Immobilization of whole cells and enzymes

Immobilization
History

Vincenzo (1933) made the first attempt to encapsulate cells in polymer membranes. He demonstrated that tumor cells in a polymer structure viable for a long period without being rejected by the immune system.

Thomas Chang (1964), the idea of encapsulating cells within ultra-thin polymer membrane microcapsules so as to provide immunoprotection to the cells. He suggested that these artificial cells not only protected the encapsulated cells from immunorejection but also provided a high surface-to-volume relationship enabling good mass transfer of oxygen and nutrients.

Immobilization: Attachment, entrapment or encapsulation of enzymes/whole cells

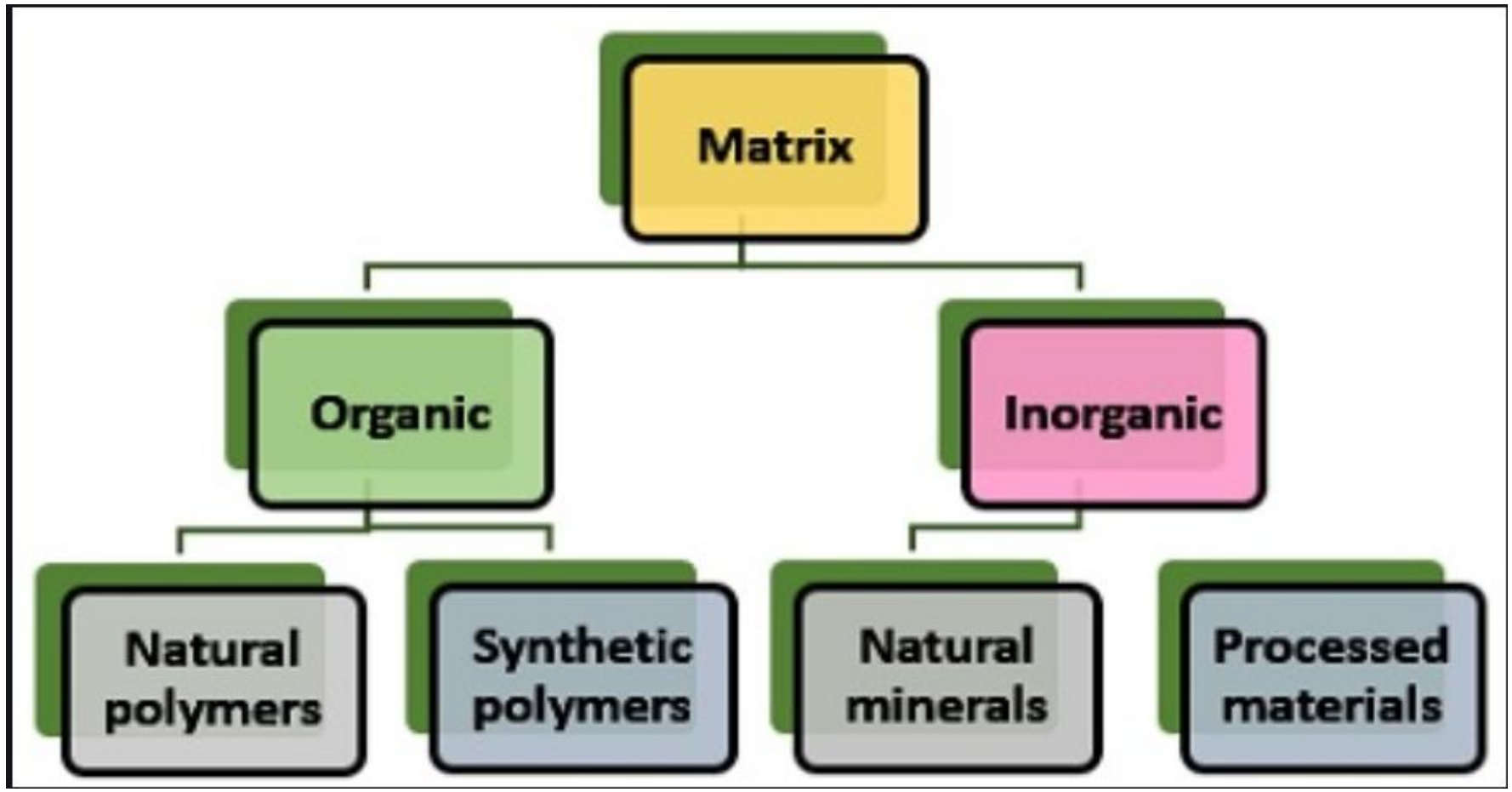
Immobilised vs free cells

1. High-cell density (increasing both the yields and productivity)
2. Easy separation of cells from fermentation broth
3. The reuse of microbial cells/Enzymes
4. Thermostability
5. Cost-effective

Supports/ Matrix used in immobilization technology:

