

Cinética de enzimas inmovilizadas

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

Efectos de la inmovilización sobre las enzimas

1. *Efectos sobre la estabilidad*
2. *Efectos sobre la actividad*
 - 2.a. *Efectos sobre el biocatalizador propiamente dicho*
 - 2.a.1. *Restricciones estéricas*
 - 2.a.2. *Cambios conformacionales*
 - 2.b. *Efectos sobre el microambiente*
 - 2.b.1. *Efectos de partición*
 - 2.b.2. *Limitación a la difusión*
 - internas*
 - externas*

- **Efectos sobre la actividad: efectos del microambiente**

La enzima inmovilizada se mantiene en un medio físico muy diferente al existente en el grueso de la solución

Conducen a la pérdida parcial de la actividad catalítica.

- **Fenómenos de partición**

Ocurren cuando las concentraciones de sustrato o de otros compuestos relacionados con la actividad son diferentes en la superficie del soporte y en el grueso de la solución

Parámetros moleculares responsables de la partición:

- Tamaño
- Interacciones electrostáticas
- Interacciones hidrofóbicas

Modificaciones más importantes

- Diferencia de pH en la proximidad de la enzima inmovilizada
- Alteraciones en la afinidad por el sustrato

Efectos sobre la actividad: efectos del microambiente

- ***Fenómenos de partición***

Alteraciones en la afinidad por sustrato \Rightarrow cambios en la K_m de la enzima inmovilizada

1. Tamaño del sustrato y de los poros del soporte
2. Naturaleza hidrofóbica o hidrofílica del sustrato y del soporte :
 - sustratos hidrofílicos \Rightarrow atraídos soporte hidrofílico \Rightarrow aumento en la concentración local de sustrato
3. Distribución de cargas del sustrato y del soporte
 - sustratos con carga + \Rightarrow atraídos soportes con carga - \Rightarrow aumento en la concentración local del sustrato

K_m enzima inmovilizado = K_m/P

P: coeficiente de partición ($P = C_s/C_b$)

