

Capítulo III

PURIFICACIÓN E INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS INDUSTRIALES

José Manuel Guisán Seijás

RESUMEN

La purificación e inmovilización sencilla y correcta de una enzima nos permitirá diseñar biocatalizadores heterogéneos con una gran cantidad de enzima por gramo de catalizador y un elevado porcentaje de actividad catalítica por molécula de enzima.

También existen protocolos de inmovilización que nos permiten mejorar notablemente las propiedades funcionales de las enzimas: actividad, estabilidad, selectividad, posibilidades de reactivación, etc.

De este modo, la implantación masiva de las enzimas como catalizadores industriales será cada día más sencilla.

Palabras clave: Enzimas recombinantes; Cromatografía de afinidad; Inmovilización por unión covalente multipuntual.

ABSTRACT

Purification and immobilization of industrial enzymes

The development of simple and inexpensive protocols for purification and immobilization of enzymes is a key point in Enzyme Technology. In this way, improved heterogeneous biocatalyst can be prepared. A high amount of pure enzyme will immobilized per gram of support and each immobilized enzyme molecule will retain a high percentage of catalytic activity.

There are also more complex protocols that allow the improvement of

functional enzyme properties via immobilization strategies: activity, stability, selectivity, possibilities for reactivation, etc.

In this way, a massive implementation of enzymes as industrial catalyst is becoming much easier.

Keywords: Recombinant enzymes; Affinity chromatography; Enzyme immobilization by multipoint covalent attachment.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Las enzimas como catalizadores industriales*

Las enzimas poseen unas excelentes propiedades catalíticas (actividad, selectividad y especificidad) y por ello son capaces de catalizar los procesos químicos más complejos en las condiciones experimentales y medioambientales más suaves (1). Las enzimas son potencialmente excelentes catalizadores en muchas áreas de la industria: síntesis de biocombustibles, síntesis de fármacos, química de alimentos, biosensores, etc.

Sin embargo, las enzimas se han ido modificando, a través de la evolución biológica, para optimizar la fisiología de los seres vivos, sometidos a estrés y necesitando una excelente modulación de su metabolismo. Por este motivo, las enzimas, a pesar de sus excelentes propiedades catalíticas, tienen también algunas características poco útiles para su implantación industrial: son catalizadores solubles, generalmente inestables, se inhiben por altas concentraciones de sustratos y productos, actúan principalmente sobre sus sustratos naturales y en condiciones fisiológicas, se encuentran mezcladas con cientos de proteínas de las que son difíciles de separar, etc. Por ello, en la inmensa mayoría de los casos, las enzimas tienen que ser notablemente mejoradas antes de su implantación industrial.

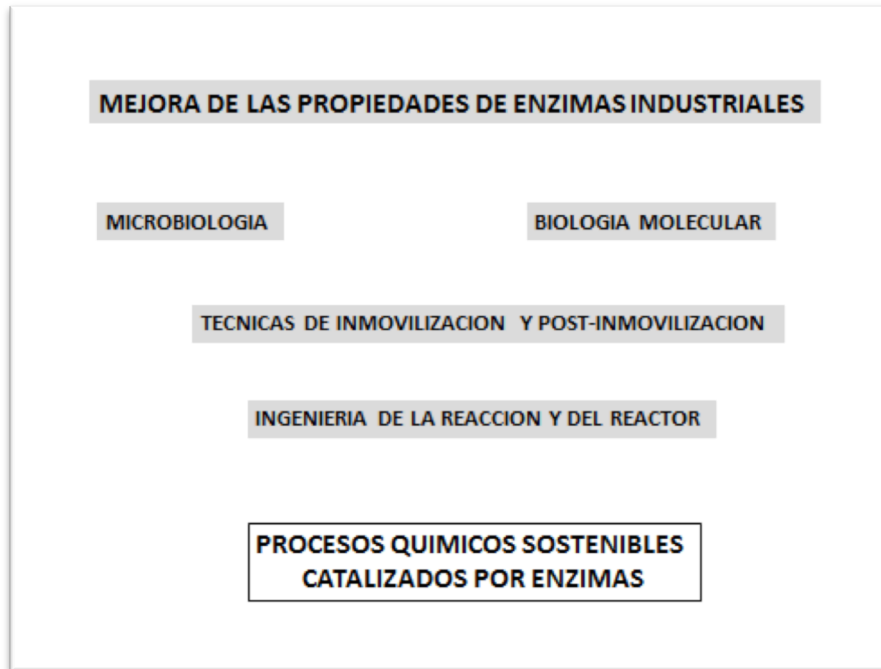


Figura 1.

1.2. Derivados inmovilizados de enzimas puras y mejoradas

Por razones técnicas y económicas, la mayoría de los procesos catalizados por enzimas se mejoran notablemente si podemos reusar la enzima en numerosos ciclos de reacción. Desde este punto de vista, la inmovilización de enzimas podría ser definida como cualquier técnica que permita que una enzima se pueda reusar o utilizar en continuo (2,3). Por un lado, el desarrollo de métodos de inmovilización sencillos y de bajo coste es muy importante. Por otro lado, la posible mejora de las propiedades funcionales de las enzimas (actividad, selectividad, estabilidad) sería también muy interesante (3,4). Finalmente, la utilización de enzimas puras mejoraría también los catalizadores industriales, pues permitiría obtener derivados inmovilizados mucho más activos. Desde este punto de vista, en este capítulo vamos a comentar brevemente métodos sencillos de purificación de enzimas, métodos sencillos de inmovilización y métodos de inmovilización que nos permitan mejorar las propiedades funcionales de las enzimas (5).

2. PURIFICACIÓN DE ENZIMAS

El diseño de biotransformaciones enzimáticas requiere el uso de enzimas puras. De este modo: **a.-** las excelentes propiedades de selectividad y especificidad de las enzimas no se verán afectadas por otras enzimas presentes en los extractos crudos y que puedan modificar el mismo substrato u otros substratos que deseamos mantener intactos (p.e. en análisis o en tecnología de alimentos); **b.-** la preparación de derivados inmovilizados muy activos se mejora noblemente si disponemos de muestras de enzima pura. Por ejemplo, la inmovilización de enzimas sobre sólidos pre-existentes nos permitirá recubrir completamente los soportes con un 100% de moléculas de la enzima de interés que inicialmente solo representaba el 0,5-5 % de las proteínas expresadas por el microorganismo productor. Así pues, la purificación de enzimas, en principio un problema de bioquímica y biomedicina, se convierte ahora también en un problema clave de Ingeniería Química.