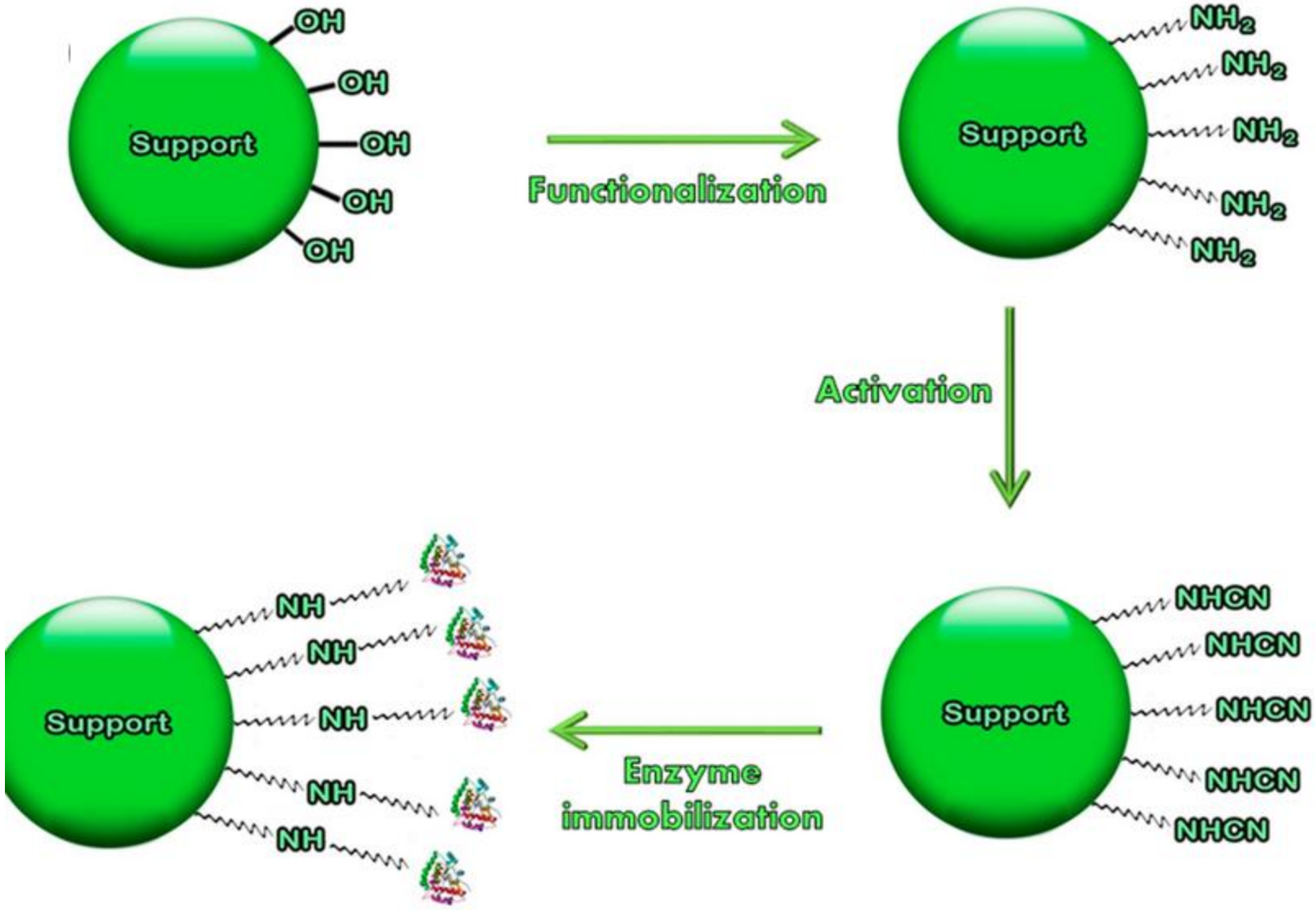
- The matrix/supports hold the enzyme
- The matrix used should be cheap and easily available
- Their reaction with medium and enzyme should be minimums as possible
- A wide range of matrix are used in immobilization of enzyme/whole cells
- The matrix/supports are grouped into three major categories

1. ***Natural polymers***
2. ***Synthetic polymers***
3. ***Inorganic materials***

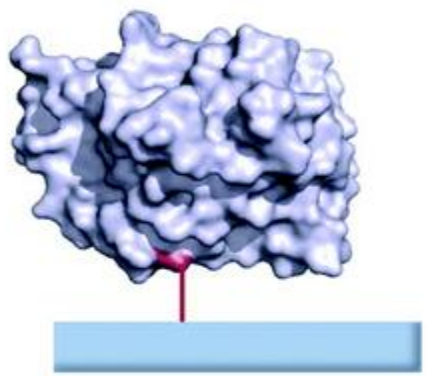

Matrix
Organic
Inorganic
Natural polymers
Synthetic polymers
Natural minerals
Processed materials