C_s = concentración en la superficie del polímero

C_b = concentración en la solución

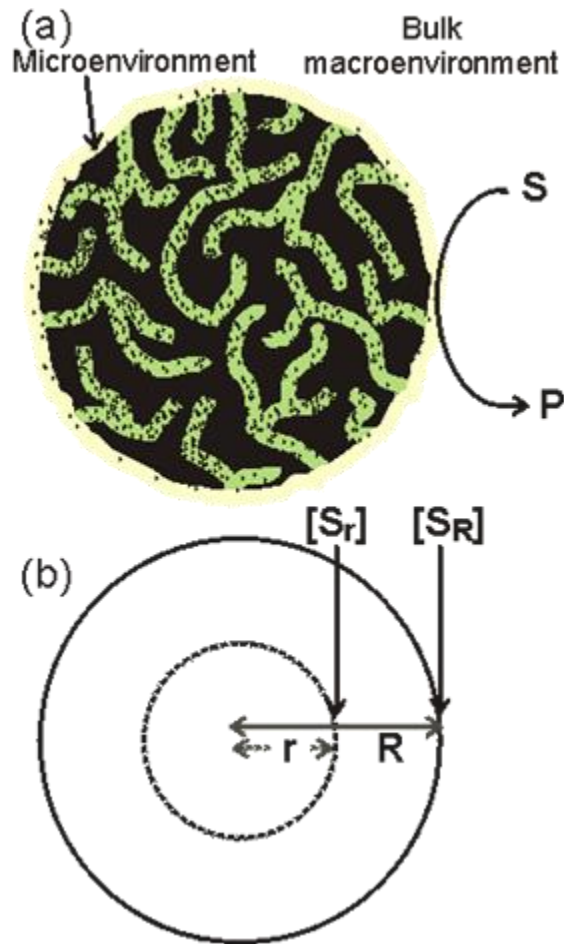


Figure 3.6. A schematic cross-section of an immobilised enzyme particle (a) shows the macroenvironment and microenvironment. triangular dots represent the enzyme molecules. The microenvironment consists of the internal solution plus that part of the surrounding solution which is influenced by the surface characteristics of the immobilized enzyme. Partitioning of substances will occur between these two environments. Substrate molecules (S) must diffuse through the surrounding layer (external transport) in order to reach the catalytic surface and be converted to product (P). In order for all the enzyme to be utilized, substrate must also diffuse within the pores in the surface of the immobilized enzyme particle (internal transport). The porosity (\square) of the particle is the ratio of the volume of solution contained within the particle to the total volume of the particle. The tortuosity (\square) is the average ratio of the path length, via the pores, between any points within the particle to their absolute distance apart. The tortuosity, which is always greater than or equal to unity, clearly depends on the pore geometry. The diagram exaggerates dimensions for the purpose of clarity. Typically, the diameter of enzyme molecules (2 - 10 nm) are 1 - 2 decades smaller than the pore diameters which are 2 - 4 decades smaller than the particle diameters (10 - 2000 μm); the microenvironment consisting of a diffusion layer ($\sim 10 \mu\text{m}$ thick) and a thinner partition layer ($\sim 20 \text{nm}$ thick). (b) The concentration of the substrate at the surface of the particles (radius R) is $[S_R]$ whereas the internal concentration at any smaller radius (r) is the lower value represented by $[S_r]$.

Efectos de partición

Para compuesto cargados, cuando el soporte está cargado: se puede definir un coeficiente de Partición (**P**) tal que :

$$C_s = C_b P$$

Para H^+ :

$$P_{H^+} = \exp\left(-e \frac{\Psi}{kT}\right)$$

Por tanto

$$[H^+]_s = [H^+]_b \exp\left(-e \frac{\Psi}{kT}\right)$$

$$\Delta pH = pH_s - pH_b = -\log[H^+]_s + \log[H^+]_b = 0.43\left(e \frac{\Psi}{kT}\right)$$

$(H^+)_s$ = conc. de protones en la superficie de la matriz

$(H^+)_b$ = conc. de protones en la solución

e = carga electrónica

k = cte. de Boltzman

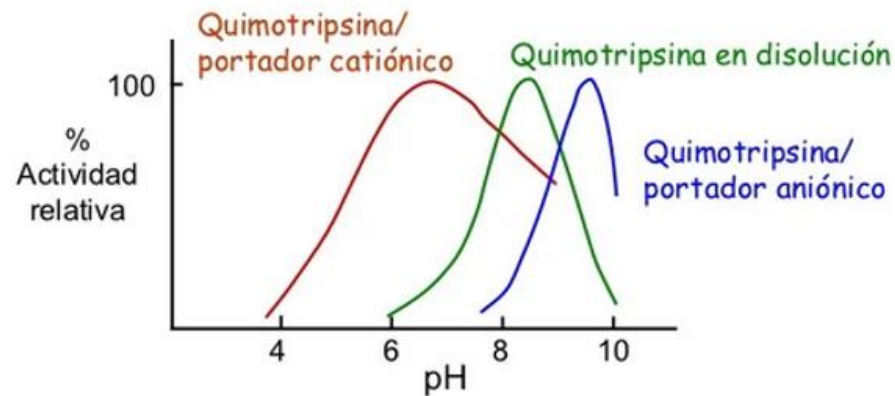
T = temperatura absoluta

Ψ = potencial electrónico

En general, para un efector cargado:

$$\frac{C_s}{C_b} = \exp\left(-Ze\frac{\Psi}{kT}\right)$$

$$v = \frac{k[E_0]}{1 + \frac{K_m}{[S_0]\exp\left(-Ze\frac{\Psi}{kT}\right)}}$$

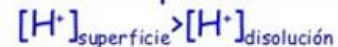


Sobre soportes catiónicos:



$$\text{pH}_{\text{superficie}} > \text{pH}_{\text{disolución}}$$

Sobre soportes aniónicos:



$$\text{pH}_{\text{superficie}} < \text{pH}_{\text{disolución}}$$

Efectos difusionales del soluto

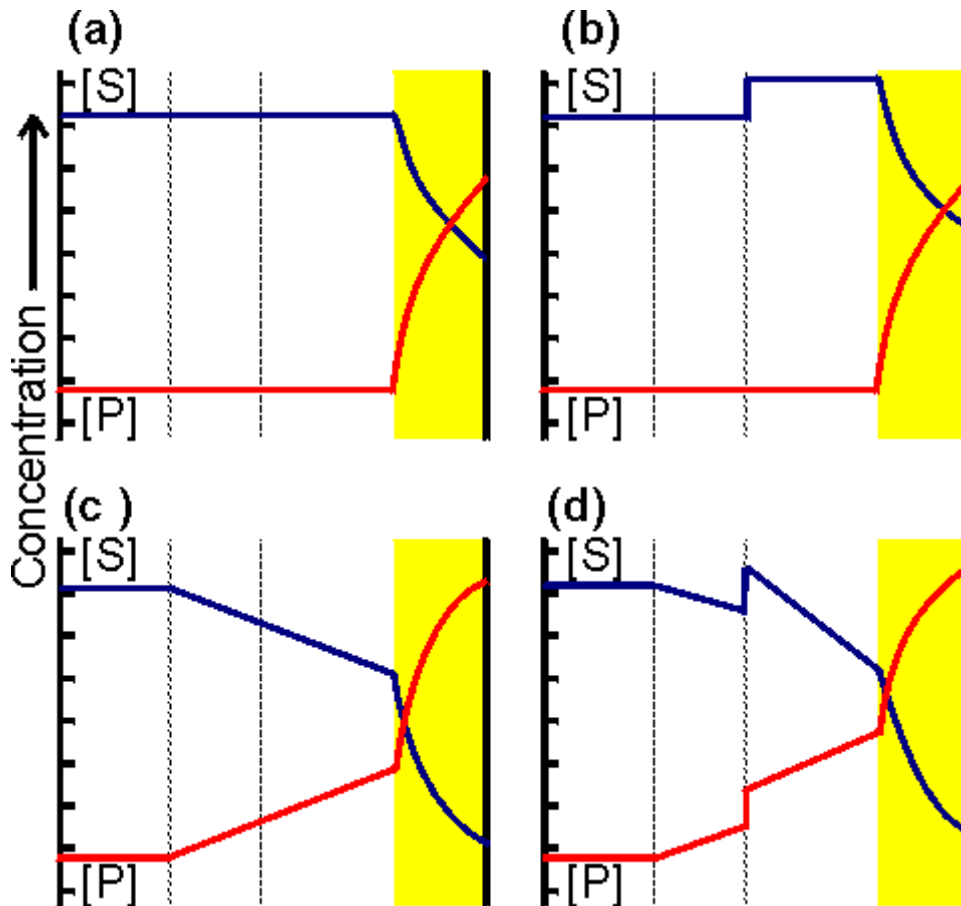


Figure 3.10. Schematic diagram showing the concentration gradients of substrate and product that may be produced around a porous particle of an immobilised enzyme. (a) concentration gradient due solely to reaction and internal diffusion within the particle; (b) as (a) but with additional concentration gradients due to partition of substrate and product into the microenvironment; (c) as (a) but with an additional concentration gradients due to external diffusion to the surface of the particle; (d) concentration gradients due to the combined effects of partition and diffusion

- external diffusion where the transport of substrates towards the surface, and products away, is in series with the catalytic conversion of substrates to products occurring at the surface (the processes being consecutive)
- internal diffusion where the transport of the substrates and products, within the pores of immobilised enzyme particles, is in parallel with the catalysed reaction (the processes being simultaneous).

Efecto de restricciones difusionales externas

Si la restricción difusional es extrema y limitante

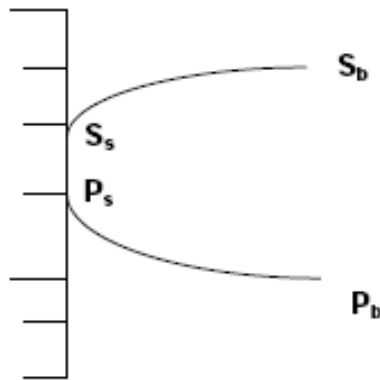
$$\bar{v} = J$$

Si no hay restricciones difusionales:

$$\bar{v} = \frac{V_{\max}[S_b]}{K_m + [S_b]}$$

En situaciones intermedias ambos procesos (difusión y catálisis) afectan la velocidad de la reacción

$$J = h([S_b] - [S_s])$$



J= flujo

h= coeficiente de transporte externo

En el estado estacionario la velocidad de la reacción catalizada por la enzima es igual al flujo de sustrato. Por tanto:

$$J = \bar{V} \quad h([S_b] - [S_s]) = \frac{\bar{V}_{\max}[S_s]}{K_m + [S_s]}$$

Situaciones limites antes mencionadas

- 1) Reacción cinéticamente controlada:

$$\bar{v}_{inh} = \frac{\bar{V}_{\max}[S_s]}{K_m + [S_s]}$$

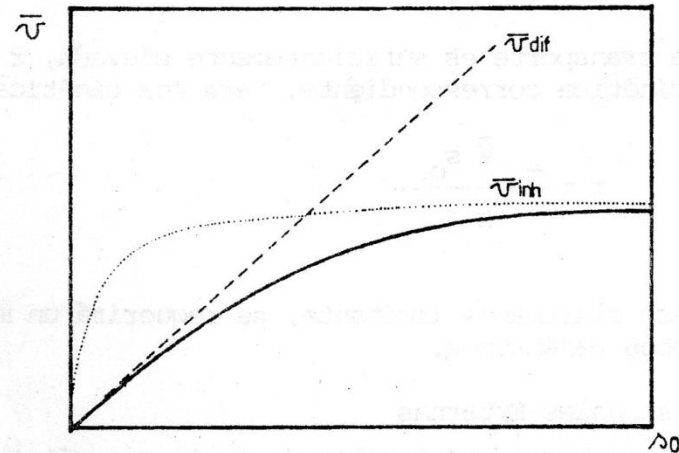
- 2) Reacción limitada por la difusión:

$$\bar{v}_{dif} = h([S_b] - [S_s])$$

v intrínseca= cinética de la enzima soluble

v inherente= cinética de la enzima inmovilizada en ausencia de factores modificantes

v efectiva= cinética de la enzima inmovilizada en presencia de factores modificantes



Situación general

$$\frac{h([S_b] - [S_s])}{\overline{K_m}} = \frac{\overline{V_{\max}} [S_s]}{1 + \frac{[S_s]}{\overline{K_m}}}$$

$$\frac{([S_b] - [S_s])}{\overline{K_m}} = \frac{\overline{V_{\max}} [S_s]}{h\overline{K_m} \left(1 + \frac{[S_s]}{\overline{K_m}}\right)}$$

Parámetros adimensionales

$$\beta_b = \frac{[S_b]}{\overline{K_m}}$$

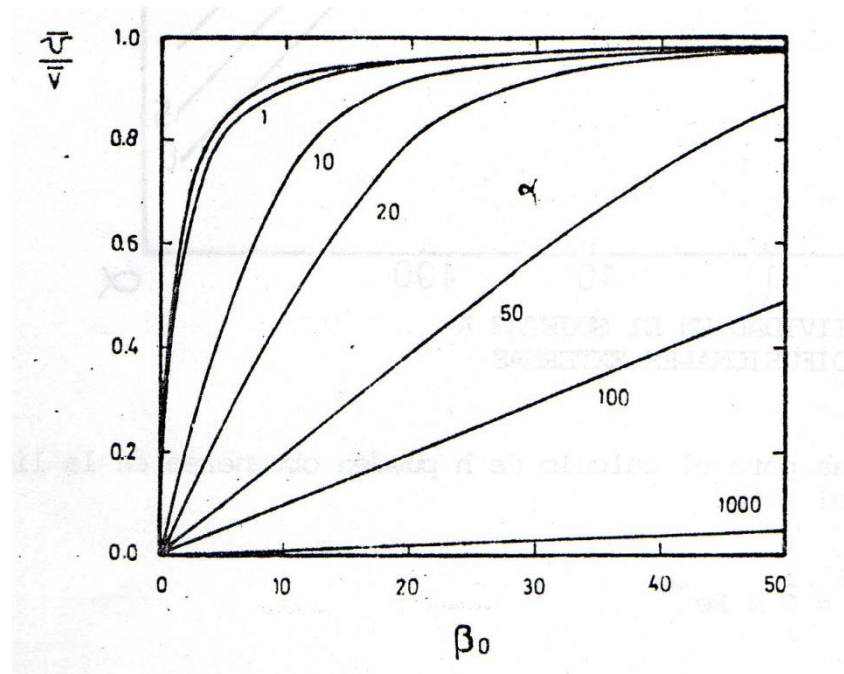
$$\beta_s = \frac{[S_s]}{\overline{K_m}}$$

$$\alpha = \frac{\overline{V_{\max}}}{h\overline{K_m}}$$

$$\beta_b - \beta_s = \frac{\alpha \beta_s}{1 + \beta_s} = \alpha \frac{\bar{v}}{\overline{V_{\max}}}$$

α es también llamado μ_s o coeficiente difusional externo. h es el coeficiente de transporte externo.

