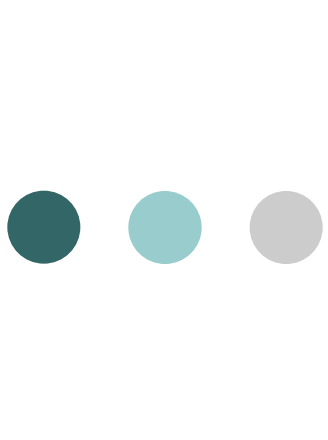




Enzimas inmovilizadas

alodeyro@fbioyf.unr.edu.ar
lodeyro@ibr-conicet.gov.ar

INDUSTRIA $\Rightarrow$ numerosos procesos catalizados por enzimas

↳ *Ventajas:* - gran actividad catalítica
- gran especificidad por el sustrato
(estereoselectividad y regioespecificidad)

↳ *Desventajas:* - no son estables en las condiciones de trabajo
- no se pueden reutilizar, no se pueden separar S y P

☺ INMOVILIZACION:

permite que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable

ENZIMAS INMOVILIZADAS:

Enzimas que están físicamente confinadas o localizadas en una región definida del espacio con retención de sus propiedades catalíticas y que pueden ser usadas de manera repetida y continua.



VENTAJAS

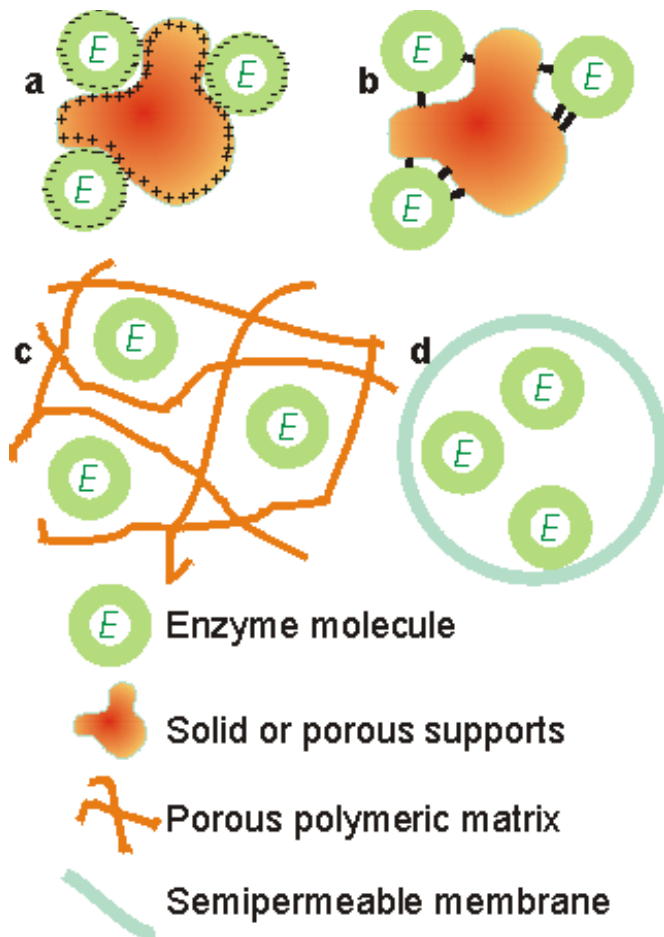
- Aumento de la estabilidad y en algunos casos de su actividad
- Reutilización del derivado → disminución del costo del proceso
- Diseño de reactores enzimáticos de fácil manejo y control adaptado a la aplicación de la E inmovilizada



DESVENTAJAS

- Alteración de la conformación de la enzima respecto de su estado nativo
- Heterogeneidad en el sistema E-soporte (distintas fracciones de E inmovilizada con distinto número de unión al soporte)
- Pérdida de la act. enzimática durante el proceso de la inmovilización
- Costo adicional de reactivos, soporte y operación
- Posible requerimiento adicional de purificación

Métodos de inmovilización



1. Absorption
2. Covalent linkage
3. Enzyme entrapment
4. Encapsulation of enzyme

CLASIFICACIÓN

- Según la naturaleza de la interacción responsable de la inmovilización
 - ↳ métodos físicos
 - ↳ métodos químicos
- Combinando la naturaleza de la interacción con el soporte:
 - ↳ métodos para enzimas solubles
 - ↳ métodos para enzimas insolubles