Inorganic Material	Properties	Enzyme Immobilized	References
Zeolite (molecular sieves)	Large specific surface area of the zeolite substrate resulted in high enzyme loading	Glucose oxidase (GOx), α-chymotrypsin, lysozyme	Liu, Hu, and Deng (1997), Xing, Li, Tian, and Ye (2000), and Chang and Chu (2007)
Ceramics	Both macro- and micropores efficient in lowering diffusion rate and increasing specific surface area	*Candida antarctica* lipase	Magnan, Catarino, Paolucci-Jeanjean, Preziozi-Belloy, and Belleville (2004)
Celite	Inexpensive, low polarity, large adhesion area, chemically inert, resistance against pH, temperature, urea, detergents, and organic solvents	Lipase, polyphenol oxidase, β-galactosidase	Khan, Akhtar, and Husain (2006), Liu, Lin, Chen, and Chang (2009), and Ansari and Husain (2012)
Silica	Nanosized structures, high surface area, ordered arrangement, high stability to chemical and mechanical forces, high mechanical strength	Lignin peroxidase, horseradish peroxidase, α-amylase	Dezott, Innocentini-Mei, and Durán (1995) and Soleimani, Khani, and Najafzadeh (2011)
Glass	Highly viscous liquid	α-Amylase, nitrite reductase	Kahraman, Bayramoglu, Kayaman-Apohan, and Güngör (2007) and Rosa et al. (2002)
Activated carbon	Large contact sites, high surface area	Acid protease, acidic lipase	Kumar, Perinbam, Kamatchi, Nagesh, and Sekaran (2010) and Ramani et al. (2012)
Charcoal	Excellent adsorbent, minimum fine particulate matter release	Papain, amyloglucosidase	Dutta, Bhattacharyya, De, Ray, and Basu (2009) and Rani, Das, and Satyanarayana (2000)

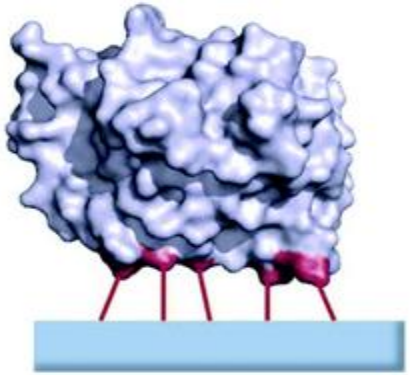
Natural Polymers as Support	Properties	Enzyme Immobilized	References
Alginate	Used as xanthan–alginate beads, alginate–polyacrylamide gels, and calcium alginate beads Can be reused, improves the stability of enzymes		Elcin (1995) and Flores-Maltos et al. (2011)
Chitosan and chitin	Used in combination with alginate Less leaching effect, more reliable for enzyme trapping, in form of beads can entrap more enzymes	D-Hydantoinase	Betigeri and Neau (2002) and Chang and Juang (2007)
Collagen	Retain significant activity after many cycles of reuse	Tannase, catalase	Katwa, Ramakrishna, and Rao (1981) and Chen, Song, Liao, and Shi (2011)
Carrageenan (linear sulfated polysaccharide)	Improve stability, as pseudoplastic in nature it helps it to thin under shear stress and recover its viscosity once stress is removed Cheap, durable, better entrapment	Lipase, α-galactosidase	Tümtürk et al. (2007), Jegannathan et al. (2010), Rao, Prakasham, Rao, and Yadav (2008), and Girigowda and Mulimani (2006)
Gelatin (hydrocolloid material, high in amino acid)	High adsorption ability, promote loading efficiency		Shen et al. (2011)
Cellulose	Longer storage capacity, better formability, and flexibility	Fungi laccase, penicillin G acylase, glucoamylase, α amylase, tyrosinase, lipase, and β-galactosidase	Al-Adhami et al. (2002), Mislovicová, Masarova, Vikartovska, Germeiner, and Michalkova (2004), Bryjak, Aniulyte, and Liesiene (2007), Namdeo and Bajpai (2009), Labus, Turek, Liesiene, and Bryjak (2011), Huang et al. (2011), and Klein et al. (2011)
Starch (homopolysaccharide)	Stable	Bitter gourd peroxidase	
Pectin (heteropolysaccharide)	Used along with glycerol as plasticizer to reduce brittleness of support Pectin–chitin and pectin–calcium alginate have enhanced thermal and denaturant resistance and catalytic properties	Papain	Ceniceros et al. (2003), Gómez et al. (2006), and Satar, Matto, and Husain (2008)
Sepharose	Porous, easy adsorption, retain catalytic properties at extremes of pH, temperature, high salt concentration	Amylase, glucoamylase	Hosseinkhani, Szittner, Nemat-Gorgani, and Meighen (2003)


OH
OH
OH
OH
OH
Support
Functionalization
NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
Support
Activation
NHCN
NHCN
NHCN
NHCN
NHCN
Support
Enzyme
immobilization
NH
NH
NH
NH
NH
Support