Representación del comportamiento cinético de una EI sujeta a restricciones difusionales externas



Las restricciones de difusión disminuyen al aumentar la agitación o utilizando un sustrato mas concentrado o menos viscoso

Factor de efectividad (η)

$$\eta = \frac{V_{efectiva}}{V_{intrinseca}} = \frac{\frac{V_{max} [S_s]}{K_m + [S_s]}}{\frac{V_{max} [S_b]}{K_m + [S_b]}} = \frac{\beta (1 + \beta_b)}{\beta_b (1 + \beta_s)}$$

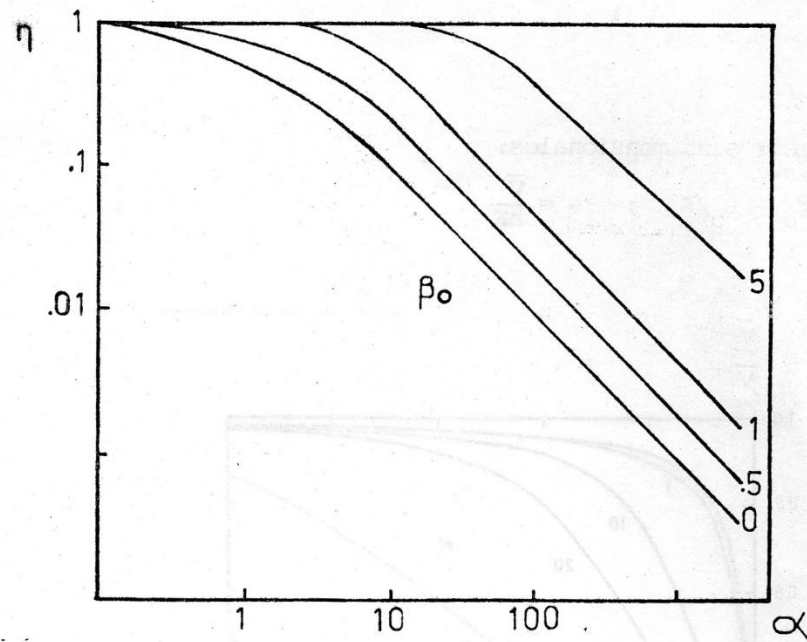
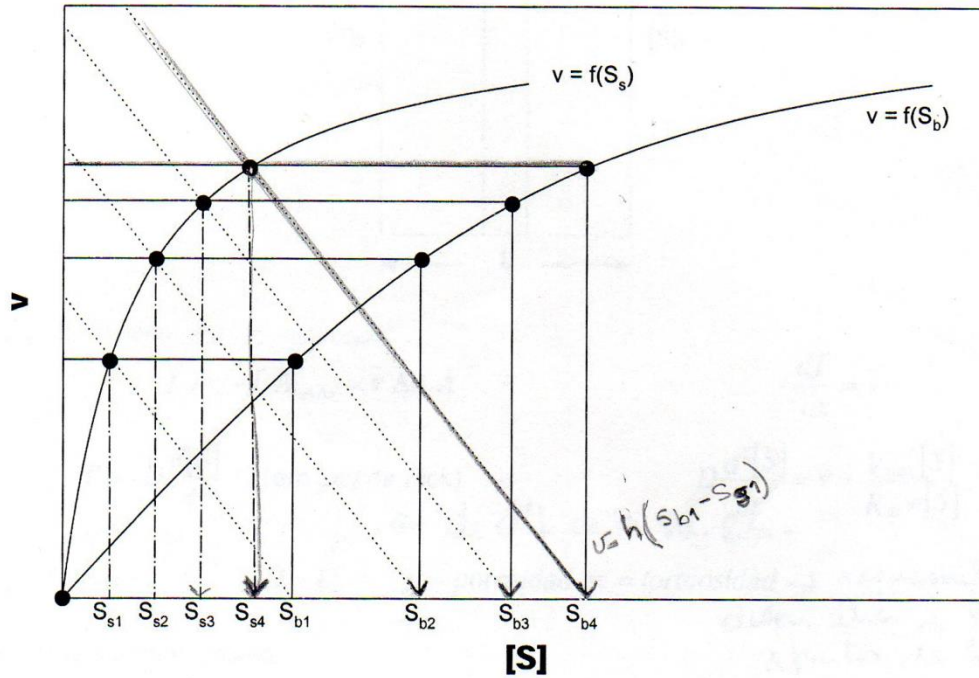