- **Enzimas insolubles**

1. ENLACE

1.1. Enlace al soporte

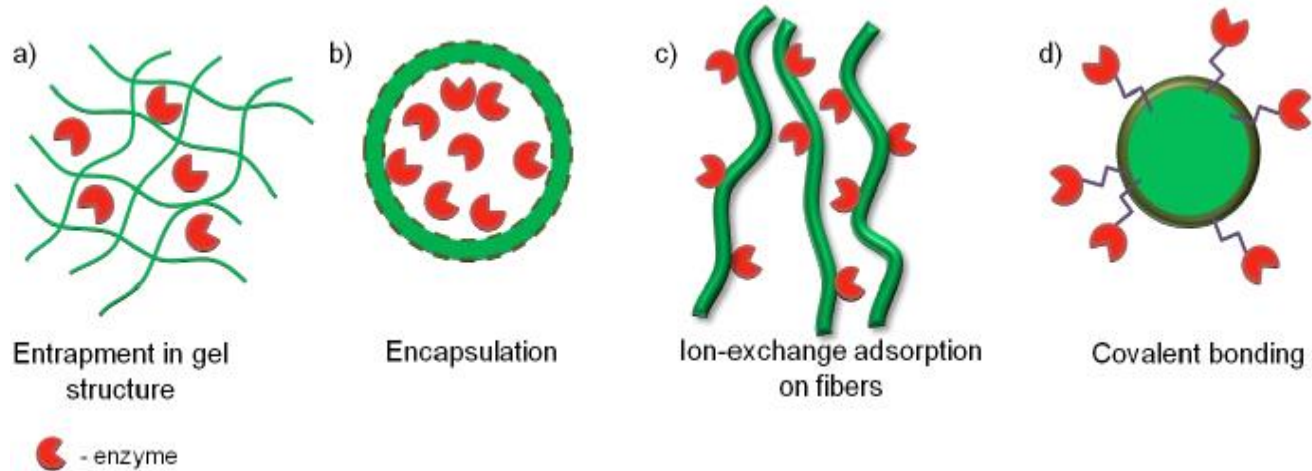
1.1.1. Adsorción física

1.1.2. Enlace iónico

1.1.3. Enlace con metal

1.1.4. Enlace covalente

1.2. Entrecruzamiento

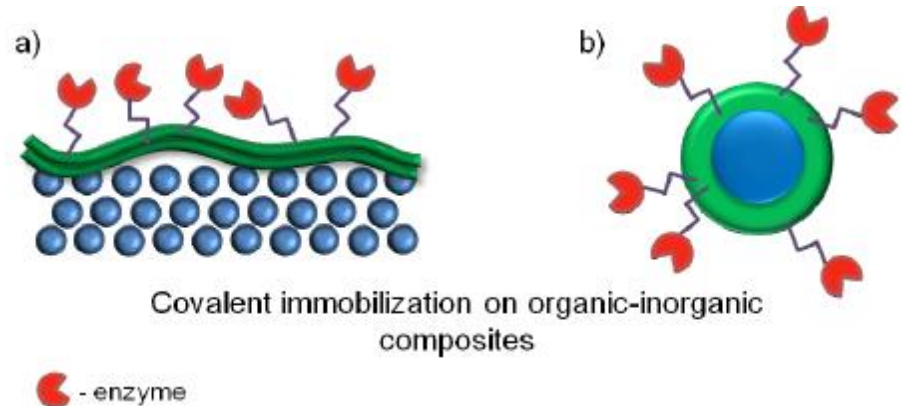


2. ATRAPADO

2.1. Atrapado en gel

2.2. Atrapado en fibras

2.3. Microencapsulado



- **Enzimas solubles**

1. Con transformación química

2. Sin transformación química

- Soporte ideal:

- ✓ Aumenta la interacción con el S
- ✓ Disminuye la inhibición por el P
- ✓ Amplia el intervalo de pH óptimo
- ✓ Frena el crecimiento de microorganismos
- ✓ Fácilmente recuperable
- ✓ Características especiales según su uso específico

ADSORCIÓN FÍSICA

- Adsorción física de las moléculas de E en la matriz sólida (pte. salino, interacción hidrofóbica)
 - Método simple
 - La E no sufre ningún cambio
 - Incubar el soporte con la E en un medio con la fuerza iónica y el pH adecuados
-
- 👍 preparación sencilla
 - 👍 bajo costo
 - 👍 no hay cambios en la especificidad de la enzima
-
- 👎 desorción durante la utilización: pérdida de la actividad catalítica y contaminación de productos
 - 👎 optimización de variables que controlan la adsorción
 - 👎 E activa durante cortos períodos de tiempo, unión débil al soporte

ENLACE IONICO

Unión iónica de las moléculas a soportes sólidos que contienen restos de intercambiadores de iones (DEAE, TEAE, CM).

👍 No hay cambios en la actividad por las condiciones suaves

👎 Liberación de la E al usar $\uparrow[\mu]$, $\uparrow[S]$ o variaciones en el pH

Table 3.1 Preparation of immobilised invertase by adsorption (Woodward 1985)

	Support type	
% bound at	DEAE-Sephadex anion exchanger	CM-Sephadex cation exchanger
pH 2.5	0	100
pH 4.7	100	75
pH 7.0	100	34

QUELACION METALICA

- Acoplamiento directo de la E por quelación a metales de transición que activan la superficie del soporte
- Soportes usados: quinina, vidrio, celita, gelatina

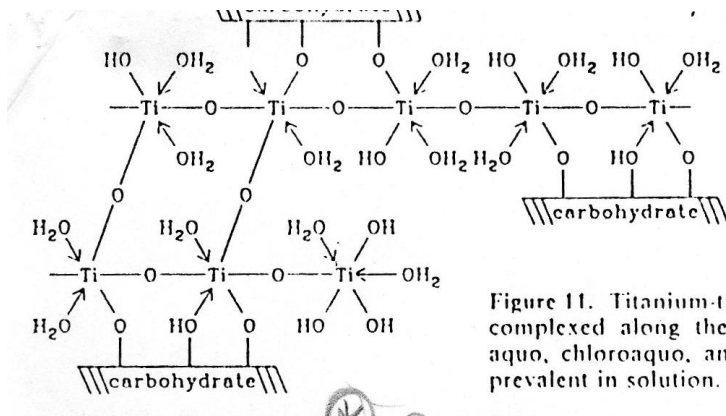
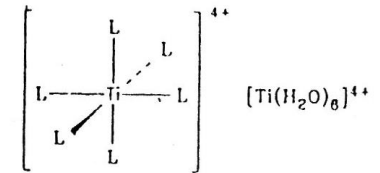


Figure 11. Titanium-treated cellulose chelated and/or complexed along the length of its chains with various aquo, chloroaquo, and chloro complex titanium species prevalent in solution.



L = neutral ligand

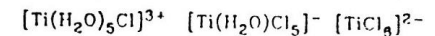


Figure 12. An example of complex ions.

