi, resine, etc.)
- Reticolazione con reagenti bifunzionali
- Derivatizzazione mediante addizioni di polimeri a lunga catena
- Attacco covalente a matrici insolubili
- incapsulamento in una Membrana Semi-Permeabile

Non esiste un **carrier** ideale per la immobilizzazione degli enzimi, ma la scelta dipende dall'impiego cui è destinato il sistema ad enzima immobilizzato, dalle rese di immobilizzazione e dalle proprietà finali dei materiali aventi attività biologica.

Inoltre vanno rispettate 4 caratteristiche fondamentali:

- Matrice stabile
 - Matrice compatibile con la trasformazione
 - Matrice compatibile con le caratteristiche dell'enzima
 - Matrice compatibile in termini di costi per unità di prodotto
- Si deve ricordare che l'immobilizzazione si aggiunge al costo del catalizzatore che deve essere recuperato dall'uso più prolungato del bioreattore.

Types of Materials Used as Supports for Immobilization of Enzymes

Organic Polymers

Polystyrene

Chromosorb

Nylon

Teflon membranes

Polyazetidine

Phenol-formaldehyde resins

Acrylic copolymers (acrylamides. acrylates)

Polyurethane

Biopolymers

Cellulose

Polydextrans

Agarose

Collagen

Chitin

Bone char

Hair

Alginates

Inorganic polymers

Glass

Silica

Stainless steel

Metal oxides (ceramics)

Diatomaceous earth (celite)

Sand

Kaolinite clay

Schema delle tecniche per l'immobilizzazione di enzimi.

1) Immobilizzazioni fisiche:

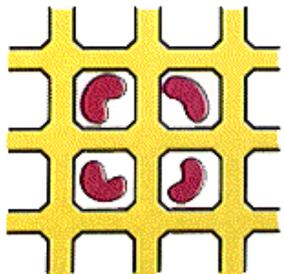
a) Intrappolamento su gel e incapsulamento: le molecole di enzima vengono a trovarsi all'interno di un gel o di una membrana polimerica. Il polimero deve essere impermeabile all'enzima in modo da impedirne la fuoriuscita, ma allo stesso tempo deve permettere il passaggio dei substrati.

b) Adsorbimento: l'enzima è trattenuto sul supporto da legami elettrostatici (ionici, dipolari) e da legami idrogeno.

2) Immobilizzazioni chimiche:

a) Reticolazione tra l'enzima e macromolecole naturali o sintetiche tramite reagenti bifunzionali.

b) Legame covalente tra l'enzima e il supporto insolubile direttamente o tramite una molecola spaziatrice.