FIG.23 FACTOR DE EFECTIVIDAD EN EI SUJETAS A RESTRICCIONES DIFUSIONALES EXTERNAS

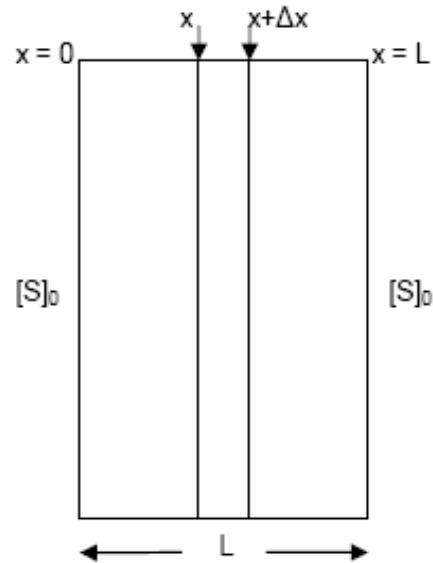
Estimación de parámetros cinéticos inherentes de enzimas inmovilizadas sujetas a restricciones difusionales externas



Cinética aparente: $v = f([S_b], V_{\max}^{app}, K_m^{app})$

Cinética inherente: $v = f([S_s], \overline{V_{\max}}, \overline{K_m})$

Efecto de restricciones difusionales internas:



L= espesor de la membrana
x= distancia

$$J' A|_x - J' A|_{x+\Delta x} = \bar{v} \Delta x A$$

$$-\frac{dJ'}{dx} = \bar{v}$$

$$J' = -D \frac{d[S]}{dx} \quad (\text{1era Ley de Fick})$$

$$D \frac{d^2[S]}{dx^2} = \bar{v} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$D = D_0 \frac{\chi}{\tau} \quad ; \chi = \text{porosidad} \quad ; \tau = \text{tortuosidad}$$

J= flujo

D= coeficiente de difusión efectivo

D₀= coeficiente de difusión de la sol. libre

Parámetros adimensionales

$$\beta_b = \frac{[S_b]}{K_m} \qquad \beta = \frac{[S]}{K_m} \qquad z = \frac{x}{L}$$
$$\frac{d^2 \beta}{dz^2} - D \frac{\overline{V_{\max}} L^2}{K_m} \frac{\beta}{1 + \beta} = \frac{d^2 \beta}{dz^2} - \phi^2 \frac{\beta}{1 + \beta} = 0$$

donde ϕ es el módulo de Thiele.

$$\phi = L \sqrt{\frac{\overline{V_{\max}}}{K_m D}}$$

L es el espesor de la membrana en la cual están inmovilizadas las enzimas. En el caso de otras geometrías se define un L_{eq} el que es igual al Volumen de la partícula dividido por el área superficial de la misma.

$$\frac{d^2 \beta}{dz^2} - \phi^2 \frac{\beta}{1 + \beta} = 0$$

Condiciones de contorno

I

$$z = 0$$
$$\beta = \beta_0$$

II

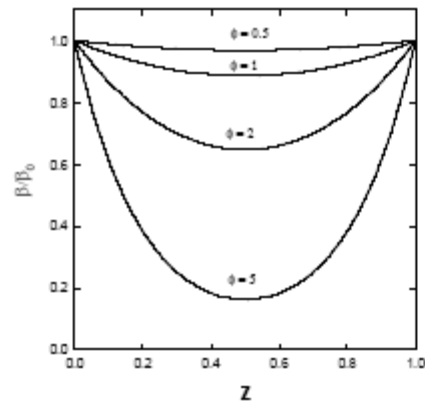
$$z = 0.5$$
$$\frac{d\beta}{dz} = 0$$

Hay solución analítica solo si se asume cinética de primer orden ($[S_b] \ll K_m$):

$$\beta = \beta_0 \frac{\cosh(\phi * (z - 0.5))}{\cosh \phi * 0.5}$$

Factor de efectividad puntual (η):

$$\eta = \frac{\beta}{\beta_0} = \frac{\cosh(\phi * (z - 0.5))}{\cosh \phi * 0.5}$$



Factor de efectividad global ($\bar{\eta}$):

$$\bar{\eta} = \frac{\int_0^1 \eta dz}{\int_0^1 dz} = \frac{\tanh \frac{\phi}{2}}{\frac{\phi}{2}}$$

$$\phi = L \sqrt{\frac{V_{\max}}{K_m D}}$$