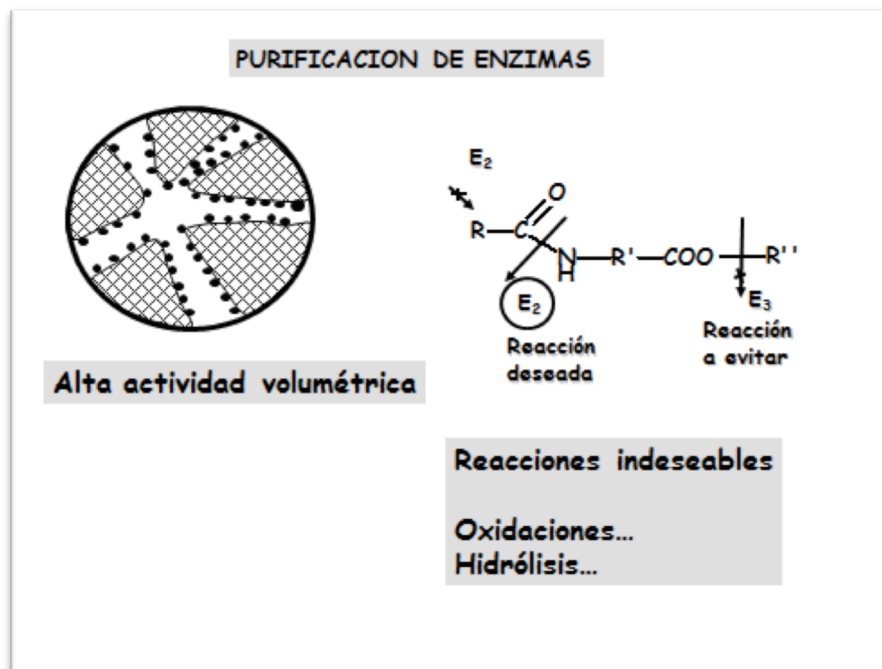


Figura 2.

2.1. Purificación de Enzimas Industriales

En general, la purificación de enzimas se puede considerar un problema complejo y costoso aunque en general bien resuelto. A veces, se necesitan varios pasos de purificación y los rendimientos son moderadamente bajos. Sin embargo, las Enzimas Industriales deben ser muy baratas sobre todo si las queremos utilizar para obtener productos de bajo valor añadido. Los métodos cromatográficos convencionales de purificación de enzimas son muy útiles para purificar pequeñas cantidades de enzimas de interés bioquímico a escala laboratorio, pero generalmente pueden ser poco útiles para purificar grandes cantidades de enzima industrial de bajo coste.

2.2. Métodos Cromatográficos basados en características muy específicas de las enzimas

En estos casos, sería relativamente sencillo diseñar protocolos de adsorción específica de las enzimas de interés (contaminadas únicamente con pequeñas trazas de impurezas) y de este modo la proteína podría ser purificada a homogeneidad en un solo paso cromatográfico y utilizando además una cantidad muy pequeña de soporte: p.e. 10 g de soporte cromatográfico podrían servirnos para purificar casi 1 g de la enzima de interés.



Figura 3.

La cromatografía de afinidad, se basa en la adsorción específica de una enzima sobre un inhibidor competitivo o un análogo de su sustrato que se ha unido a la superficie de un soporte. Se basa en una propiedad única o casi única de una enzima (su interacción con un sustrato). El principio es bastante lógico, pero el diseño de soportes cromatográficos adecuados es un poco más complejo.



Figura 4.

Por otro lado, las lipasas presentan un interesante mecanismo de adsorción interfacial sobre las gotas de sus sustratos naturales: los aceites y grasas. De un modo similar, las lipasas se adsorben selectivamente sobre soportes hidrofóbicos a muy baja fuerza iónica; condiciones en la que la inmensa mayoría de proteínas no se adsorbe sobre estos soportes.

2.3. Enzimas Industriales Recombinantes

Cada día es más frecuentes que las enzimas industriales no se produzcan en los microorganismos donde se sintetizan inicialmente sino que se expresen en hospedadores adecuados (p.e. *Escherichia coli*, *Sacharomyces*

cerevisae, *Pichia pastoris*, etc). Estos hospedadores crecen mucho más y mucho más rápidamente que la mayoría de los microorganismos. Además, las enzimas se pueden sobre-expresar (hasta constituir un 5-10% de todas las proteínas del hospedador). La purificación de enzimas recombinantes es mucho más sencilla:

a.- Por un lado quisiéramos resaltar la sobreexpresión de enzimas de termófilos en microorganismos mesófilos. Actualmente, la única enzima muy resistente al calor será la enzima recombinante, que se podrá purificar muy fácilmente de las enzimas naturales del hospedador (6).

b.- Por otro lado, las enzimas recombinantes, se pueden modificar con diferentes dominios que estarán únicamente presentes en la enzima recombinante y que no existirán en todas las proteínas del microorganismo hospedador. Posteriormente, diseñando un soporte cromatográfico capaz de adsorber los dominios añadidos, se podría purificar la proteína recombinante en un único paso.



Figura 5.

2.4. Enzimas recombinantes conteniendo dominios de poli-His

El dominio más utilizado para purificar enzimas recombinantes es una cola de poli-His (un péptido de 6 histidinas añadido en el residuo amino terminal o en el residuo carboxilo terminal). Es un dominio muy pequeño, que en la inmensa mayoría de los casos no debe alterar las propiedades funcionales de la enzima. Este dominio, se adsorbe muy intensamente sobre soportes que contienen quelatos metálicos: **a.-** soportes con grupos iminodiacético modificados con cationes divalentes (cobre, níquel, zinc y cobalto) y **b.-** soportes con grupos nitrilotriacético modificado con cationes trivalentes (p.e. níquel). Después de su adsorción, las enzimas se pueden desorber con concentraciones moderadas de imidazol (la cadena lateral de la histidina). Un problema de este método de purificación, consiste en que las proteínas naturales también se pueden adsorber sobre estos soportes de quelatos metálicos y ello complica la adsorción selectiva y la consiguiente purificación sencilla de estas enzimas industriales.

Adsorción de enzimas recombinantes vs enzimas nativas

Para lograr la adsorción selectiva de las proteínas recombinantes, debemos conocer bien el mecanismo de adsorción de las enzimas nativas y de las enzimas recombinantes. Las enzimas recombinantes, se adsorben mediante una unión muy fuerte entre cada dominio de histidinas (a través de dos His de cada dominio) con un único grupo quelato metálico. Por el contrario, las enzimas naturales se unen a través de uniones multipuntuales mucho más débiles que ocurren entre varias His o Cys y muchos quelatos metálicos de un soporte que está muy activado.