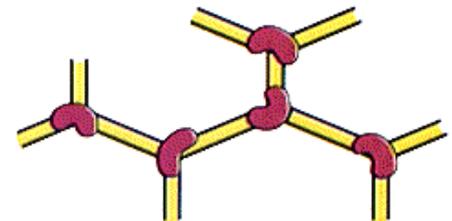
Enzyme inclusion



Microcapsule



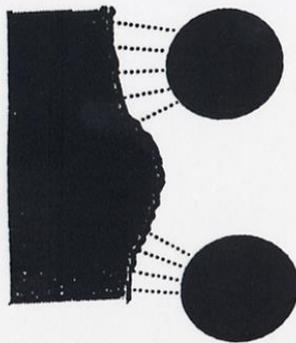
Carrier-bound enzyme



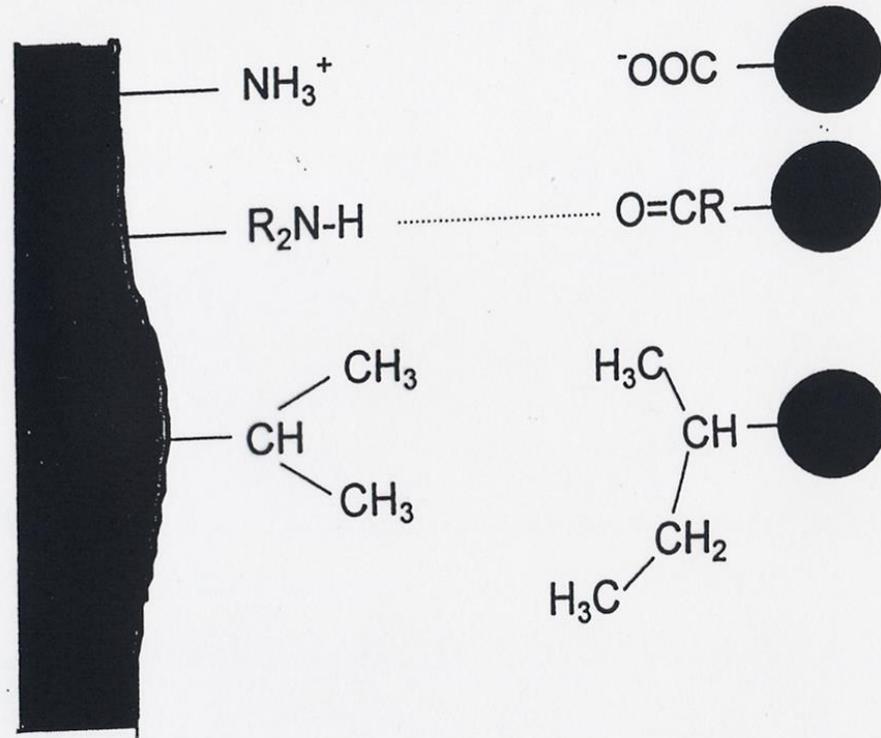
Cross-linked enzyme

Metodi di immobilizzazione: legame non covalente

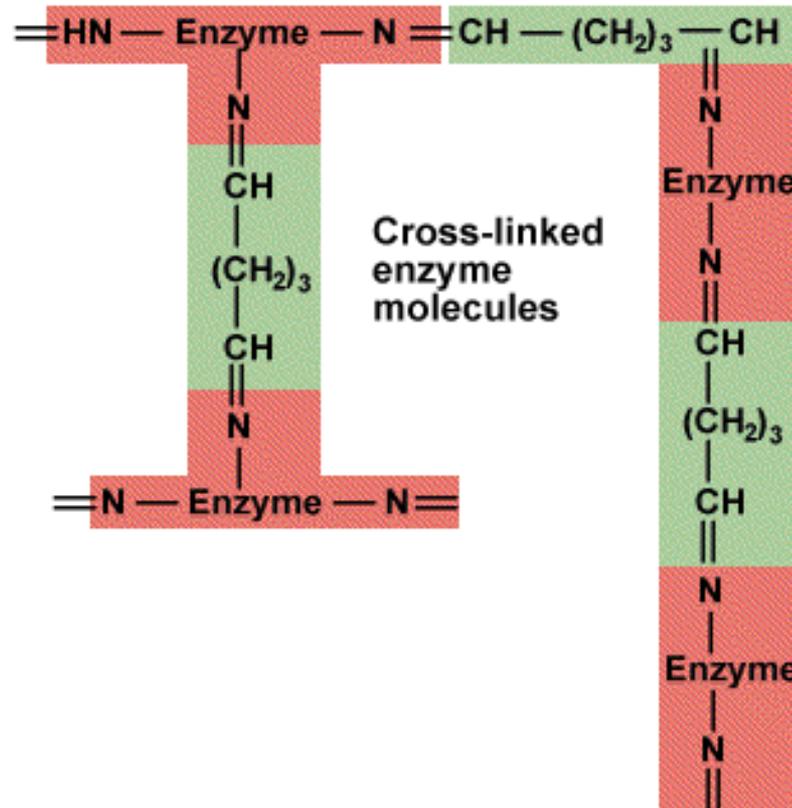
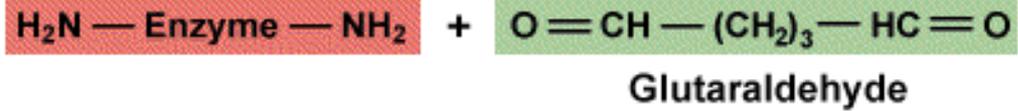
Legame non covalente



Legami multipli dovuti a interazioni ioniche, interazioni idrofobiche e ponti idrogeno



Legame covalente



Paragone tra i metodi di immobilizzazione

Legame covalente

- Legame forte
- Perdita di attività dovute alle interazioni con la struttura proteica o il centro attivo
- Metodo da usare per operazioni, a lungo termine in ambiente acquoso

Legame non covalente

- La forza del legame dipende dal solvente
- Legame idrofobico
- Molto usato per lipasi in solventi organici.