A



vs



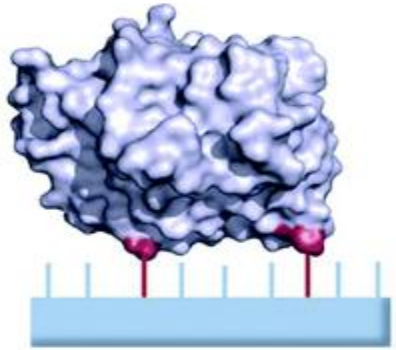
Single point attachment

+ Flexibility
- Enzyme deformation

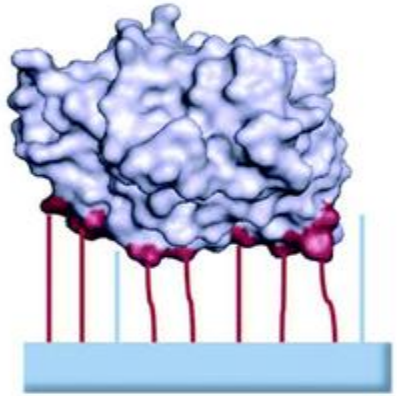
Multipoint attachment

+ Rigidity
+ Enzyme orientation

B



vs



Short Linker

+ Rigidity

Long Linker

+ Flexibility
+ Multipoint attachment

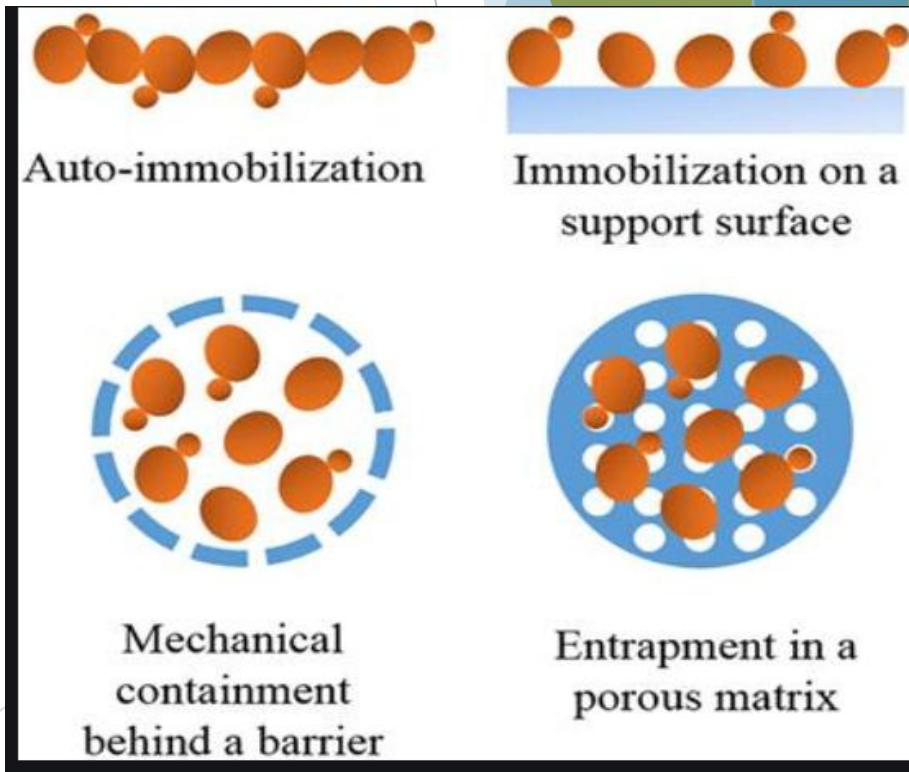

Chemical and thermal stability
Insolubility under reaction conditions
High affinity to enzymes
Biocompatibility
Presence of reactive functional groups
Availability and price
Regeneration and reusability
SUPPORT MATERIALS