Una posible solución para evitar la adsorción de proteínas naturales, es la utilización de soportes muy poco activados (p.e. con 5 μ Eq. de quelato por gramo de soporte). De este modo, la adsorción multipuntual de las enzimas naturales del hospedador se verá minimizada y más aun si añadimos una concentración moderada de imidazol al extracto de proteínas (p.e. 20 mM). En este caso, las uniones entre un único quelato y el dominio poli-histidinas siguen siendo muy fuertes y las proteínas recombinantes se adsorben sobre estos soportes cromatográficos diseñados a medida. Así pues, la combinación de la

fusión de colas de His a proteínas recombinantes mas el diseño de soportes y protocolos de adsorción a medida, nos permite la purificación en un solo paso de las proteínas recombinantes. Además, el ADN y ARN celulares no se adsorben sobre estos soportes, con lo cual nuestra enzima de interés se puede purificar completamente a partir de un extracto crudo de la enzima recombinante sobre-expresada en un buen hospedador.

3. INMOVILIZACION DE ENZIMAS

3.1. Protocolos muy sencillos

La producción de enzimas muy selectivas y estables es cada día más frecuente. En este caso, la mejora adicional de las propiedades de las enzimas no es muy necesaria y el principal problema de la inmovilización es su sencillez y su bajo coste. Algunas características de este tipo de protocolos de inmovilización son las siguientes:

a.- El uso de soportes pre-existentes que se puedan reutilizar una vez que la enzima se haya inactivado. La enzima inactivada se puede desorber del soporte y éste se puede volver a recargar con enzima nueva.

b.- Derivados con muy buenas propiedades mecánicas. Por ejemplo: inmovilizados sobre soportes pre-existentes adecuados para cada tipo de reactor, como geles de agarosa para reactores tipo tanque agitado, soportes inorgánicos para columnas de lecho fijo, etc.

c.- Los soportes pre-existentes deben ser químicamente muy estables: p.e., soportes iónicos utilizados para adsorber físicamente las enzimas. Estos soportes, se pueden transportar y almacenar en largos periodos de tiempo y por ello, pueden ser utilizados en empresas diferentes de las que las han sintetizado y activado.

d.- Los procesos de inmovilización deben ser rápidos y realizarse en condiciones experimentales muy suaves (p.e. pH neutro y bajas temperaturas) donde las enzimas son muy fáciles de manejar.

Algunos métodos muy sencillos de inmovilización se describen brevemente a continuación.

3.2. Adsorción de enzimas sobre resinas de intercambio iónico

Quizás éste es el protocolo más sencillo de inmovilización de enzimas sobre soportes pre-existentes. La inmensa mayoría de las proteínas se adsorben a pH neutro en intercambiadores aniónicos o catiónicos. La mayoría de ellas, con un pH muy inferior a 7, se adsorben sobre intercambiadores aniónicos. Existen muchos intercambiadores iónicos comerciales -orgánicos, inorgánicos y sintéticos: geles de agarosa activados, resinas sintéticas (Duolite, Levattit, Amberlite, Purolite, etc.), vidrio poroso activado, etc.-. Quizás los soportes que contienen altas concentraciones de sales de amonio cuaternarias o grupos sulfopropil son los más adecuados para una adsorción muy intensa de las enzimas. Algunos soportes macroporosos son capaces de adsorber hasta 100 mg de enzima por gramo de catalizador. La alta estabilidad química de los grupos iónicos (p.e. los señalados anteriormente) nos permiten recubrir completamente la superficie del soporte con moléculas de enzimas y obtener así biocatalizadores muy activos.

La adsorción iónica no debe poder mejorar la rigidez de las enzimas, pero al dispersar completamente la enzima sobre la superficie de un sólido poroso, algunas causas de inactivación pueden ser evitadas, como todo tipo de agregaciones o procesos intermoleculares, interacción de la enzima con interfases hidrofóbicas en reactores agitados vigorosamente (gotas de disolventes, burbujas de gases, etc.)

El principal problema de este tipo de inmovilización es la posible desorción de la enzima en condiciones de alta fuerza iónica, como p.e., en presencia de concentraciones muy altas de substratos ionizados (7-9).

3.3. Inmovilización covalente

La inmovilización covalente de enzimas sobre soportes pre-existente conteniendo grupos reactivos (p.e., reactivos con grupos amino de la superficie de las enzimas) es quizá el protocolo más popular de inmovilización de enzimas (11). Igual que comentamos para los intercambiadores iónicos, existe

también una gran variedad de soportes macroporosos comerciales activados (bromocianógeno, epóxidos, etc.) o fácilmente activables (conteniendo grupos carboxilos activables con N-hidroxisuccinimida, o con grupos amino activables con glutaraldéhidido, etc. También ahora, la dispersión de enzimas sobre la superficie de soportes porosos impide varias causas de inactivación como ya hemos comentado anteriormente.

La formación de un enlace covalente muy estable entre la enzima y el soporte, permite el uso de los derivados (sin posibilidad de desorción de la enzima) en cualquier tipo de medio de reacción, como alta fuerza iónica, altas concentraciones de codisolventes orgánicos, líquidos iónicos, fluidos supercríticos, etc.

A diferencia de los soportes de intercambio, las enzimas inactivadas no se podrían desorber de los soportes y por tanto estos no se pueden reutilizar cuando la enzima se ha inactivado a no ser que seamos capaces de desarrollar estrategias de reactivación de enzimas parcialmente inactivadas. Por otro lado, algunos soportes activados capaces de unir covalentemente a las enzimas se inactivan también muy rápidamente en medios acuosos (sobre todo en condiciones alcalinas) y ello puede impedir recubrirlos completamente con moléculas de enzima inmovilizadas.

3.3.1. Inmovilización de enzimas a través de grupos amino de su superficie

Las enzimas se pueden inmovilizar a través de diferentes residuos de su superficie; las tirosinas reaccionan con sales de diazonio, las cisteínas se pueden inmovilizar por intercambio tiol-disulfuro, los aspárticos y glutámicos se pueden inmovilizar (activados con carbodiimida) sobre soportes conteniendo grupos amino de bajo pK, etc. Estos y otros interesantes métodos de inmovilización han sido descritos con precisión en excelentes revisiones. Sin embargo, en nuestra opinión, los grupos amino de la superficie de una enzima (amino terminal y/o residuos lisina) son los grupos más adecuados para la inmovilización de enzimas. Los grupos amino, cuando no están ionizados, son excelentes nucleófilos y reaccionan muy bien (sin tener que ser modificados) con numerosos soportes reactivos. Además, los grupos amino son hidrofílicos y bastante abundantes en la superficie de la mayoría de las proteínas, etc.