Inclusione

- Sensibile al rilascio nel tempo
- Senza interazioni con la superficie dell'enzima
- Stabilizzazione solo attraverso la scelta ottimale delle condizioni di reazione e l'ambiente

Caratterizzazione di un Sistema Enzima Immobilizzato

Operazioni successive all'immobilizzazione degli enzimi sono:

- Monitoraggio della reazione di immobilizzazione
- Caratterizzazione generale dell'E.I.
- Determinazione dei parametri cinetici, della struttura dei materiali e dei parametri che indicano gli effetti dell'immobilizzazione sull'enzima.

Preliminarmente si agisce praticando:

- Lavaggio del S.E.I.
- I fattori determinanti di questo passaggio sono: volumi, tempo, metodo di lavaggio (batch, colonna, in centrifuga, etc.) pH e forza ionica, ma i loro effetti variano a seconda del tipo di immobilizzazione praticata.

Fase di lavaggio

Immobilizzazione covalente

- Lavaggio spinto per eliminare tutte le altre forme di interazione tra enzima e supporto; se ciò non avvenisse si sovrastimerebbe la quantità di enzima immobilizzato.

Immobilizzazione non-covalente

- Lavaggio più complesso e graduale per non compromettere l'immobilizzazione, ma allontanare l'enzima in eccesso.

Parametri preliminari di un S.E.I.

- Quantità di enzima legato (peso E/peso di supporto)
- Efficienza di immobilizzazione (attività legata/ Attività iniziale)
- Stabilità di stoccaggio (Attività /Tempo di stoccaggio)
- Stabilità in lavoro continuo (Attività / tempo di lavoro)
- Stabilità meccanica del supporto
- Carica elettrica superficiale del supporto
- Perdita di enzima in lavaggio continuo

Caratteristiche di un E.I.

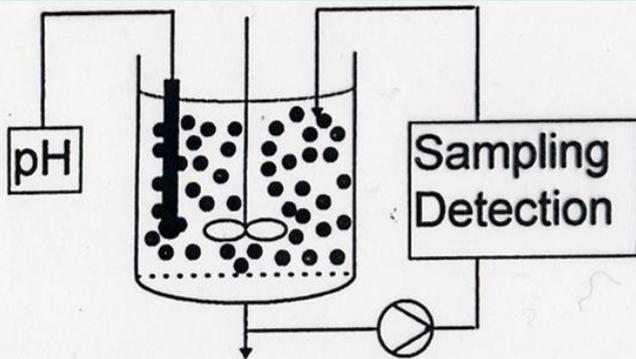
- Misura della V_{\max}
- Misura della K_M
- Misura della stabilità alla temperatura
- Dipendenza dell'attività dal pH
- Dipendenza dell'attività dalla temperatura

Metodi per la determinazione dell'attività di enzimi immobilizzati

- **Metodi spettrofotometrici**
- Attività enzimatica misurata direttamente nella cella spettrofotometrica o dopo prelievi continui (pompe peristaltiche) o discontinui.
- **Metodi titrimetrici**
- Per enzimi che catalizzano reazioni in cui vengono prodotte o consumate specie ioniche titolabili.
- **Reazioni misurabili con elettrodi (O_2)**
- **Metodi chimici**
- Misura della [proteina] prima e dopo l'immobilizzazione; titolazione dei siti attivi.

SAGGI PER ENZIMI IMMOBILIZZATI

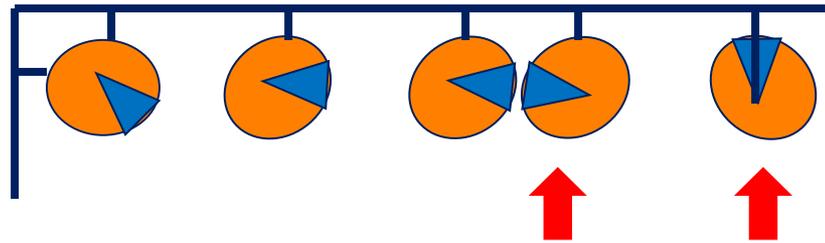
- Usare le condizioni più riproducibili (evitare effetti di trasferimento di massa, usare le condizioni cinetiche ottimali dell'enzima solubile)
- Usare le condizioni del processo (si raccomanda un campionamento periodico)



- Controllare la distribuzione della grandezza delle particelle
- Equilibrare le particelle con cura (idratare, lavare, degassare)
- Usare alte concentrazioni di substrato ($[S] \geq 100 K_M$)
- Aumentare l'agitazione sino a quando non si nota più aumento dell'attività
- Usare tampone per evitare cambiamenti di pH; aumentare la pressione per substrati gassosi

EFFETTI DELL'IMMOBILIZZAZIONE

Lo stato di immobilizzazione può determinare sugli enzimi la perdita di parte del loro potere catalitico e le cause sono di ordine sterico e microambientale.