- *Eficiencia en la unión:*

- ↳ disponibilidad en la E de grupos que actúen como ligandos
- ↳ factores estéricos que permitan que dichos grupos entren en contacto con los átomos del metal
- ↳ que los grupos activables no estén dentro del sitio activo
- ↳ proximidad de las moléculas de E unidas en la matriz polimérica

UNION COVALENTE

- Método más usado
- Máx. 0,2 g E/g matriz
- Condiciones más complicadas y menos suaves pero tienen la ventaja de no perder la E en condiciones de $\uparrow [\mu]$ y $\uparrow [S]$.
- En la unión deben estar implicados grupos funcionales de la E que no sean esenciales para la actividad catalítica $\Rightarrow$ no hay que usar reactivos que actúen sobre el sitio activo de la E

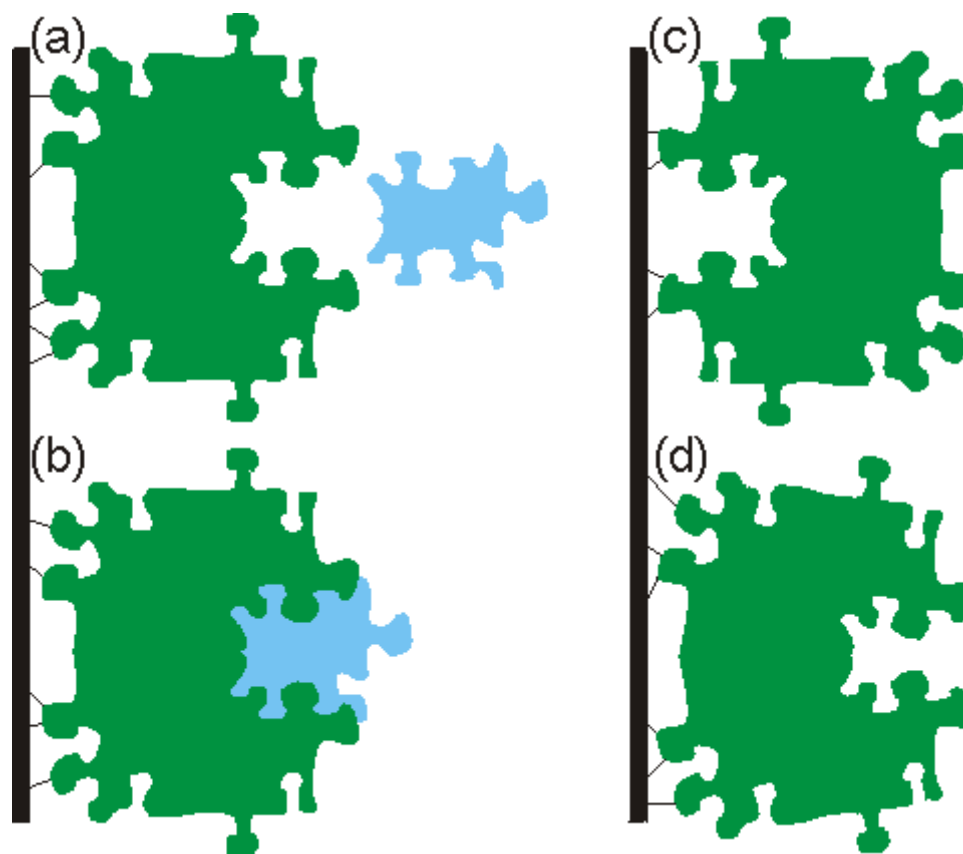


Figure 3.4. The effect of covalent coupling on the expressed activity of an immobilised enzyme. (a) Immobilised enzyme (E) with its active site unchanged and ready to accept the substrate molecule (S), as shown in (b). (c) Enzyme bound in a non-productive mode due to the inaccessibility of the active site. (d) Distortion of the active site produces an inactive immobilised enzyme. Non-productive modes are best prevented by the use of large molecules reversibly bound in or near the active site. Distortion can be prevented by use of molecules which can sit in the active site during the coupling process, or by the use of a freely reversible method for the coupling which encourages binding to the most energetically stable (i.e. native) form of the enzyme. Both (c) and (d) may be reduced by use of 'spacer' groups between the enzyme and support, effectively displacing the enzyme away from the steric influence of the surface.

UNION COVALENTE

Ventajas:

1. La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla;
2. La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización;
3. Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado.
4. Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al estabilizarse su estructura terciaria.

Desventajas:

1. Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos.
2. El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo
3. La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

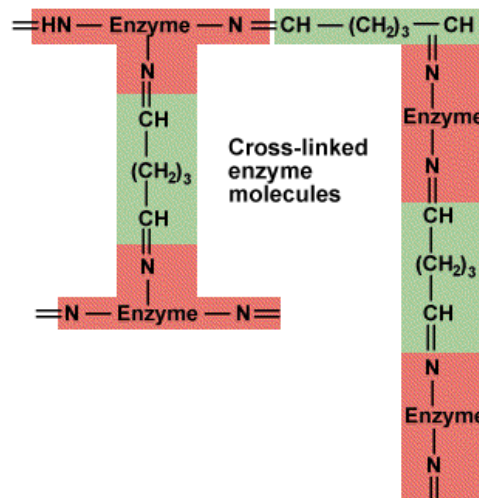
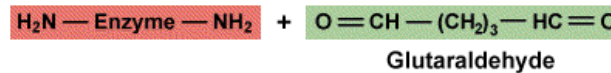
UNION COVALENTE

Table 3.2 Relative usefulness of enzyme residues for covalent coupling

Residue	Content	Exposure	Reactivity	Stability of couple	Use
Aspartate	+	++	+	+	+
Arginine	+	++	-	±	-
Cysteine	-	±	++	-	-
Cystine	+	-	±	±	-
Glutamate	+	++	+	+	+
Histidine	±	++	+	+	+
Lysine	++	++	++	++	++
Methionine	-	-	±	-	-
Serine	++	+	±	+	±
Threonine	++	±	±	+	±
Tryptophan	-	-	-	±	-
Tyrosine	+	-	+	+	+
C terminus	-	++	+	+	+
N terminus	-	++	++	++	+
Carbohydrate	- ~ ++	++	+	+	±
Others	- ~ ++	-	-	- ~ ++	-

