

4) IMMOBILIZZAZIONE DEGLI ENZIMI

4.1) Introduzione

Gli enzimi sono proteine globulari e come tali sono solubili in acqua, così come lo sono quasi tutti i substrati ed i prodotti. Le reazioni enzimatiche avvengono perciò di solito in **fase omogenea**: tutte le specie coinvolte fanno parte della stessa fase, la soluzione acquosa in cui l'atto catalitico avviene. In natura si conoscono ovviamente anche reazioni enzimatiche **eterogenee**, nelle quali non tutte le specie chimiche sono contenute nella stessa fase. La degradazione della **cellulosa** per opera dei complessi enzimatici denominati "**cellulasi**" ne è un importante esempio: il substrato macromolecolare non è solubile in acqua mentre lo sono il biocatalizzatore e gli oligomeri (zuccheri) prodotti.

Nella conduzione dei processi biotecnologici, spesso il catalizzatore è il componente più costoso ed incide in maniera molto rilevante sui **costi d'esercizio**. Si tende quindi a recuperarlo, separandolo dalla miscela contenente i prodotti di reazione, per poterlo utilizzare più volte. Alla presenza di una soluzione omogenea il recupero dell'enzima è possibile ma non immediato perché sono richieste operazioni di cosiddetto "**downstream processing**" (= a valle del reattore) le quali sfruttano differenze nelle proprietà fisiche fra la proteina e le altre specie chimiche in soluzione per operare la separazione. Un tipico esempio è l'utilizzo di uno stadio di **ultrafiltrazione**, rappresentato schematicamente in Figura 4.1 in accoppiamento ad un CSTR. La **membrana** ultrafiltrante lascia permeare substrato non reagito e prodotto ma **reietta** (= respinge) la proteina altomolecolare che è riciclata in ingresso al reattore: si realizza così il **confinamento** dell'enzima all'interno del reattore. Una tale tecnica è effettivamente impiegata in molte applicazioni industriali ma presenta alcuni svantaggi: maggiori costi di impianto; controllo delle apparecchiature più oneroso; possibili effetti di disattivazione catalitica indotti dalla circolazione forzata dell'enzima tra reattore e separatore. Quest'ultima considerazione necessita di approfondimento. In presenza di un catalizzatore instabile e dovendosi realizzare un impianto continuo a produttività costante nel tempo, l'unica possibilità è aggiungere del biocatalizzatore fresco in ingresso al reattore. Si osservi però che, nello schema di Figura 4.1, l'enzima evolve a **ciclo chiuso**: le aggiunte di rinfresco provocano il continuo aumento della concentrazione proteica in soluzione, e sono possibili fenomeni di **gelificazione** sulla

membrana con conseguente aumento della resistenza opposta al flusso della soluzione attraverso la membrana (aumento delle spese di pompaggio). Continuando ad aggiungere enzima, si renderà prima o poi necessario lo "**shut-down**" (= fermata) dell'apparecchiatura per sostituire la membrana intasata.