Effetto sterico

Il substrato non può accedere all'enzima o accede con difficoltà nel sito attivo.

L'impedimento sterico è trascurabile nel caso di immobilizzazione mediante intrappolamento in gel e dipende dalla resistenza offerta alla diffusione del S e P.

Microintorno

Il polimero di supporto può influenzare il microintorno di un E.I. in almeno due modi:

- Effetto di partizione
- Effetto di diffusione

Effetti della partizione

- Il polimero può attirare o respingere il substrato, il prodotto o altre molecole verso la sua superficie. In tal modo essi si diluiranno o concentreranno vicino all'enzima.
- Il polimero agisce come barriera alla libera diffusione delle molecole verso l'enzima o dall'enzima verso la soluzione circostante.

Effetti della diffusione

- Mentre gli effetti della partizione dipendono dalla chimica-fisica del polimero e del soluto, la limitazione alla diffusione è una questione geometrico-dimensionale
- Il caso limite è rappresentato dalla matrice polimerica con diametri talmente piccoli da non permettere l'ingresso del substrato

Effetti della diffusione

- Contrariamente agli effetti di partizione, gli effetti diffusionali si concretizzano in **differenze di concentrazione** tra il microintorno e la soluzione esterna al polimero.
- Con gli enzimi molto attivi, questo gradiente di concentrazione di substrato è determinato dalla lenta velocità di diffusione del substrato e dall'attività catalitica.

Tipologie di effetti diffusionali

- 1) Limitazione alla diffusione esterna
- 2) Limitazione alla diffusione interna

Tipologie di effetti diffusionali

1) Limitazione alla diffusione esterna.

Essa è il risultato dell'effetto del sottile strato di solvente non agitato che circonda la particella del polimero (Strato di Nerst). I soluti si spostano attraverso questo strato mediante la combinazione di diffusione e convezioni molecolari passive. Lo spessore è influenzato dall'agitazione della soluzione e aumentando la velocità di agitazione si riduce la barriera di diffusione esterna.

Gli effetti diffusionali possono essere divisi in due tipi

2) Limitazione alla diffusione interna

-Le limitazioni alla diffusione interna sono limitazioni imposte al libero movimento entro la matrice dalla sua natura. Entro il supporto la diffusione avviene solo mediante diffusione molecolare passiva e non è influenzata dalla velocità di agitazione della soluzione esterna.

enzimi immobilizzati e bioreattori

BIOREATTORE: qualsiasi contenitore nel quale può avvenire una reazione biochimica in condizioni controllate

tre tipi di bioreattori ad agitazione crescente:

- Reattori a letto impaccato
 - Reattori a letto fluidificato
 - Reattori agitati
- L'agitazione è un importante fattore per un bioreattore che opera in un sistema in continuo; per la scelta del reattore bisogna considerare i fattori influenzati dall'agitazione:
- Valori di $[S]/K_M$
 - Inibizione da substrato/prodotto
 - Grado di conversione richiesto
 - Limitazioni nel "mass-transfer"
 - Tipo di supporto

Bioreattori a letto impaccato e a letto fluidificato

Bioreattori in cui è presente una fase solida (supporto o cellule/enzimi immobilizzati) ed un eluente.

Nel caso dei reattori a letto fluido le particelle sono mantenute in sospensione dal flusso dell'eluente e/o dal gas in entrata

Vantaggi:

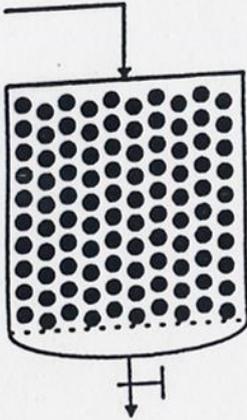
semplicità ed economia di esercizio ottimizzati per lo svolgimento di reazioni enzimatiche (water waste treatments)

Svantaggi:

Formazione di aggregati o di percorsi preferenziali (l. impaccato)

Abrasione delle particelle (l. fluidificato)