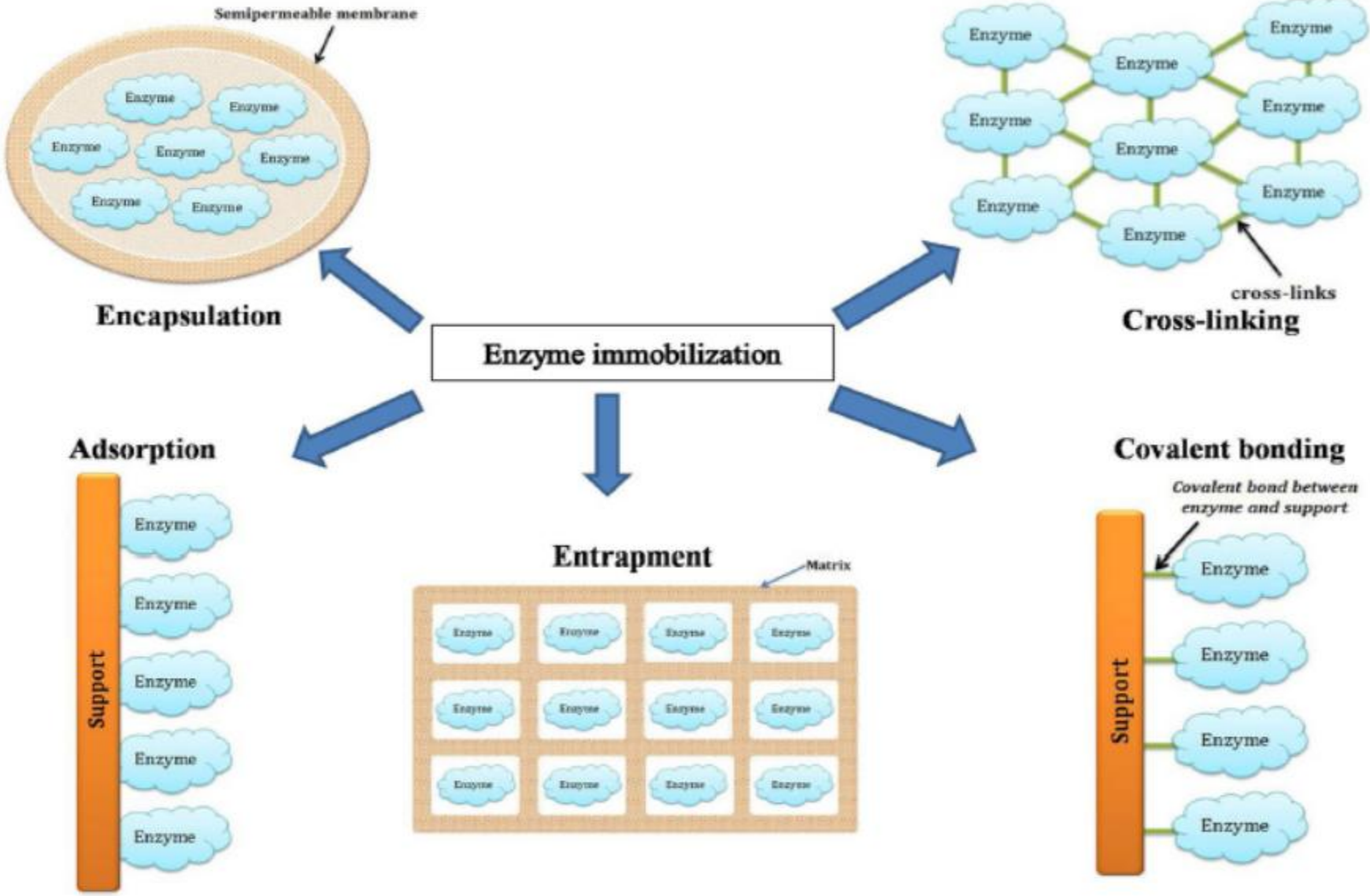
اشکال مختلف ایمیوبیلیزاسیون شامل:

1. فلوکولاسیون (طبیعی)
2. جذب در سطح حامل
3. اتصال متقاطع
4. کپسوله شدن در ژل های پلیمری
5. بدام افتادن در ساختارهای شبکه ای

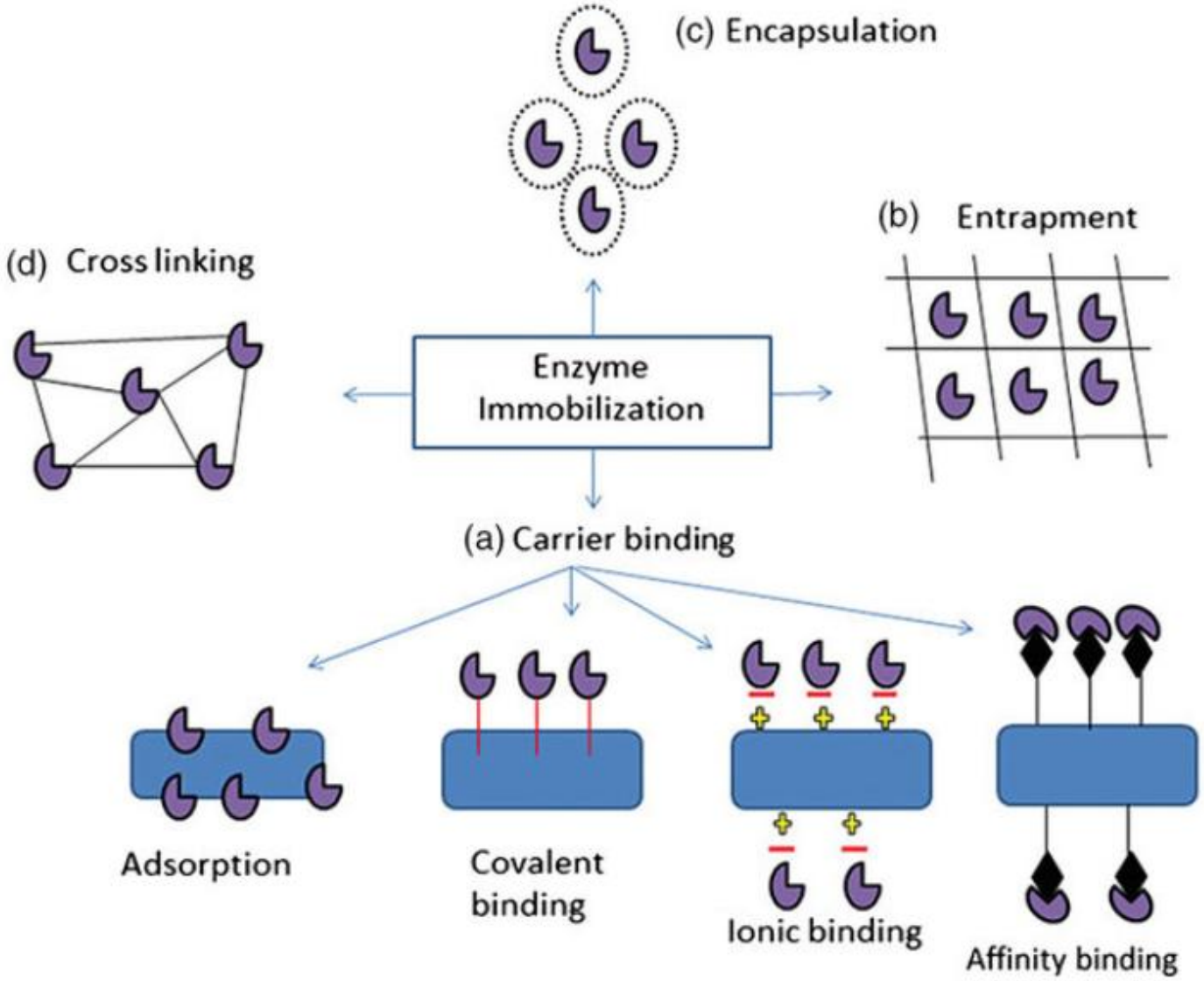
The different methods are:

- ***Carrier-Binding*:** the binding of enzymes to water-insoluble carriers
- ***Cross-linking*:** intermolecular cross-linking of enzymes by bi-functional or multi-functional reagents.
- ***Entrapping*:** incorporating enzymes into the lattices of a semi-permeable gel or enclosing the enzymes in a semi-permeable polymer membrane

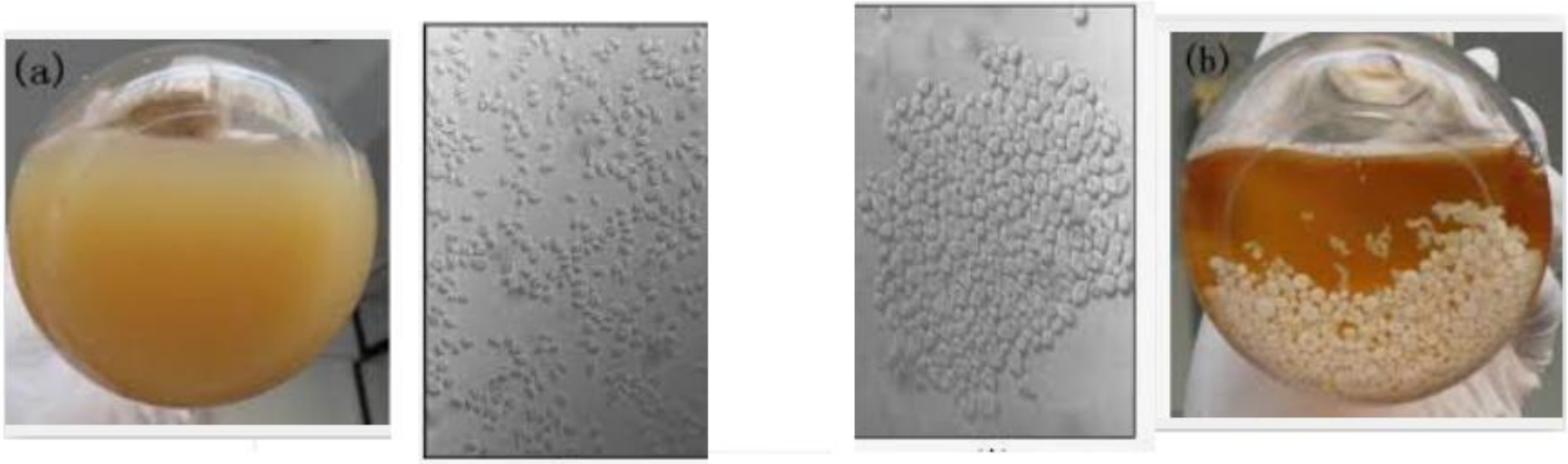




Various methods of enzyme/cell immobilization.