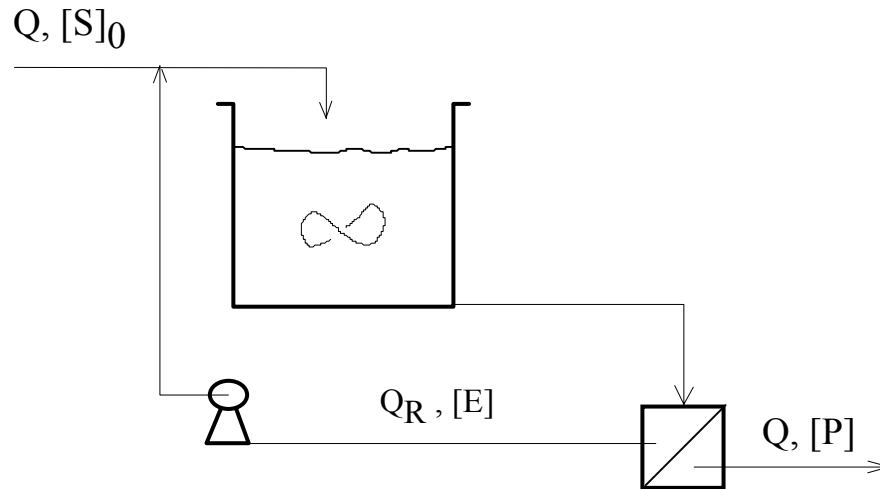


FIGURA 4.1. Schema di ricircolo di enzima solubile in un CSTR

Se invece l'enzima fosse **insolubile**, allora esso potrebbe essere trattenuto all'interno del CSTR da un semplice filtro anteposto all'uscita, realizzando così il confinamento in maniera più semplice ed evitando alla proteina lo **stress** della circolazione forzata, con conseguente possibile miglioramento della stabilità operativa del biocatalizzatore.

D'altra parte, anche in natura si osservano reazioni catalizzate da enzimi resi insolubili: alcuni enzimi di membrana, per esempio, svolgono la loro attività catalitica su substrati presenti in soluzione nell'ambiente esterno al microrganismo, pur restando ad esso uniti e quindi in fase eterogenea.

Queste considerazioni, unite all'osservazione che spesso (ma non sempre!) l'**immobilizzazione** di un enzima porta ad aumentarne la stabilità termica, hanno fatto nascere un campo fecondo di ricerca per sviluppare tecniche che consentano di renderli insolubili in fase acquosa ma nello stesso tempo ne conservino le capacità catalitiche.

Nel 1916, Nelson e Griffin dimostrarono che l'invertasi **adsorbita** su **carbone attivo** conservava la propria attività catalitica. Questa prima, brillante intuizione, confortata da evidenze sperimentali, non fu sufficiente a suscitare l'interesse del mondo della ricerca: si dovette aspettare gli anni '60 per assistere allo sviluppo di lavori sperimentali sul tema, ed il 1969 per il primo brevetto industriale (reattore continuo a L-amminoacilasi immobilizzata per la risoluzione di L-amminoacidi da miscele racemiche). Al giorno d'oggi si è riusciti ad

immobilizzare con varie tecniche un paio di centinaia di enzimi diversi, ed in molti casi anche cellule intere.

4.2) Tecniche di immobilizzazione

Immobilizzare un enzima significa associarne le molecole ad un supporto solido in maniera più o meno "forte". Questo può essere ottenuto sviluppando dei legami di tipo covalente proteina-solido e/o proteina-proteina (immobilizzazione **chimica**) oppure sfruttando determinate interazioni di tipo fisico (immobilizzazione **fisica**). Quale che sia il principio su cui si basa una tecnica di immobilizzazione, essa non deve tradursi in una perdita troppo rilevante dell'attività catalitica: uno dei requisiti per un buon metodo di immobilizzazione è quindi che la struttura terziaria della proteina non sia stravolta. Nel seguito saranno descritte i principali metodi di immobilizzazione.

Si possono utilizzare molecole **bifunzionali** capaci di fare da ponte fra un supporto e la proteina sviluppando legami **covalenti** con entrambi (Figura 4.2): come tutti i metodi chimici, questa tecnica di immobilizzazione assicura un legame stabile con il solido ma porta a modificare la molecola di biocatalizzatore. Ciò può causare denaturazione più o meno marcata con conseguenti perdite di attività catalitica.