ENTRECruzAMIENTO

- Se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de E mediante reactivos multi o bifuncionales que forman agregados tridimensionales entrecruzados totalmente insolubles en agua y no necesitan soportes adicionales
- Reactivos: homobifuncionales, heterobifuncionales, heteromultifuncionales
- Entrecruzante más usado: **GLUTARALDEHIDO**, sus uniones con E son irreversibles y sobreviven a $\uparrow T$ y $\uparrow pH$



ATRAPADO

- Localización de una E dentro de la red espacial de una matriz polimérica o una membrana $\Rightarrow$ evita la liberación de proteína sin impedir la penetración de S
- 1 g E/ g de gel
- 🖐️ moléculas de S y P relativamente pequeñas
- 👍 orgánulos y células de distintos tamaños
poca pérdida de la actividad biológica

- Atrapado en geles

Localización de la E dentro de los espacios intersticiales de geles poliméricos entrecruzados insolubles en agua.

↳ Precursores monoméricos

↳ Precursores oligoméricos

- Atrapado en fibras

Atrapado de la E dentro de las microcavidades de fibras sintéticas (técnicas de la producción de fibras)

- Microencapsulado

E inmovilizada en microcápsulas esféricas de 1 a 100 μm

INMOVILIZACION DE ENZIMAS SOLUBLES

⇒ Sin modificación química de la E

Membrana impermeable a la E, permeable al P y a veces al S.

Permite contacto íntimo de la E con el S

⇒ Con modificación química de la E

Se preparan derivados de E solubles en agua para aumentar el tamaño molecular efectivo de la E para prevenir su liberación de los dispositivos de membrana y/o para mejorar las propiedades mecánicas y de estabilidad operacional de la E

MATRICES

- CARACTERISTICAS

- Area superficial grande
- Permeabilidad
- Carácter hidrofílico
- Insolubilidad
- Estabilidad mecánica y térmica
- Alta rigidez
- Tamaño y forma de partícula adecuado
- Resistencia al ataque microbiano
- Regenerabilidad

- CLASIFICACION

➤ De acuerdo a su composición:

- ORGANICAS
- INORGANICAS

➤ De acuerdo a su morfología:

- POROSAS
- NO POROSAS

CLASIFICACIÓN MORFOLOGICA

VENTAJAS

DESVENTAJAS

- | | | |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• No porosas | <ul style="list-style-type: none">• Limitaciones difusionales bajas | <ul style="list-style-type: none">• Baja area superficial. Poca carga de enzima• Con el uso de partículas finas:
Difíciles de eliminar
Difíciles de usar continuamente
Velocidades de flujo limitadas |
| <ul style="list-style-type: none">• Porosas | <ul style="list-style-type: none">• Gran area superficial• Alta carga de enzima• Protección contra el entorno externo | <ul style="list-style-type: none">• Alta superficie interna de área• Altas limitaciones difusionales• Alto costo (poro controlado) |

Clasificación química

- **ORGANICAS:**
 1. **Polímeros naturales: Polisacáridos**

1. Celulosa
2. Almidón
3. Dextrano
4. Agar y agarosa
5. Dextrano
6. Alginato
7. Quitina y quitosán

Proteínas

- Colágeno
- Gelatina
- Albúmina
- Seda

1. Materiales del carbón
2. Polímeros sintéticos: poliestireno y poliacrilatos

- **INORGANICAS**

1. Minerales
2. Materiales fabricados: vidrio no poroso, vidrio de poro controlado, óxidos de metal con poro controlado, metales

VENTAJAS DE LAS MATRICES INORGANICAS:

- Resistencia mecánica elevada
- Estabilidad térmica
- Resistencia a solventes orgánicos
- Resistencia al ataque microbiano
- Facilidad de manejo
- Larga vida útil
- Facilidad de regeneración