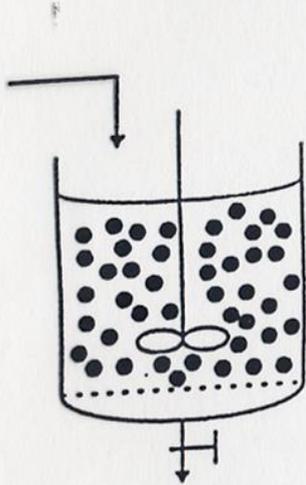
Reattori per enzimi immobilizzati: reattori a letto impaccato



Reattori a letto impaccato
Enzima legato a particelle
sferiche

- **Alta resa spazio-tempo**
- **Operazione semplice**
- **La colonna con flusso a gravità da un' alta flessibilità**
- **Meno raccomandati per reazioni che richiedono**
neutralizzazione, cofattori, substrati gassosi
- **Necessità di usare particelle resistenti alla pressione**

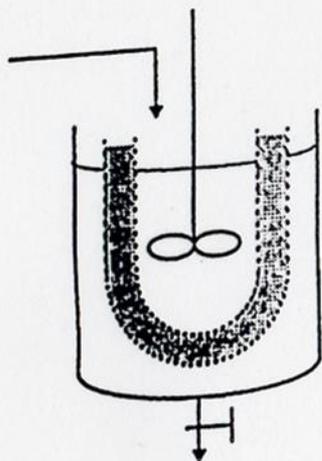
Reattori per enzimi immobilizzati: reattore agitato



Reattore agitato
Enzima legato a
particelle sferiche

- * Operazione discontinua
- * Neutralizzazione efficiente
- * Mescolamento efficiente, per esempio per fornire ossigeno
- * Carico del catalizzatore sino al 30% del volume del reattore
- * Opera sino a che c'è il 30% di attività residua
- * Aggiunta di enzima per tempo di reazione costante
- * Particelle non abrasive, elastiche
- * Grandezza delle particelle tra 0.1 e 1.0 mm

Reattori per enzimi immobilizzati: reattori a membrana



Reattore a membrana
Enzima contenuto dentro
fibre cave

- ◇ Opera in continuo
- ◇ Grande resa spazio-tempo
- ◇ Limite del peso molecolare per substrati e prodotti
- ◇ Facile estrazione del solvente *in situ*
- ◇ Enzima non modificato
- ◇ Enzima stabilizzato dalle condizioni di reazione
- ◇ Facile controllo dell'attività attuale dell'enzima

CARATTERIZZAZIONE OPERAZIONALE DI UN BIOREATTORE

Il più importante parametro che caratterizza un processo con un bioreattore è la sua **produttività** definita come la quantità di prodotto ottenuta per unità di enzima per emivita. Questo parametro è composto di due fattori: la emivita dell'enzima e il numero di volumi del bioreattore processati per unità di enzima.

I fattori che possono portare alla diminuzione dell'attività del catalizzatore sono:

1) La perdita dell'enzima :

- disintegrazione del supporto
- solubilizzazione del supporto
- rilascio dell'enzima

2) La perdita dell'attività dell'enzima ::

- avvelenamento
- proteolisi
- perdita di cofattori o di subunità
- denaturazione

3) Limitazione dell'accesso al substrato

- flusso irregolare attraverso il catalizzatore

USO INDUSTRIALE degli ENZIMI IMMOBILIZZATI

Finora limitato principalmente alle applicazioni **alimentari e farmaceutiche**.