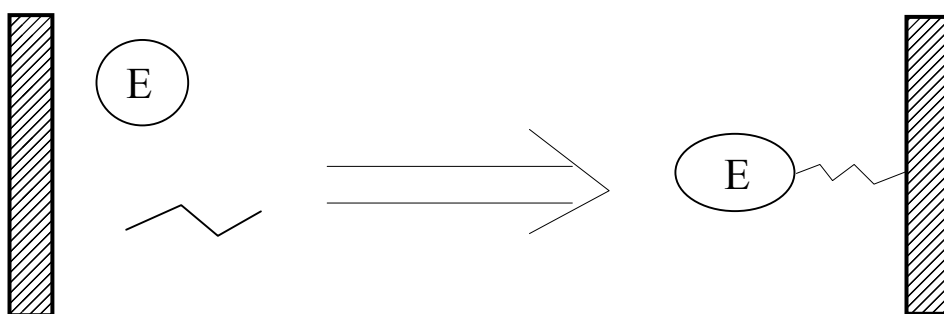


FIGURA 4.2. Immobilizzazione per “graffaggio” su supporto solido

Un altro possibile procedimento consiste nel creare legami covalenti tramite graffaggio fra molecole di enzima. Si viene così a creare un vero e proprio polimero reticolato tridimensionalmente il quale non consente più alle molecole proteiche di rimanere in soluzione (Figura 4.3). Ha luogo quindi a formarsi un **gel**, la cui reattività verso il substrato non dipende soltanto dall'eventuale alterazione dei siti catalitici indotta dalla formazione dei legami di reticolazione. Infatti, a differenza della tecnica di graffaggio su di un supporto

solido, non tutte le molecole di enzima immobilizzato sono esposte allo stesso modo nei confronti della soluzione esterna (**bulk**). Affinché le molecole di enzima più interne possano svolgere la loro funzione, occorre che le maglie del reticolo siano accessibili sia al substrato sia al prodotto. Nell'applicare questo tipo di tecnica, dunque, è di cruciale importanza il **controllo del diametro medio dei pori** della maglia tridimensionale, che dipende non solo dalla **lunghezza** dell'agente reticolante, ma anche dalle **modalità di conduzione della polimerizzazione**.

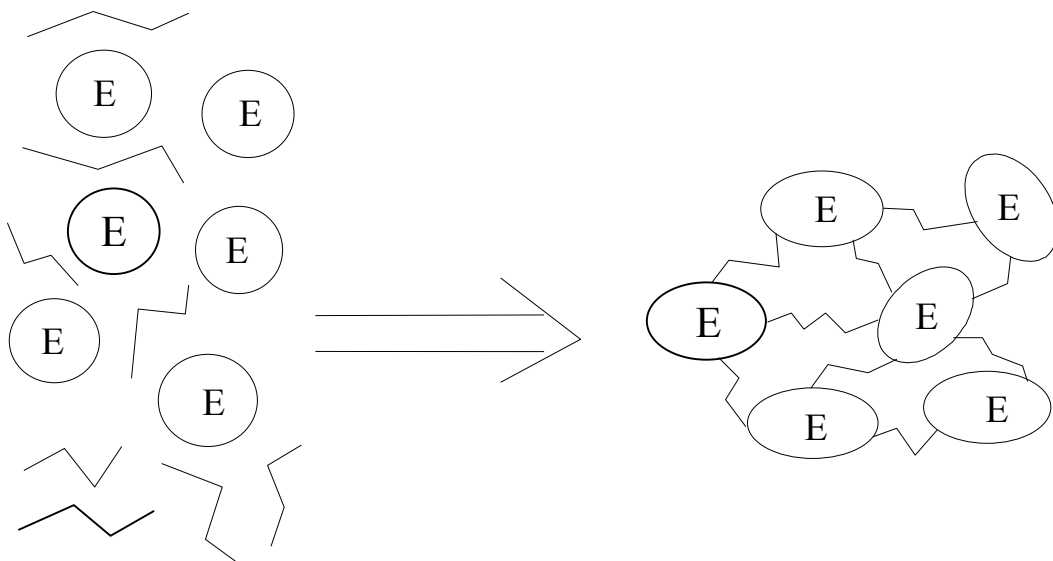


FIGURA 4.3. Formazione di un gel per reticolazione tridimensionale

La formazione di un reticolo tridimensionale può anche avvenire senza coinvolgere le molecole di enzima, operando così un'immobilizzazione per **intrappolamento**: si fa avvenire la polimerizzazione di una certa sostanza, non reattiva rispetto alle molecole proteiche, che non formano quindi legami con essa. Il reticolo che si forma ha le maglie sufficientemente strette da non permettere il passaggio dell'enzima, ma non tanto da impedire quello di substrato e prodotto di reazione. E' questo un metodo fisico di immobilizzazione: la miscela monomerica di partenza è additivata di enzima, e poi è avviata la polimerizzazione, con formazione del gel cataliticamente attivo (Figura 44).