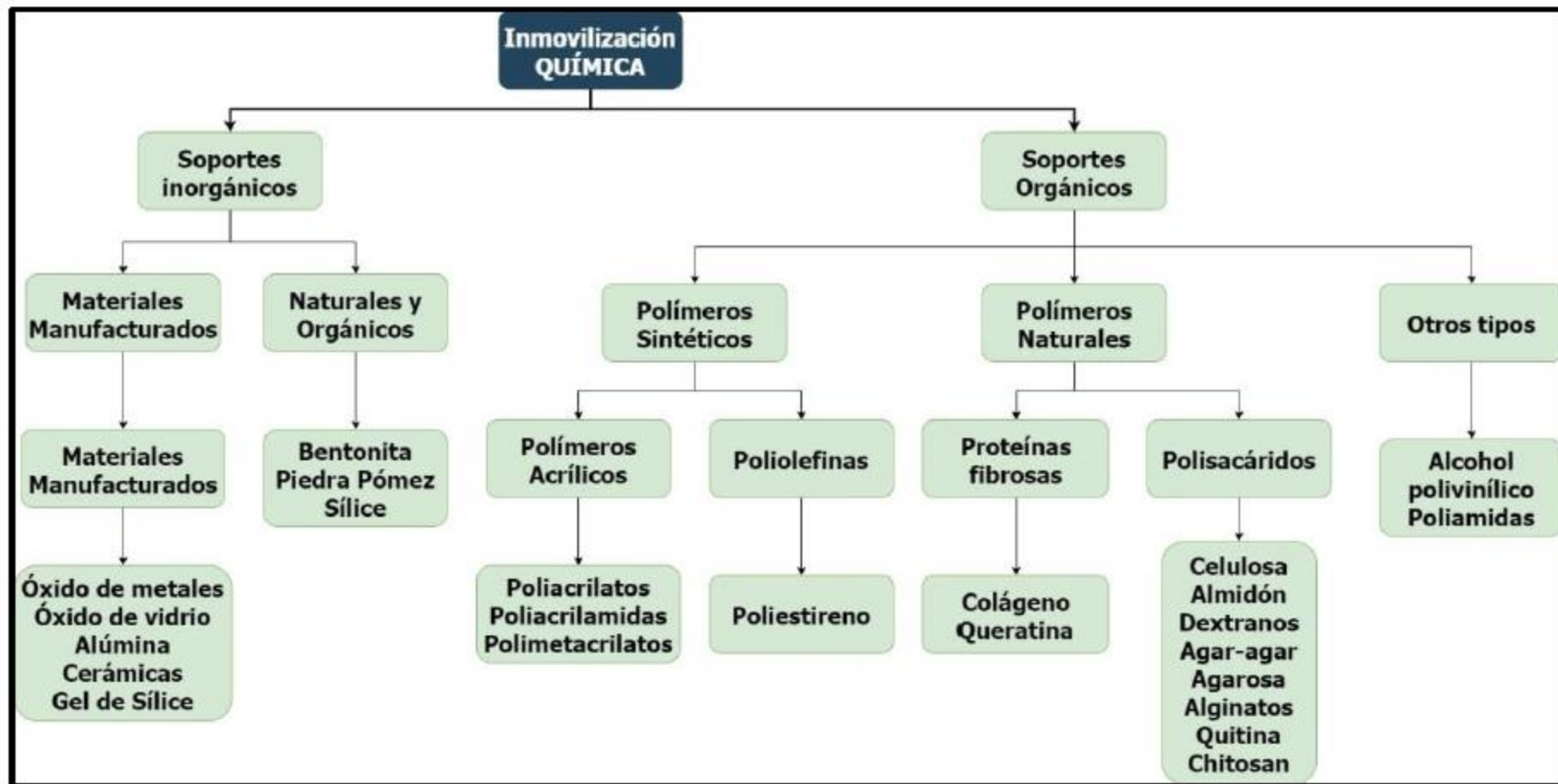
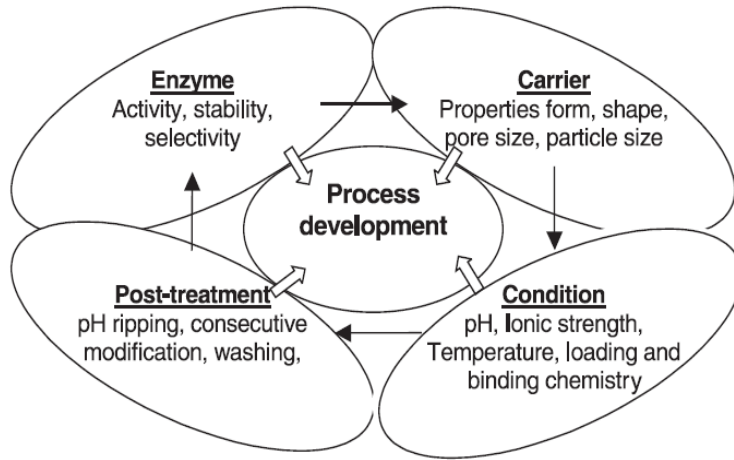


Figura 9. Esquema de los materiales más utilizados en la inmovilización química de enzimas según su origen sean orgánicos o inorgánicos y ejemplos. Elaboración propia.



Scheme 1.4 Illustration of general procedures for enzyme immobilization.

Tabla 6. Parámetros característicos para analizar enzimas inmovilizadas

Características	Parámetros de Importancia
Enzima	Propiedades bioquímicas: Masa molecular, grupos funcionales en superficie de proteína, pureza. Parámetros cinéticos: Actividad específica, perfiles de pH y temperatura, parámetros cinéticos de actividad e inhibición, perfiles de estabilidad vs pH y temperatura, solventes, contaminantes, impurezas
Soporte	Características químicas. Bases químicas y composición, grupos funcionales, posibles cambios en su comportamiento, volumen accesibles de matriz, tamaño de poro, estabilidad química del soporte. Propiedades mecánicas. diámetro de la partícula, resistencia al flujo, velocidad de sedimentación, abrasión
Enzima inmovilizada	Método de inmovilización. Rendimiento de la enzima activa, atrapamiento de proteína, parámetros cinéticos intrínsecos. Efectos de transferencia de masa. Diferentes concentraciones de solutos al interior y afuera de las partículas catalíticas. Difusión interna y externa. Estabilidad. Estabilidad operacional y de almacenamiento. Rendimiento. productividad.

ELECCION DEL METODO DE INMOVILIZACION

↪ Se busca un procedimiento sencillo y barato con el que se obtenga un producto que conserve la actividad y que tenga una estabilidad operacional elevada

Characteristics	Adsorption	Covalent binding	Entrapment	Membrane confinement
Preparation	Simple	Difficult	Difficult	Simple
Cost	Low	High	Moderate	High
Binding force	Variable	Strong	Weak	Strong
Enzyme leakage	Yes	No	Yes	No
Applicability	Wide	Selective	Wide	Very wide
Running Problems	High	Low	High	High
Matrix effects	Yes	Yes	Yes	No
Large diffusional barriers	No	No	Yes	Yes
Microbial protection	No	No	Yes	Yes

EFECTOS DE LA INMOVILIZACION

- Cambios en la estabilidad:
 - estabilización conformacional
 - protección frente a proteasas
 - no hay agregación intermolecular
 - alteración del microentorno
- Efectos en la actividad enzimática:
 - pérdida total
 - disminución:
 - efectos difusionales
 - efectos electrostáticos
 - impedimento estérico
 - efectos en el microentorno