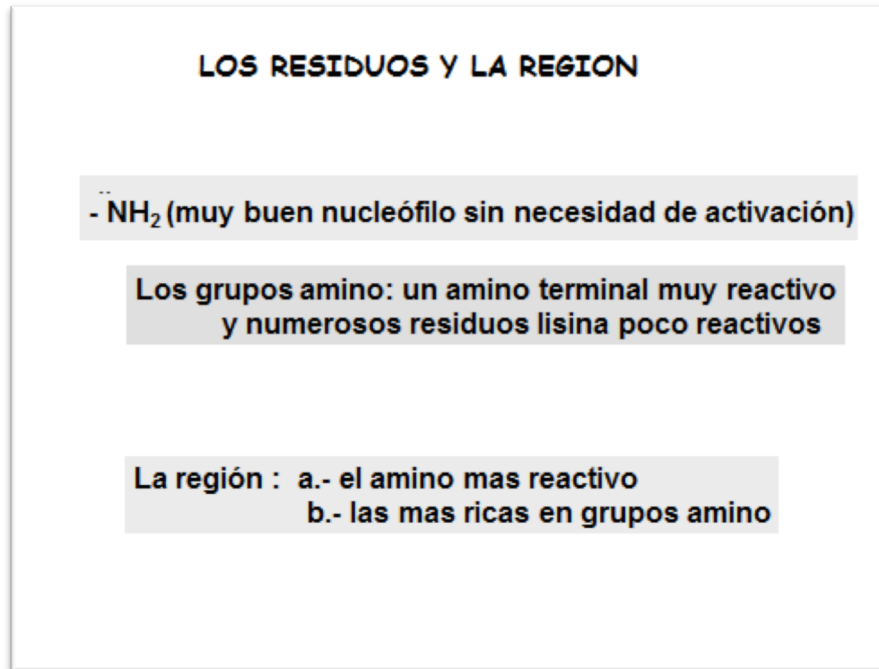


Figura 6.

Desde el punto de vista de su reactividad podemos distinguir dos tipos de grupos amino en la superficie de una enzima:

a.- aminos de bajo pKa (p.e. entre 7 y 8), que están fundamentalmente en el residuo amino terminal de las enzimas (generalmente muy expuestos al medio). Estos grupos, reaccionan fácilmente a pH neutro con grupos del soporte altamente reactivos.

b.- aminos de alto pKa (p.e. alrededor de 10), que están en todas las lisinas superficiales. Estos grupos son muy poco reactivos a pH neutro, pero como son bastante abundantes podrían ser interesantes para diseñar estrategias de inmovilización covalente multipuntual, tal como discutiremos más adelante como mejora de las propiedades de las enzimas.

3.3.2. Soportes activados que reaccionan con grupos amino de la superficie de una enzima

Existen diferentes grupos reactivos que se pueden incorporar en los soportes y que son capaces de reaccionar con grupos amino de la superficie de las enzimas.

Los grupos más reactivos son útiles para inmovilizar moderadas concentraciones de enzimas (p.e. 1-5 mg/mL) en condiciones experimentales muy suaves. Sin embargo, estos grupos muy reactivos suelen ser muy inestables en medios acuosos y la carga completa del soporte con moléculas de enzima es realmente difícil. Además, esta poca estabilidad (sobre todo en condiciones alcalinas) dificulta también la promoción de inmobilizaciones multipuntuales intensas que tienen que realizarse en condiciones alcalinas para que los grupos amino de los residuos lisina se hagan mucho más reactivos.

Por otro lado, algunos grupos muestran una reactividad intermolecular muy baja a pH neutro (glioxil, epóxido, etc.) y en principio no parecen muy útiles para la inmobilización de enzimas. Sin embargo, estos grupos son los más adecuados para lograr inmobilizaciones covalentes multipuntuales muy intensas, tal como veremos más adelante y además nos permiten lograr fácilmente un recubrimiento total de la superficie del soporte con moléculas de la enzima.

3.3.3. Inmobilización de enzimas sobre agarosa activada con bromocianógeno

Las partículas de agarosa activadas con bromocianógeno son asequibles comercialmente (CNBr-Sepharose from GE Healthcare) (12). Los grupos reactivos, cianatos; -C-N, son muy reactivos y muy inestables y en cierto modo no son muy adecuados para su aplicación industrial. Sin embargo, estos soportes son muy útiles para hacer una primera evaluación de las posibilidades tecnológicas de una enzima industrial. Incluso podemos inmovilizar muy suavemente un extracto sin purificar conteniendo la enzima de interés (p.e. a pH 7, 4°C durante 15 minutos con bloqueo adicional del soporte activado con etanolamina). En este caso, las moléculas de enzima inmobilizadas están completamente dispersas y cualquier fenómeno intermolecular o interfacial es imposible (proteolisis, interacción con otras proteínas, interacción con interfases hidrofóbicas, etc.). De este modo, las propiedades intrínsecas de la enzima de interés (actividad hacia diferentes substratos, especificidad, selectividad) pueden ser evaluadas correctamente. De hecho, estos derivados serían el “control ideal” para evaluar cualquier otro método de inmobilización de la misma enzima. Por el contrario, la comparación

de derivados con disoluciones concentradas e impuras de la enzima puede estar influenciado por numerosos artefactos (agregaciones, interacciones proteína-proteína, etc.).

3.3.4. Inmovilización de enzimas sobre soportes aminados activados con glutaraldehído

Los soportes pre-activados (soportes aminados) son muy estables y podrían ser almacenados (p.e. a 4°C, durante prolongados periodos de tiempo). La activación de estos soportes con glutaraldehído es muy sencilla e incluso el glutaraldehído puede ser utilizado en procesos alimentarios. El glutaraldehído queda unido al soporte a través de aminos secundarios que están ionizados a pH neutro. Por este motivo, el proceso de inmovilización de enzimas sobre estos soportes suele ocurrir por un proceso en dos etapas:

a.- una primera adsorción iónica muy rápida a través de las regiones de la enzima con la mayor densidad de carga negativa sobre los grupos amino ionizados del soporte y,

b.- una reacción covalente intramolecular adicional entre grupos amino de la enzima y los grupos glutaraldehído del soporte. Estos grupos aldehído, son bastante inestables a pH alcalino y por ello esta inmovilización no suele promover una intensa estabilización de las enzimas por inmovilización covalente multipuntual. Sin embargo, el primer proceso de adsorción iónica muy rápido, si que nos permite preparar derivados de enzimas altamente cargadas (13).

3.3.5. Inmovilización de enzimas sobre soportes comerciales conteniendo una alta concentración de grupos epóxido

Existen numerosos soportes comerciales (p.e. resinas acrílicas) que contienen una alta concentración de grupos epóxido muy estables (p.e. soportes Sepabeads de la firma Resindion-Mitsubishi Chem. Corp). Los grupos epóxido son muy poco reactivos a nivel intermolecular (apenas inmovilizan enzimas solubles); son generalmente soportes de naturaleza hidrofóbica. Por este motivo, el proceso de inmovilización ocurre también en dos etapas:

a.- una primera adsorción hidrofóbica a muy alta fuerza iónica (p.e. tampón fosfato 1 M) donde los bolsillos hidrofóbicos de la superficie de la enzima se adsorben en la superficie hidrofóbica de los soportes y,

b.- una segunda unión covalente intramolecular entre grupos amino de la superficie de la enzima y los grupos epóxido del soporte. Ahora, la elevada estabilidad de los grupos epóxido a pH alcalino nos permite diseñar una tercera etapa de incubación del derivado a pH alcalino, para fomentar la unión covalente multipuntual entre los grupos amino de todos los residuos Lys situados en la proximidad de los bolsillos hidrofóbicos que participaron en la primera adsorción. Finalmente, tenemos que diseñar una cuarta etapa de bloqueo de los grupos epóxidos remanentes, utilizando para ello, concentraciones muy altas de compuestos tiolados o aminados (p.e. mercaptoetanol, glicina, cisteína, etc.). Obviamente, la alta estabilidad de los soportes nos permite recubrir completamente su superficie con moléculas de enzima inmovilizada (14).