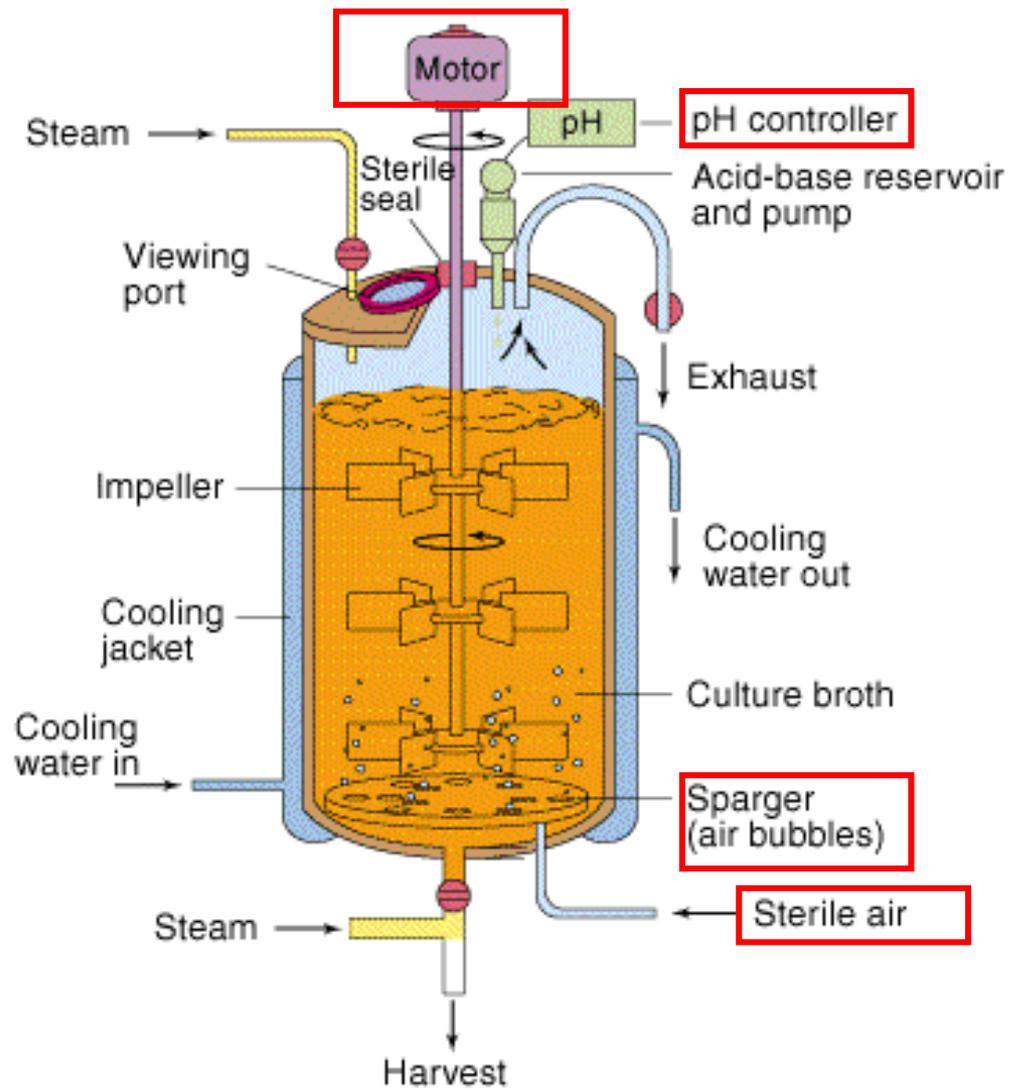
Uso limitato dalla **quantità** relativamente bassa (per un uso su scale industriale) di enzima che si riesce a produrre ed al suo **costo**.

Prevedibile un uso industriale di Enzimi quando:

- prodotto ottenibile **solo** per via enzimatica
- **costi** troppo elevati per altra via

Processi industriali attuali con Enzimi immobilizzati:

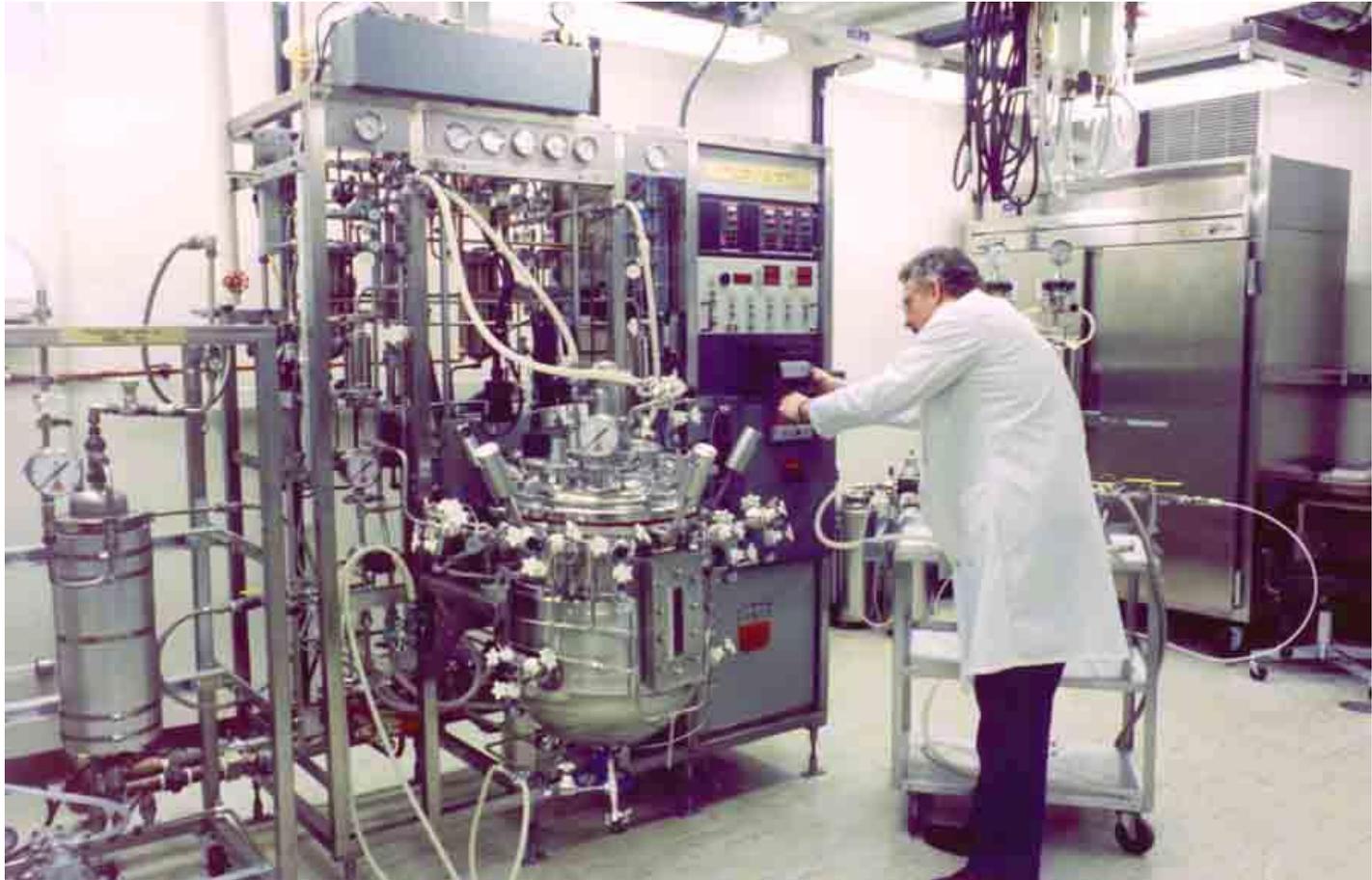
- Produzione di sciroppo di fruttosio (glucosio isomerasi)
- Risoluzione ottica di aminoacidi (aminoacilasi)
- Produzione di D-aminoacidi (idantoinasi)
- Produzione acido aspartico (aspartasi)
- Produzione di acido malico (fumarasi)
- Deacilazione penicilline e cefalosporine (penicillina amidasi)
- Idrolisi lattosio (lattasi)
- Produzione sciroppo di glucosio (invertasi)
- (produzione di glucosio da amido idrolizzato (glucoamilasi))



a 40 liter Bioreactor for animal cell culture.

Along with the typical control parameters, it is equipped with a specially designed low shear impeller called a "UniShear Impeller" and a rotating filter to retain cells or microcarriers in the bioreactor while removing spent broth as fresh nutrients are added. It can be operated in fed-batch or continuous mode. It has its own clean steam generator which uses plant steam to produce steam from distilled water.





Stainless steel vessel in-situ sterilisable, with a total volume of 630 litres.

The bioreactor is suitable for batch and fed-batch cell cultivations with a working volume for *E. coli* between 200 and 500 litres. The bioreactor is fitted with magnetic coupled bottom-drive stirrer with three 4-bladed impellers, four vessel-mounted baffles for mixing enhancement, stainless steel frame system with integrated motor drive, thermo-system, sterile filters and load cells.

The software control allows advanced regulations for stirrer, level, temperature, DOT, pH, redox, pressure, gas flow and pumps. Gas analyser for outlet gas is available. The bioreactor can operate at temperatures ranging from 5 °C to 100 °C. Five controlled and sterilisable stainless steel addition vessels of 20 to 100 litres capacity are connected to the bioreactor.