APLICACIONES DE LA ENZIMAS INMOVILIZADAS

Las aplicaciones más importantes de las enzimas inmovilizadas se pueden clasificar en:

1. Aplicaciones analíticas: biosensores
2. Aplicaciones médicas: tratamientos con enzimas inmovilizadas
3. Aplicaciones industriales: en la industria química, farmacéutica, alimentaria y de tratamiento de residuos.



biosensores

- Los biosensores son instrumentos híbridos que transforman información química en una señal analíticamente útil a través de un mecanismo bioquímico
- Sistema receptor: componente biológico que interacciona específicamente con un dado analito
- Transductor fisicoquímico: amplifica la señal resultante de la interacción desde un nivel molecular a uno macroscópico

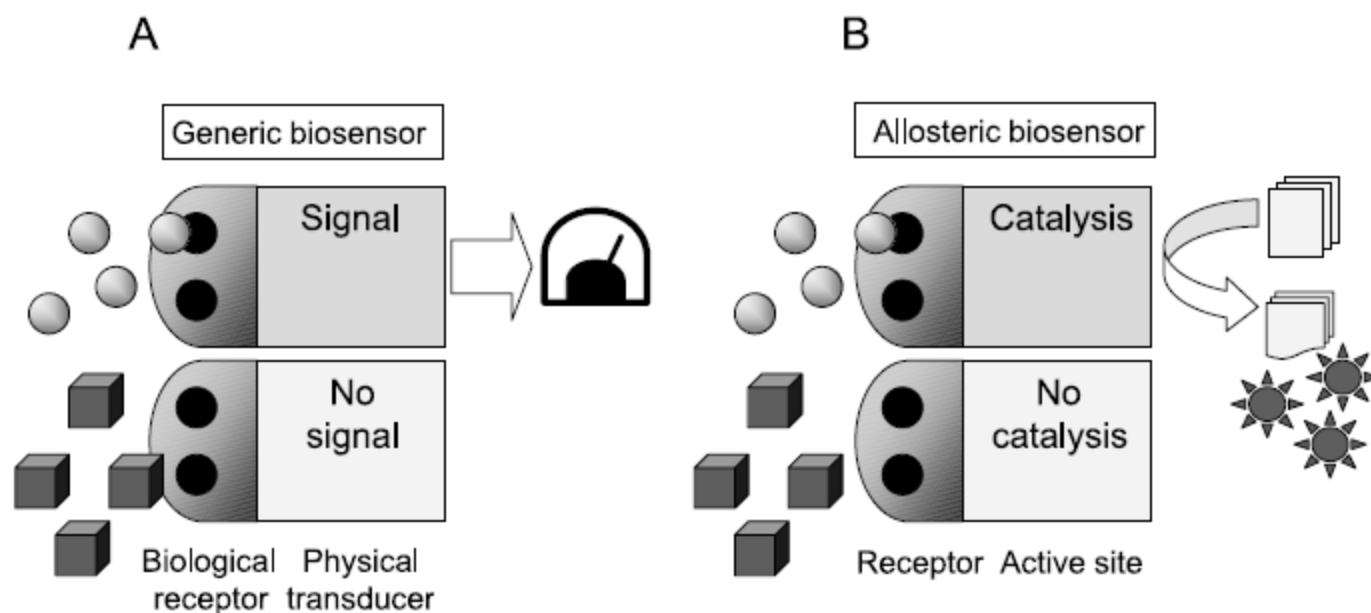


Fig. 1. Generic biosensors (A) are hybrid devices including a biological component acting as the analyte-binding site, and a physicochemical signal transducer that converts the specific interaction with the analyte into a macroscopic signal. Allosteric enzymatic sensors (B) respond to specific effectors through variations (generally up to modulation) of the catalysis rate. In these compact biosensors, the enzyme itself contains both the receptor site and the signal transducer (the catalytic site). The signal is transmitted to the active site by conformational changes triggered by the adaptive binding of the analyte, and the products monitored by standard analytical procedures. In general, the analyte enhances the specific activity from moderate to high. Ideally, the enzyme biosensor should be inactive but fully activable by the effector.

Características de los Biosensores

Las principales necesidades que presenta este sector son el disponer de aparatos compactos, portátiles capaces de realizar medidas en línea, controlar los procesos de producción y detectar un amplio rango de parámetros de interés

- **Alta sensibilidad** para el análisis de determinados analitos, incluso a concentraciones de partes por billón.
- **Alta selectividad** para que el dispositivo interaccione sólo con el compuesto de interés. Para ello se necesitan elementos de reconocimiento muy específicos.
- **Alta fiabilidad**
- **Tiempo de vida largo.** Las nuevas alternativas basadas en moléculas biomiméticas cuentan con una vida media mayor que los componentes biológicos.
- **Bajo costo**
- **Tiempo de análisis corto** que posibilite una actuación rápida en caso de detectar problemas
- **Pretratamiento de la muestra innecesario.** En determinados casos es imprescindible las etapas de concentración y purificación (detección de microorganismos patógenos)
- **Manejo sencillo**
- **Análisis en tiempo real.** Esta característica es importante en el control de procesos
- **Portátiles** (realización de análisis in situ)
- **Automatizables.** Facilita su integración dentro de sistemas de monitorización de procesos industriales.
- **Miniaturizables**
- **Requerimientos operativos mínimos.** Es el caso de los biosensores que incorporan moléculas biomiméticas.
- Capacidad de **multi-análisis.** Determinación de diferentes analitos de forma simultánea)
- **Versatilidad** que permite el diseño de dispositivos a la carta



Clasificación de Biosensores

Los biosensores se pueden clasificar de múltiples maneras en función de:

- La **naturaleza del elemento de reconocimiento**: enzima, orgánulo, tejido o célula completa, anticuerpo, receptor biológico, ácidos nucleicos, aptámeros, etc.
- **Tipo de interacción** entre el elemento de reconocimiento y el analito: sensores biocatalíticos y sensores de bioafinidad
 - Método de **detección de la interacción**. Directa o indirecta
- **Sistema de transducción**: electroquímico, óptico, nanomecánico, termométrico, Piezoeléctrico (máscos, gravimétricos, acústicos), etc.