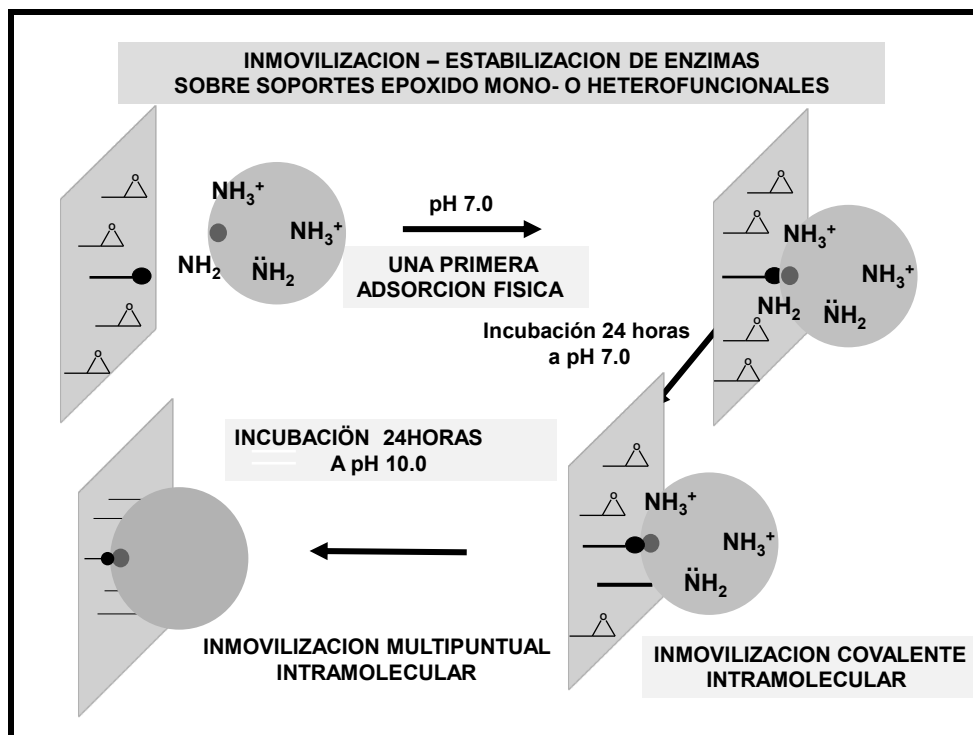


Figura 7.

3.4. Otros métodos de inmovilización de enzimas

Aunque la inmovilización de enzimas sobre soportes pre-existentes es la metodología más popular de inmovilización, cualquier protocolo que permita la reutilización de enzimas constituye un método de inmovilización. A continuación, vamos a describir muy brevemente, diferentes métodos muy sencillos de inmovilización:

i.- Reactores de ultrafiltración.

Todas las paredes de estos reactores están formadas por membranas de ultrafiltración que permiten el paso de sustratos y productos, pero que retienen en su interior las moléculas de enzima soluble. Sería el método de inmovilización más sencillo, pero no mejoraría de ningún modo las propiedades de la enzima soluble. Lógicamente si estas propiedades de la enzima ya son muy buenas y/o los productos obtenidos son de muy alto valor añadido esta alternativa podría ser muy interesante.

ii.- Atrapamiento en geles de poliacrilamida, alginato, etc.

Otra manera sencilla de inmovilizar enzimas, es atraparlas en el interior de geles microporosos que se forman en presencia de la enzima (entrecruzamiento químico de acrilamida, entrecruzamiento iónico de polímeros de alginato en presencia de iones calcio, etc.). Los nuevos sólidos, tienen una porosidad pequeña que no permite la salida de las enzimas desde la estructura microporosa, donde si pueden entrar y salir sustratos y productos. Esta metodología de inmovilización, no mejora notablemente las propiedades de las enzimas aunque si podría servir para estabilizar enzimas multiméricas y para evitar procesos de interacción intermoleculares indeseables.

iii.- CLECs y CLEAS

Dos métodos interesantes de inmovilizar enzimas sin soportes, son el entrecruzamiento con reactivos bifuncionales (p.e. glutaraldehído) de cristales de enzimas puras ("crosslinked enzyme crystals", CLECs) (15) o de agregados de enzimas formados en condiciones experimentales suaves (crosslinked

enzyme aggregates) (16). Los agregados, se pueden formar con varias enzimas e incluso con enzimas y polímeros para crear microambientes a medida. En medios anhidros, tanto los CLECs como los CLEAs tienen una estructura muy compacta y contienen prácticamente 1 g de enzima por gramos de catalizador. Es decir, son 10-20 veces más activos que los mejores derivados preparados sobre soportes pre-existentes.

iv.- Inmovilización por inmuno-afinidad.

Una manera muy elegante de inmovilizar enzimas, es su adsorción intensa y selectiva sobre anticuerpos monoclonales inmovilizados. De este modo, el proceso de inmovilización se convierte también en un proceso de purificación. Además, se ha descrito que la interacción enzima-anticuerpo puede tener efectos estabilizantes sobre la estructura 3D de la enzima. Lógicamente, este método es hoy en día bastante costoso pero la tecnología de anticuerpos avanza muy considerablemente y además hay procesos enzimáticos que dan lugar a productos de muy alto valor añadido donde el coste del biocatalizador es menos relevante.

4. MEJORA DE LAS PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS MEDIANTE TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN

Como comentamos en la Introducción, la mayoría de las enzimas no tienen todas las características necesarias para su implantación industrial (estabilidad, selectividad, actividad hacia sustratos no naturales, etc.). Por estas razones, la mejora de las propiedades de las enzimas mediante técnicas de inmovilización, se convierte en un excelente instrumento tecnológico (17). En cierto modo, las inmovilizaciones que no mejoran significativamente las propiedades de las enzimas (p.e. enzimas poco activas y poco estables) no tienen gran relevancia industrial. A continuación, vamos a comentar una estrategia muy útil para mejorar la estabilidad de las enzimas.

A. Estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual sobre soportes conteniendo una alta concentración de grupos glioxil

La formación de numerosos enlaces entre cada molécula de una enzima inmovilizada y el soporte podría tener importantes efectos estabilizantes. Si la distancia entre los grupos amino de la enzima y el soporte es muy pequeña y el soporte es rígido, podemos asumir que todos los residuos de cada molécula de enzima involucrados en la inmovilización multipuntual deben mantener intactas sus posiciones relativas durante cualquier cambio conformacional inducido por cualquier agente distorsionante (calor, codisolventes, etc.). De este modo, los cambios conformacionales globales de cada molécula de enzima serían mucho menos intensos y la estabilidad se mejoraría notablemente. Esta interesante hipótesis, fue ya planteada en los comienzos del desarrollo de la tecnología enzimática (18), sin embargo, todavía hoy (45 años más tarde) apenas existen buenas estrategias para conseguir de un modo racional este tipo de inmovilizaciones multipuntuales.

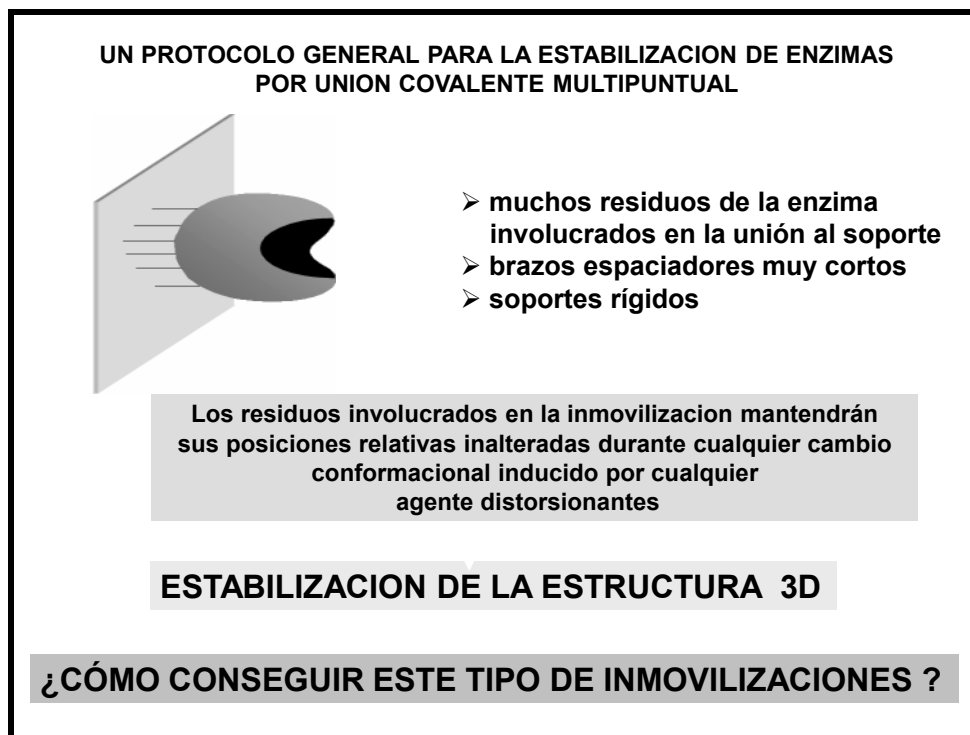


Figura 8.

En principio, deberíamos hacer varias consideraciones para establecer una buena estrategia de inmovilización covalente multipuntual:

a.- La superficie interna de los soportes (poros cilíndricos, fibras muy gruesas, etc.) debería tener una buena congruencia geométrica con la superficie de la proteína.

b.- Los grupos reactivos del soporte deben estar muy próximos a su superficie.

c.- La enzima se debe inmovilizar a través de su región más rica en lisinas y no a través de su grupo amino más reactivo (p.e. el amino terminal). Este punto es el más complejo y requiere un planteamiento bastante original. Los grupos glioxil (pequeños aldehídos alifáticos: $-O-CH_2-CHO$) están muy próximos a la superficie del soporte y no inmovilizan enzimas a través de un único enlace intermolecular enzima-soporte, porque la base de Schiff formada es muy inestable. Este inconveniente se convierte en una ventaja clave para diseñar uniones covalentes multipuntuales muy intensas (19). De hecho, cuando utilizamos soportes muy activados (conteniendo hasta 100 μ Eq. de glioxil por gramo de soporte) y pH neutro, las enzimas con un único amino reactivo en estas condiciones, no se inmovilizan, porque la única base de Schiff formada es muy inestable. Sin embargo, en condiciones bastante alcalinas (p.e. pH 10) las enzimas con muchas lisinas reactivas se inmovilizan muy rápida e irreversiblemente sobre soportes altamente activados. En estas condiciones, la primera inmovilización ya ocurre entre varias lisinas de la enzima y varios grupos glioxil del soporte, formando simultáneamente varias bases de Schiff entre la enzima y el soporte. La enzima, se inmovilizará preferentemente por su región más rica en residuos Lys y esta región es precisamente la más adecuada para lograr una intensa unión covalente multipuntual. Paradójicamente, un método de inmovilización realmente muy poco útil a pH 7, se convierte en el método más adecuado para dirigir la inmovilización de la enzima a través de su región más rica en Lys (20) y no por el grupo amino más reactivo, aunque este sea miles de veces más reactivo que los amino de las lisinas.

d.- Los grupos reactivos del soporte deben ser muy estables a pH 10 para permitir prolongados procesos de interacción enzima-soporte a pH alcalino y aumentar así la intensidad de la unión covalente multipuntual.

e.- La modificación química de la enzima debe ser suave. La reducción de las bases de Schiff con concentraciones muy suaves de borohidruro sódico, las convierte en enlaces amino secundarios. De este modo, a pesar de formar varios enlaces enzima-soporte, la única modificación química de la enzima es la transformación de varios grupos aminos primarios en varios aminos secundarios con propiedades físicas muy similares (p.e. grado de ionización a diferentes valores de pH).

f.- La superficie final del soporte debe ser completamente inerte. De este modo, evitamos interacciones indeseables enzima-soporte durante los procesos de distorsión (p.e. por calor, por disolventes orgánicos, etc.). La reducción suave con borohidruro, que finaliza con la unión multipuntual enzima-soporte, además de estabilizar los enlaces enzima-soporte, nos sirve para la reducción de los grupos aldehído a grupos hidroxilo totalmente inertes e hidrofílicos.