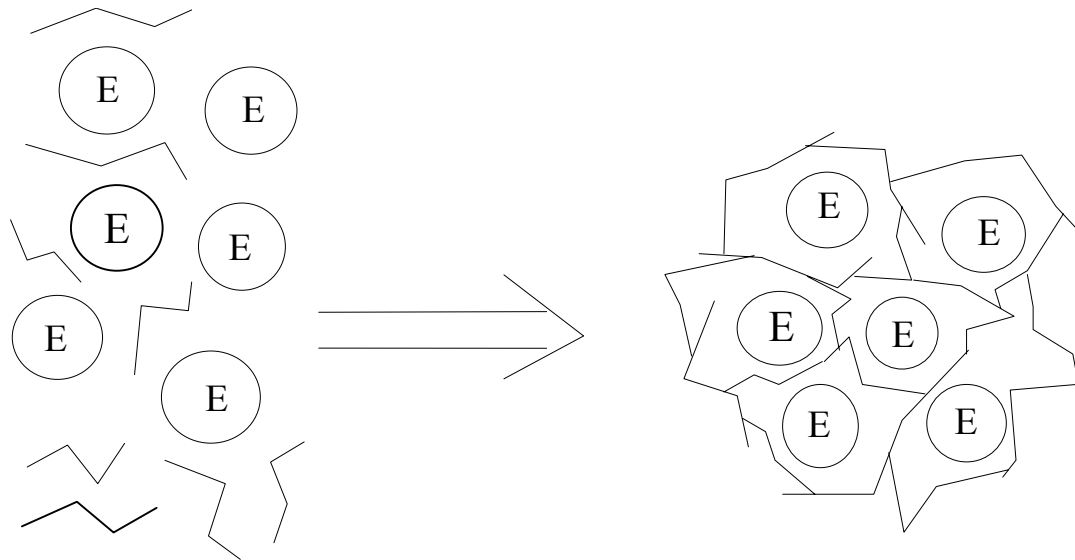


FIGURA 4.4. Intrappolamento fisico di enzima in un gel tridimensionale

Le tecniche illustrate in precedenza rappresentano solo alcune delle modalità di immobilizzazione messe a punto nel corso degli anni dai vari ricercatori, e l'esposizione aveva solo finalità illustrative. Non possono essere date regole generali che stabiliscano a priori la tecnica ottimale per un dato enzima. Il corretto sviluppo di un processo di immobilizzazione si basa su una seria indagine sperimentale preliminare che consenta di adattare al singolo caso i metodi noti dalla letteratura scientifica. Prima di concludere il presente capitolo, sarà discusso in maggiore dettaglio un ulteriore metodo di immobilizzazione fisica: **l'adsorbimento superficiale** su supporti solidi che, oltre ad essere stato, come accennato in introduzione, il primo metodo sperimentato con successo, è tuttora largamente impiegato a causa dell'intrinseca semplicità di esecuzione. Nel corso della trattazione verranno anche introdotte delle grandezze che quantificano la riuscita di un processo di immobilizzazione e la cui definizione è indipendente dalla particolare tecnica adottata.

Come già più volte richiamato, gli enzimi sono soggetti a notevoli fenomeni di interazione elettrica con l'ambiente che li circonda. In particolare, essi sono capaci di sviluppare interazioni di tipo debole (elettrostatiche, Van der Waals, legame idrogeno, etc.) con le superfici solide. Se s'immerge un supporto di materiale di opportune caratteristiche superficiali in una soluzione proteica, le molecole di enzima mostreranno una certa tendenza a **adsorbirsi** sulla superficie solida. Il fenomeno, essenzialmente **fisico**, avviene per la formazione di legami di bassa energia ed è quindi facilmente reversibile. Le molecole in fase adsorbita si pongono in equilibrio con quelle in soluzione: quanto maggiore è la concentrazione iniziale di enzima in soluzione, tanto maggiore sarà la

massa di enzima adsorbito per unità di superficie di solido. Si tratta evidentemente di un equilibrio eterogeneo, perché le molecole adsorbite non fanno più parte della soluzione. Tuttavia, proprio a causa della scarsa entità dell'energia in gioco, molto verosimilmente l'attività catalitica dell'enzima adsorbito risulterà prossima a quella del catalizzatore libero, cioè in soluzione.