- Entre **las ventajas que aporta un biosensor** caben destacar su especificidad, su alta sensibilidad, su rápida velocidad de respuesta, simplicidad en la aplicación y la capacidad de monitorización continua.
- Estos dispositivos además presentan otras características interesantes: su capacidad de inclusión en sistemas integrados, su facilidad de automatización, su capacidad de trabajar en tiempo real y su versatilidad, entre otras.
- El primer biosensor descrito fue desarrollado por Clark y Lyon en 1962; se trataba de un sensor enzimático que determinaba la concentración de glucosa en sangre

Tabla 3: Biosensores utilizados para la detección de distintos analitos

Analito	Tipo biosensor
Aditivos alimentarios	Generalmente se emplean Biosensores enzimáticos
Fármacos (tratamiento de animales)	Biosensores de bioafinidad principalmente, combinados con transductores ópticos de tipo SRP
Residuos de plaguicidas y fertilizantes	◆ Biosensores enzimáticos (Fertilizantes y plaguicidas) ◆ Transductores amperométricos y ópticos (Herbicidas)
Otros contaminantes	◆ inmunosensores, biosensores enzimáticos y biosensores con células completas (Compuestos orgánicos) ◆ biosensores que incorporan microorganismos modificados genéticamente y enzimas (metales pesados) En ambos casos los sistemas de transducción destacados son los electroquímicos y ópticos
Biotoxinas	Biosensores basados en reacciones de bioafinidad, mediante síntesis de anticuerpos específicos contra estas toxinas o en reacciones biocatalíticas.
Microorganismos patógenos	◆ Principalmente biosensores de tipo inmunológico combinados con transductores piezoeléctricos, ópticos, bioluminiscentes o de impedancia. ◆ También detección indirecta mediante marcaje con fluorescencia, detección de metabolitos microbianos y detección electroquímica ◆ Biosensores basados en ADN
Calidad alimentos (etanol, glucosa, almidón, colesterol, ácido fólico...)	◆ Biosensores amperométricos, SPR, electroquímico.
Evaluación de vida útil (determinación de polifenoles, ácidos grasos de cadena corta, aminas, histamina...)	◆ Biosensores amperométricos, electroquímico, potenciométrico.

BIOSENSORES PARA ANALISIS CLINICOS:

- Carbohidratos: glucosa (*glucosa oxidasa*)

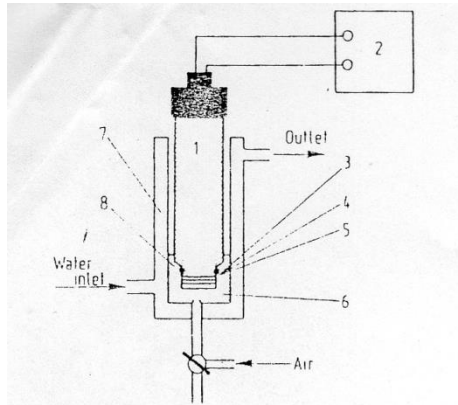


Figure 1. Schematic diagram of the enzyme electrode for the determination of glucose. 1: Oxygen electrode, 2 recorder, 3 Teflon membrane, 4 glucose oxidase-polyvinylchloride membrane (40 μm), 5 nylon net, 6 sample solution, 7 water jacket, 8 O-ring.

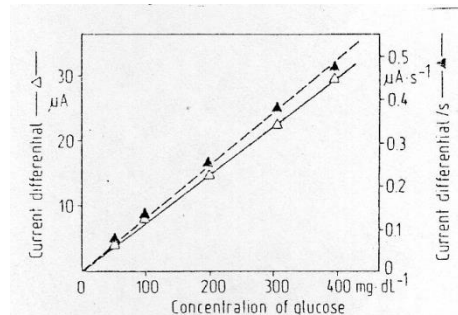


Figure 2. Calibration curves of the enzyme electrode. – Preparation of the enzyme membrane and the determination were performed under standard conditions.

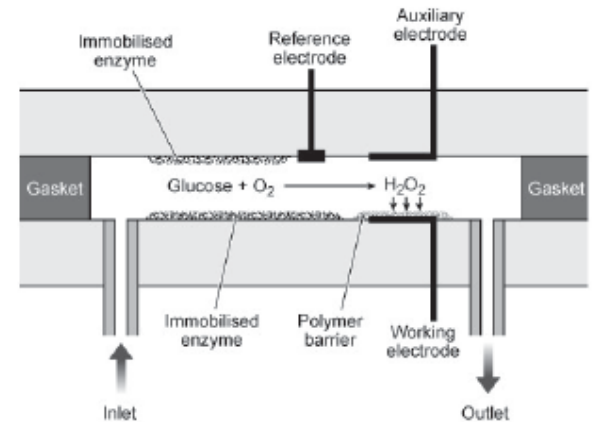


Fig. 2 Diagram of the glucose sensor showing the electrode configuration, the polymer barrier deposited onto the working electrode, and the surface where the enzyme (glucose oxidase) is immobilized.