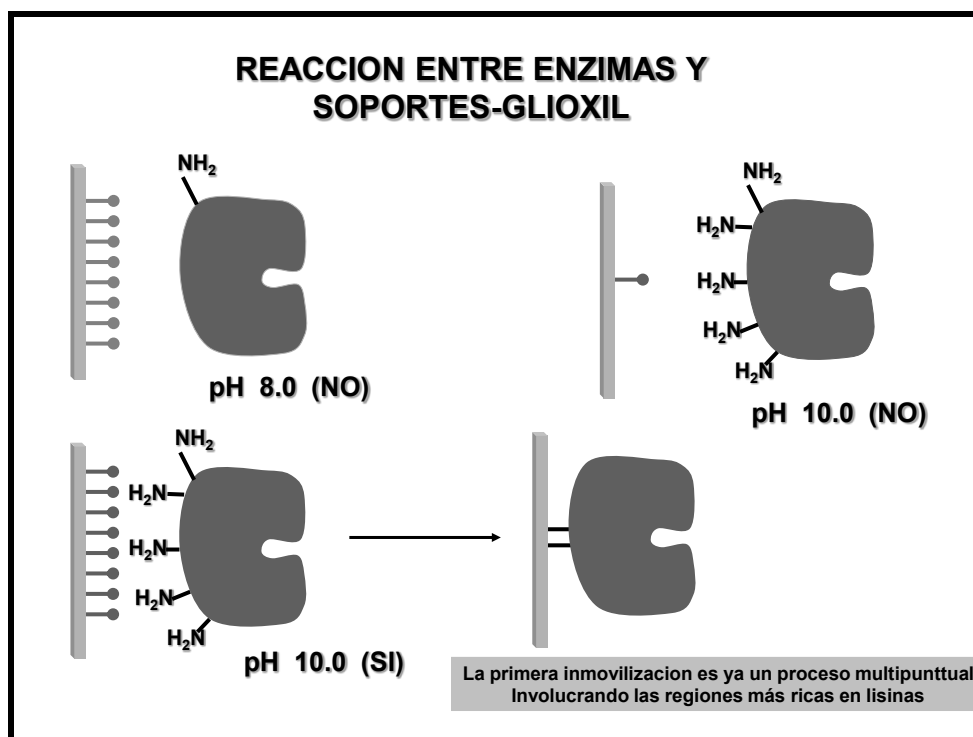


Figura 9.

Utilizando esta nueva metodología de inmovilización, más de 50 enzimas industriales fueron inmovilizadas y estabilizadas. En algunos casos, se

obtuvieron estabilizaciones superiores a 10.000 veces y asociadas a pérdidas muy pequeñas de actividad catalítica (p.e. pérdidas del orden del 25%).

Las estabilizaciones, se calcularon comparando las inactivaciones de las enzimas estabilizadas con las enzimas correspondientes inmovilizadas por unión covalente unipuntual (utilizando un soporte con un grado de activación muy bajo).

De este modo, los efectos beneficiosos de la inmovilización (previniendo algunas causas de inactivación), eran similares para los dos derivados comparados y las estabilizaciones observadas correspondían realmente a estabilizaciones de la estructura tridimensional de las enzimas inmovilizadas por unión covalente multipuntual.

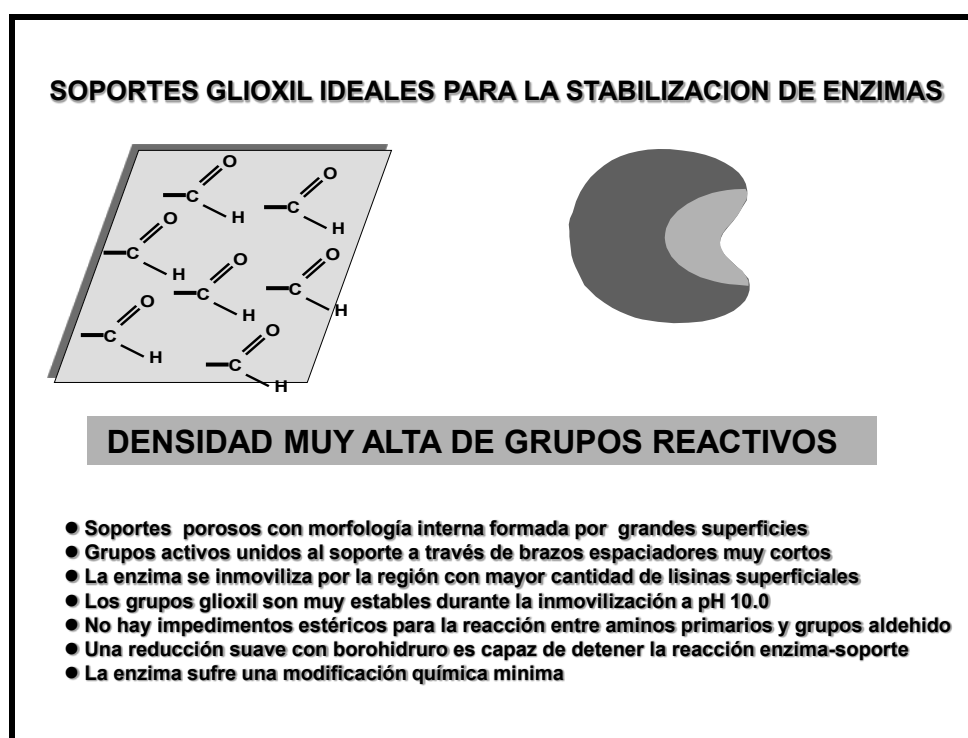


Figura 10.

Por otro lado, la estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual debe ser efectiva frente a cualquier agente distorsionante: calor, codisolventes, concentraciones saturadas de disolventes inmiscibles, elevadas concentraciones de agentes caotrópicos (urea, guanidina), etc.

Los geles de agarosa, cuya estructura interna está formada por fibras muy gruesas, son excelentes soportes para este tipo de estabilizaciones, ya que tienen una muy alta densidad de grupos hidroxilos superficiales, que se pueden modificar para obtener una alta densidad de grupos glioxil. Estos soportes serían muy útiles, a escala industrial, para trabajar en medios acuosos y mezclas agua –codisolventes en reactores tipo tanque agitado. Sin embargo, también se pueden desarrollar protocolos similares con muchos otros soportes, que contengan diferentes propiedades mecánicas y diferente resistencia a disolventes anhidros: vidrio poroso, soportes acrílicos, celulosa, nanopartículas magnéticas, etc.

B. Otros métodos de mejora de las propiedades de las enzimas por técnicas de inmovilización y post-inmovilización

i.- Hiperactivación de lipasas. Las lipasas presentan una baja actividad catalítica en medios completamente acuosos, pero se hiperactivan en contacto con gotas de aceites (activación interfacial). Un fenómeno similar se puede diseñar adsorbiendo las lipasas sobre soportes hidrofóbicos (21). Por ejemplo, la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* aumenta 20 veces su actividad tras la adsorción sobre octil-agarosa.

ii.- Rigidificación orientada y dirigida. La promoción de uniones covalentes multipuntuales de diferentes regiones de la superficie de una enzima (además de un región más rica en lisinas) puede rigidificar regiones cercanas al centro activo y modificar la selectividad de lipasas y otras enzimas hacia sustratos no naturales (22).

iii.- Estabilización por técnicas post-inmovilización. La modificación física de la superficie de enzimas inmovilizadas con polímeros altamente hidrofílicos puede aumentar drásticamente su estabilidad frente a codisolventes orgánicos.

iv.- Reactivación de enzimas inmovilizadas. Cuando una enzima se inactiva en condiciones químicamente inertes, su estructura primaria permanece intacta y solo puede sufrir cambios conformacionales. Estos cambios, se pueden revertir fácilmente, sobre todo cuando la enzima está inmovilizada sobre un soporte. A veces, la simple reincubación en condiciones

experimentales muy suaves (pH 7, 25 °C) puede favorecer la reactivación (23). Otras veces, es necesario desplegar estructuras incorrectas estables (p.e. utilizando guanidina) para que la enzima pueda recuperar toda la actividad catalítica inicial.