Si supponga di immergere una lamina di solido in una soluzione enzimatica a concentrazione iniziale $[E]_i$. S'instaureranno le interazioni descritte in precedenza e si osserverà una progressiva diminuzione della concentrazione proteica nella fase liquida, fino al raggiungimento di uno stato d'equilibrio nel quale la concentrazione in fase liquida non cambia più (Figura 4.5, a). Il valore d'equilibrio $[E]_f$ dipende dalla temperatura, dal numero di siti disponibili per l'adsorbimento superficiale e dall'entità delle interazione molecola-solido (Figura 4.5, b).

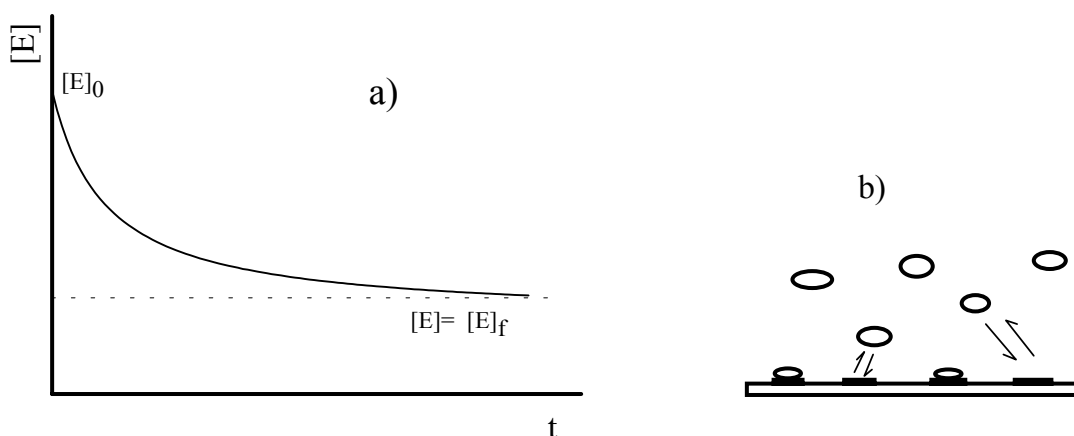


FIGURA 4.5. Adsorbimento fisico su supporto solido

Una delle equazioni costitutive dell'equilibrio di adsorbimento più largamente impiegate per interpretare i fenomeni descritti è la legge di **Langmuir**:

$$[E]_{\text{ads}} = \frac{k[E]_f}{K_{\text{ads}} + [E]_f} \quad (4.1)$$

dove $[E]_{\text{ads}}$ è la concentrazione **superficiale** di enzima (ad esempio, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), $[E]_f$ è la concentrazione che fa **equilibrio in fase liquida** e k e K_{ads} sono due costanti caratteristiche del sistema.

Risulta evidente la similitudine fra la legge di Langmuir e quella di Michaelis: l'analogia matematica fra le due equazioni è ovviamente traduzione di un'analogia fra i fenomeni, pur così dissimili a prima vista, essendo uno di tipo termodinamico e l'altro di tipo cinetico. In

realtà, l'ammontare di enzima adsorbito **deve** essere **limitato** e quindi il fenomeno deve mostrare una saturazione. Infatti, quando tutti i siti di adsorbimento sono impegnati, se si **esclude che si formino strati multipli** (cosa del tutto possibile, ma non interpretabile con la legge di Langmuir) la concentrazione superficiale di enzima non può ulteriormente aumentare. Questo si verifica in corrispondenza di concentrazioni in fase liquida più o meno elevate a seconda dell'affinità che la proteina ha verso la superficie del solido. In pratica, quando $[E]_f/K_{ads} \gg 1$, $[E]_{ads} \rightarrow k$. E' evidente la corrispondenza fra k e V_{max} e fra K_{ads} e K_m .