(c) Encapsulation
(b) Entrapment
(d) Cross linking
Enzyme Immobilization
(a) Carrier binding
Adsorption
Covalent binding
Ionic binding
Affinity binding

Flocculation (natural immobilization)



Saccharomyces cerevisiae

به دلیل اینکه در سیستم‌های ایموبیلیزاسیون سلولی، غلظت‌های بالایی از سلول‌ها بسته بندی می‌شوند، واکنش‌های شیمیایی در حجم و سرعت بالایی انجام می‌گیرند. این سیستم‌ها بیشتر در واکنش‌های تبدیل سوبسترا بکار می‌روند. استفاده از سلول‌های ایموبیلیزه در رآکتور موجب جلوگیری از آلودگی محصولات و کاهش فرایندهای پایین دست می‌شود. سیستم های ایموبیلیزاسیون سلولی بطور وسیعی در صنایع تولید آنزیم، آنتی بیوتیک، الکل، آمینواسیدها، ترکیبات پلی ساکاریدی، سورفکتانت‌ها و صنایع غذایی کاربرد یافته‌اند. همچنین جمعیت‌های میکروبی به فرم بیوفیلم، بیوفلوکه (bioflocks) و بیوگرانول اغلب در فرایندهای تصفیه زیستی (bioremediation) (به عنوان مثال تصفیه فاضلاب جهت حذف COD، نیتروژن، فسفر، فلزات سنگین، هیدروکربن‌ها و سیانید) و در بیوسنسورها استفاده می‌شوند. ژلاتین با اتصالات متقاطع، دانه‌های سرامیکی منفذدار، آلژینات و آگاروز رایج‌ترین ترکیبات مورد استفاده در سیستم‌های ایموبیلیزاسیون سلولی هستند (Fukui et al., 1980).

ایموبیلیزاسیون آنزیم

مهمترین هدف ایموبیلیزاسیون آنزیم‌ها در صنعت، استفاده مجدد از آنزیم برای انجام واکنش می باشد. طراحی روش ایموبیلیزاسیون در فرایندهای صنعتی بر مبنای ساده و ارزان قیمت بودن روش ایموبیلیزاسیون و بهبود ویژگی‌ها ی آنزیم‌های ایموبیلیزه شده انجام می پذیرد. آنزیم‌ها علی رغم داشتن ویژگی‌های برجسته کاتالیتیک، دارای معایبی هستند که استفاده از آن‌ها را در صنعت محدود می کند، از جمله پایداری ضعیف، محدود شدن بوسیله غلظت‌های بالای سوبسترا و محصول، فعالیت و اختصاصیت کم نسبت به سوبستراهای غیرطبیعی، نیاز به کوفاکتورها و کوآنزیم‌ها در محیط و غیره. امکان بهبود این ویژگی‌های نامناسب از طریق روش‌های ایموبیلیزاسیون ساده، یکی از اهداف مهم این فرایند می باشد. تا کنون روش‌های بسیاری به منظور ایموبیلیزاسیون آنزیم‌ها پیشنهاد شده است اما بیشتر این روش‌ها پیچیده و گران‌قیمت هستند و تنها تعداد کمی از آن‌ها به سادگی قابل انجام‌اند و موجب بهبود فعالیت آنزیم‌ها می‌شوند.