5. CONCLUSIONES

La purificación e inmovilización correcta de una enzima nos permite inmovilizar una gran cantidad de la enzima de interés por unidad de volumen de biocatalizador y nos permite retener un elevado porcentaje de actividad catalítica por molécula de enzima inmovilizada. De este modo, se pueden preparar catalizadores muy activos sin interferencias de otras actividades enzimáticas indeseables.

A corto o medio plazo, la inmensa mayoría de las enzimas industriales serán recombinantes y su purificación será muy sencilla, ya que las enzimas podrán contener dominios de afinidad (p.e. colas de poli-His) que facilitan enormemente su purificación.

También, existen numerosos métodos sencillos y de bajo coste para la inmovilización de enzimas, aunque en la mayoría de los casos apenas mejoran las propiedades funcionales de las enzimas de interés. Se pueden utilizar soportes comerciales con excelentes propiedades mecánicas para ser usados en cualquier tipo de reactor o en cualquier medio de reacción (acuoso, líquidos iónicos, disolventes orgánicos, etc.).

Coexisten también algunos protocolos de inmovilización más complejos que permiten mejorar enormemente las propiedades funcionales de las enzimas (actividad, estabilidad, selectividad, posibilidades de reactivación, etc.). Esta mejora de las propiedades funcionales por técnicas de inmovilización, representa un complemento ideal de otras disciplinas muy variadas: Microbiología, Biología Molecular, Ingeniería del Reactor, etc. De este modo, la implantación masiva de las enzimas como catalizadores industriales está cada día más cercana. Las enzimas se pueden utilizar en procesos de alto valor añadido (p.e. obtención de compuestos ópticamente puros) o en procesos

de muy bajo valor añadido (p.e. síntesis de biodiesel, eliminación de lactosa en leche, etc.). En cada caso, los diferentes métodos de inmovilización y de mejora de las propiedades de las enzimas deben de ser valorados.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Koeller, K.M., Wong, C.H., Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 2001, **409**, 232–240.
2. Bickerstaff, G.F., Immobilization of enzymes and cells: *Methods in Biotechnology* 1; Humana Press: Totowa. 1997.
3. Guisan J.M. Immobilization of enzymes and cells, second edition: *Methods in Biotechnology* 22; Humana Press: Totowa. 2006..
4. Katchalski-Katzir, E., Kraemer, D..M., Eupergit ® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J. Mol. Catal, B: Enzymatic*. 2000, 10, 157-176.
5. Cao, L. Immobilised enzymes: science or art?. *Curr. Opin. Chem. Biol*, 2005, 9, 217-226 .
6. Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P C, Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie*, 1998, 80, 933-941.
7. Fuentes, M.; Maquiese, J.V.; Pessela, B.C.C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Mateo*, C.; Guisán, J.M. (2004). "New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins" *Biotechnol Progr.* 20, **284 - 288**
8. Alonso-Morales, N.; Lopez-Gallego, F.; Betancor, L.; Hidalgo, A.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. (2004). "Reversible immobilization of Glutaryl acylase on Sepabeads coated with polyethyleneimine". *Biotechnol. Progr.* 20, 533 – 536.
9. Torres, R.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Palomo, J.M.; Ortiz, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J.M.; Tam, A.; Daminati, M. (2003). "Reversible immobilization of invertase on Sepabeads-polyethylenimine: stabilization of a multimeric enzyme" *Biotechnol. Progr.* 18, 1221-1226.
10. Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, G.G., Lawson, D.M., Lawson, D M; Turkenburg, J P; Bjorkling, F; Hüge-Jensen, B; Patkar, S A; Thim et al.,. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. 1991, 351, 491-494.
11. Brena B, and Batista-Vieria F. "Immobilization of Enzymes. A literature survey" in *Immobilization of enzymes and cells, second edition: Jose M. Guisan ed. Methods in Biotechnology* 22; Humana Press: Totowa. NJ. USA. 2006.

12. Axén R, Portath J and Ernback S. "Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogens halides". *Nature*, 1967, 214, 1302-1304.
13. Monsan P., Puzo G., and Mazarguil H. On the mechanism of the formation of glutaraldehyde protein bonds. *Biochimie*, 1975, 57, 1281-1292
14. Mateo C., Abian O., Fernandez-Lorente G., Pedroche J. Fernandez-Lafuente R. and Guisan J.M.. "Sepabeads: a novel epoxy-support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment". *Biotechnol. Progr.* 2002. 18, 629-634.
15. Margolin, A. L., and Navia, M. A. (2001) Protein crystals as novel catalytic materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2204-2222; Lalonde, J. (1997) *Clecs.* 2
16. Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. *Organ. Lett.* 2000, 2, 1361-1364.
17. Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. (2007) *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (6), pp. 1451-1463
18. Mozhaev, V.V., Melik-Nubarov, N.S., Sergeeva, M.V., Sikrnis, V., Martinek, K., Strategy for stabilising enzymes. I. Increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support. *Biocatalysis*, 1990, 3, 179–187.
19. Guisan J.M. Immobilization and Stabilization of Enzymes on Aldehyde-Agarose Gels. *Enzyme and Microbial Technology*, 1988, 10(6), 375-382.
20. Mateo, C, Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C. et al.. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb. Technol.* 2005, 37, 456-462.
21. Fernández-Lorente, G., Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Fernández-Lafuente, R., Dalmases, P., Huguet, J., Guisán, J.M. Modulation of lipase properties in macro-aqueous systems by controlled enzyme immobilisation: Enantioselective hydrolysis of a chiral ester by immobilised *Pseudomonas* lipase. *Enzyme Microb. Technol.* 2001, 28, 389-396.
22. Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M. Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M. Modulation of the enantioselectivity of *Candida antarctica* B lipase via conformational engineering: kinetic resolution of (\pm)- α -hydroxy-phenylacetic acid derivatives *Tetrahedron: Asymmetry*. 2002,13, 1337-1345.
23. Mozhaev, V.V., Berezin, I.V., Martinek, K. Reactivation of immobilized enzymes.(1987) *Methods in Enzymology*, 135, pp. 586-596.