Si consideri ora nuovamente l'esperimento di adsorbimento descritto qualitativamente in precedenza. Il bilancio di materia sull'enzima afferma che:

$$[E]_{ads} = \frac{V([E]_i - [E]_f)}{A} \quad (4.2)$$

dove V è il volume della soluzione enzimatica ed A la superficie **totale** del solido. Se si ripete l'esperimento aumentando la $[E]_i$, si otterranno sempre maggiori $[E]_{ads}$, calcolati tramite la (4.2), fino al valore limite $[E]_{ads,max} = k$. In generale (ma non sempre!) si ha interesse ad immobilizzare la maggior quantità possibile di enzima per unità di superficie di solido, cioè a spingere l'adsorbimento fino alla saturazione. In ogni caso, se A_{sp} è l'**attività specifica** del biocatalizzatore (unità enzimatiche per mg di proteina) l'attività enzimatica della soluzione di partenza sarà:

$$UE_i = A_{sp} V [E]_i \quad (4.3)$$

Quella finale, a processo di adsorbimento terminato, sarà:

$$UE_f = A_{sp} V [E]_f \quad (4.4)$$

Ammettendo che l'attività specifica del biocatalizzatore in soluzione **non vari** durante il processo di immobilizzazione, le unità enzimatiche complessive teoricamente immobilizzate sul solido saranno:

$$UE_{imm} = UE_i - UE_f = A_{sp} V ([E]_i - [E]_f) \quad (4.5)$$

Si definisce **resa di immobilizzazione** e si indica con **RI** il rapporto tra le unità teoricamente immobilizzate e quelle inizialmente presenti nella soluzione. Le unità adsorbite sono teoriche proprio perché bisogna portare in conto l'eventualità che l'attività

sia variata in corso di immobilizzazione. A tal fine, se l'attività enzimatica riscontrata (sperimentalmente) per il solido è UE_{det} , allora si può definire un **recupero di attività**:

$$RA = \frac{UE_{det}}{UE_{imm}} \quad (4.6)$$

A questo punto è possibile calcolare l'**efficienza globale** del processo di immobilizzazione:

$$\eta_{imm} = (RI)(RA) \quad (4.7)$$

Naturalmente le definizioni dalla (4.3) alla (4.7) non sono esclusive delle tecniche di adsorbimento superficiale, ma valgono per tutti i processi di immobilizzazione degli enzimi. Infine, è opportuno svolgere ancora qualche considerazione sull'adsorbimento. Si è in precedenza detto della reversibilità del fenomeno, dovuta alla debole entità delle interazioni proteina-solido. Naturalmente i legami sono sì di bassa energia rispetto, ad esempio, a quelli di tipo covalente, ma non così tanto da rendere inutilizzabile in pratica il fenomeno per produrre biocatalizzatori da impiegare in processi industriali. Infatti, una volta adsorbito l'enzima sul solido, se questo fosse immerso in una soluzione priva di proteina, in base alla legge di Langmuir l'enzima dovrebbe **desorbirsi** fino al verificarsi di una nuova condizione di equilibrio fra la concentrazione in soluzione e quella in fase adsorbita. Infatti, il biocatalizzatore a contatto con una soluzione priva di enzima è termodinamicamente instabile, e la tendenza al desorbimento è quindi spontanea. Tuttavia, **la cinetica** con cui il fenomeno si verifica può essere (ma non è detto che lo sia sempre) così lenta da rendere trascurabile l'enzima desorbito nel tempo di utilizzo del biocatalizzatore nel processo. Il desorbimento è favorito dall'innalzamento della temperatura e da sforzi meccanici dovuti all'**attrito** in prossimità della superficie di contatto fra liquido e solido. Per impedire il rilascio dell'enzima si possono effettuare dei trattamenti successivi all'adsorbimento, ad esempio creare uno strato di gel o reticolare un polimero direttamente sull'enzima adsorbito.

Infine, particolare attenzione va posta nella determinazione sperimentale del parametro UE_{det} perché le modalità di esecuzione del saggio cinetico possono influenzare fortemente la risposta del sistema. Ciò sarà discusso nell'ambito del capitolo relativo al trasporto di materia accoppiato alle reazioni biochimiche.