- Aminoácidos: ácido glutámico (*glutamato oxidasa*)

En general: *L*-aa oxidasa + electrodo de O_2 o $\text{Pt} (\text{H}_2\text{O}_2) \rightarrow$ poco selectivo

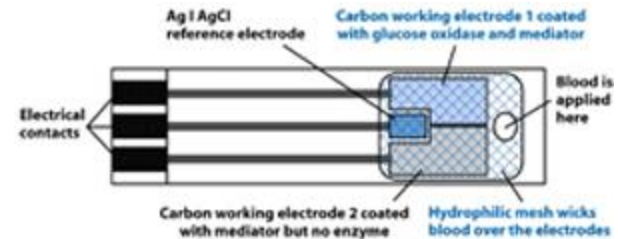


Figure 13-10b
Quantitative Chemical Analysis, Seventh Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

BIOSENSORES PARA ANALISIS CLINICOS:

- **Acidos orgánicos:** lactato (*lactato oxidasa*)
piruvato (*pir oxidasa, pir decarboxilasa, LDH*)
- **de alcohol** (alcohol oxidasa)
- **para lípidos** (colesterol estearasa y colesterol oxidasa)

BIOSENSORES PARA PROCESOS Y ANALISIS AMBIENTALES:

- sensores de H_2O_2
(*catalasa*)

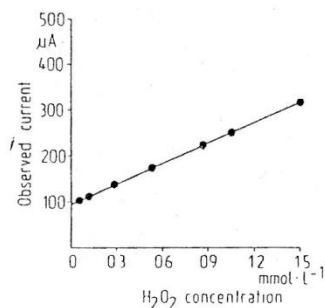
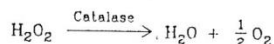
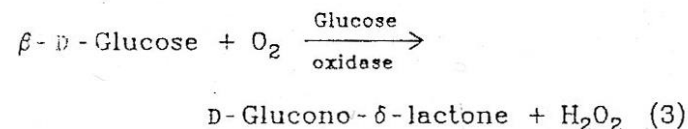
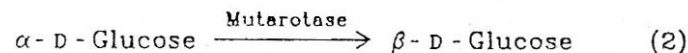
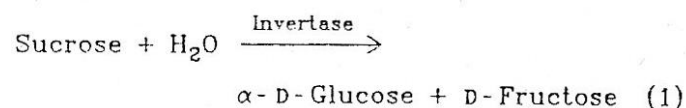


Figure 10. Calibration curve of the H_2O_2 sensor over the concentration range of 0–1.5 mmol L^{-1} at pH 6.2.



- sensores para sacarosa



OTROS:

- Monoaminas
- Hipoxantina
- Colina
- Iones inorgánicos

ENZIMAS ALOSTERICOS COMO BIOSENSORES PARA DIAGNOSTICO MOLECULAR

El **sitio alostérico** actúa como el componente de reconocimiento y el **sitio activo** como elemento transductor y la enzima entera integra ambas piezas a través de su propia estructura y transmite la señal de unión a través de cambios conformacionales

Ejemplo:

PROTEASA NEURAL: inspirado en el principio de regulación intraestérica

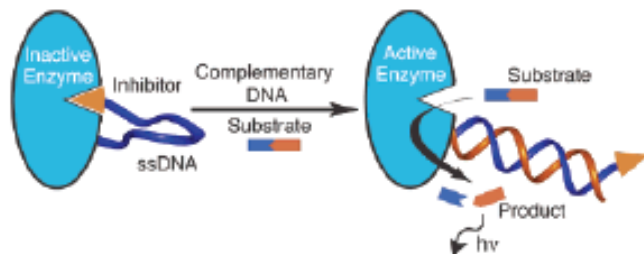


Figure 1. Schematic representation of an intrasterically inactivated inhibitor-DNA-enzyme (IDE) construct (left) and the DNA hybridization-triggered enzyme activation (right). IDE can be used to sense low concentrations of complementary DNA because of its built-in capacity for signal amplification via rapid substrate turnover.

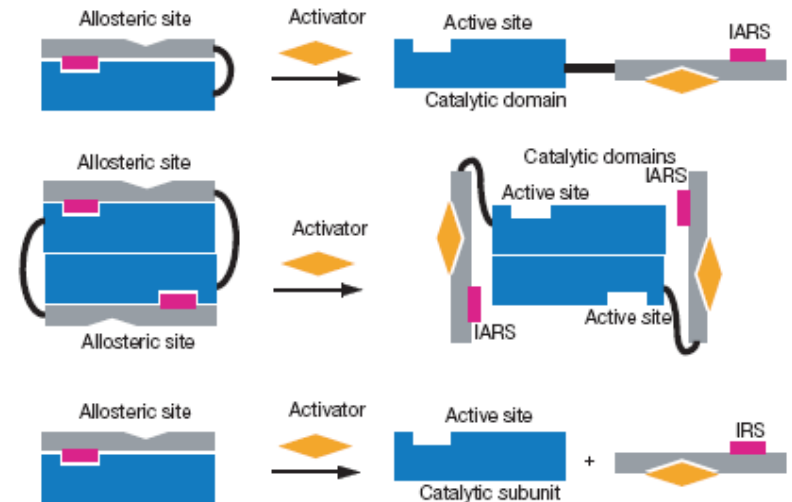


Figure 1 Representation of intrasteric regulation. **a.** Intrasteric regulation of enzymes by intramolecular interactions, through an intrasteric autoregulatory sequence (IARS) that is contiguous with the catalytic domain. The enzyme is maintained in an inactive state through the binding of the IARS in an intramolecular fashion that masks the active site. Allosteric activation by an activatory ligand or protein results in the release of the IARS from the active site. **b.** Intrasteric regulation of homomeric enzymes by intermolecular interactions, through an IARS in *trans*. The IARS interacting with one subunit is a part of another subunit. **c.** Intrasteric regulation of heteromeric enzymes by intermolecular interactions, through an intrasteric regulatory sequence (IRS) on a distinct subunit.