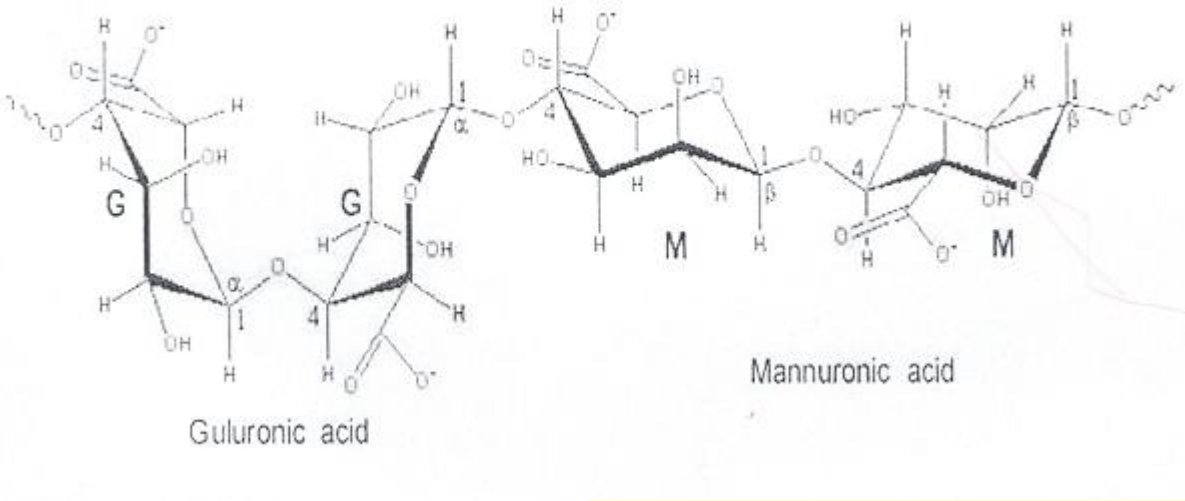
مشکلات مرتبط با ایموبیلیزاسیون آنزیم‌ها

آنزیم‌ها به علت داشتن ویژگی‌های اتصالی فراوان از جمله ریشه‌های هیدروفوب یا هیدروفیل، گروه‌های کربوکسیلیک و بارهای مثبت و منفی، می‌توانند با سطوح مختلف اتصال برقرار نمایند و طی دو دهه اخیر روش-های بسیار زیادی جهت ایموبیلیزاسیون آنزیم‌ها پیشنهاد شده است اما روش‌های ساده و موثر(کارایی، پایداری و اختصاصیت بالا) هنوز به‌خوبی توسعه نیافته است و بنابراین ایموبیلیزاسیون آنزیم‌ها باید هنوز به عنوان یک چالش بزرگ در بیوتکنولوژی مدرن مورد بررسی قرار گیرد.

از ترکیبات طبیعی و سنتزی مختلفی جهت ایموبیلیزاسیون استفاده می‌شود. پلی‌ساکاریدهای جلبکی از جمله آگار، آگاروز، آلژینات و کاراجینان به عنوان پلیمرهای طبیعی دسته بندی می‌شوند و ترکیباتی مانند پلی آکریل آمید، پلی یورتان فوم وپلی‌استیرن به عنوان ساختارهای سنتتیک در نظر گرفته می‌شوند

- اندازه منافذ یکی از پارامترهای مهم در انتخاب پلیمر جهت استفاده است. دانه‌های با منافذ ریز که بوسیله کپسوله کردن با پلی‌آکریل‌آمید فراهم می‌شود به دلیل حداقل احتمال نشت آنزیم یا سلول به خارج از ساختار شبکه‌ای می‌تواند جهت استفاده در بیورآکتورها مفید باشد.

- تنوع و زیست‌سازگاری بالا،



Guluronic acid

Mannuronic acid

این پلیمر نخستین بار در سال ۱۸۸۰ بوسیله استانفورد(stanford) جداسازی شد و در همین سال توسط Krefting خالص شد

جلبک قهوه‌ای فائوفیسه (phaeophycea)

ازتوباکتر وینلاندی (Azotobacter vinelandii)

به علت خواصی همچون ژله‌شدن ملایم، زیست‌سازگاری و تجزیه‌پذیری، آلژینات کاربردهای صنعتی وسیعی در صنایع تغذیه‌ای و دارویی داشته است. جالب توجه است که آلژینات در موارد و زمینه‌های علمی متنوعی از جمله واکسن‌های خوراکی، توسعه سیستم‌های آزادسازی کنترل شده داروها و پپتیدها، و میکروکپسوله کردن سلول‌ها به منظور انتقال مداوم دارو، مورد توجه قرار گرفته است (Orive et al., 2003). به عنوان مثال، یکی از موارد کاربرد پزشکی آلژینات، استفاده از آن در درمان دیابت نوع ۱ است که در این روش، سلول‌های تولید کننده انسولین درون کپسول‌های آلژینات ایموبیلیزه می‌شوند و درون بافت بدن قرار می‌گیرند که در درمان دیابت نوع ۱ موثر بوده‌اند و پانکراس اندوکرین زیست-مصنوعی نامیده می‌شوند.

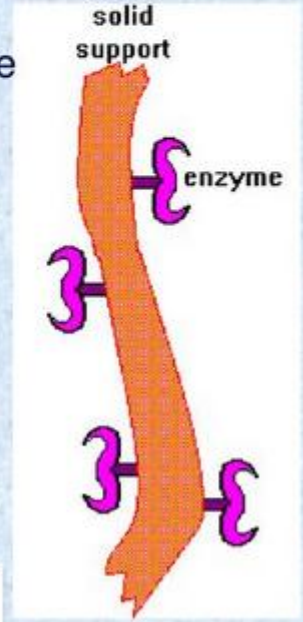
❶ Carrier-Binding

Immobilization Methods

1. Carrier-Binding

Carrier-Binding : the binding of enzymes to water-insoluble carriers

- The carrier-binding method is the oldest immobilization technique for enzymes. In this method, the amount of enzyme bound to the carrier and the activity after immobilization depend on the nature of the carrier. The following picture shows how the enzyme is bound to the carrier:

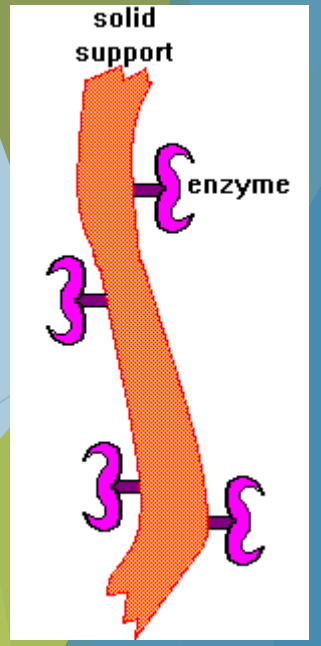


- The selection of the carrier depends on the nature of the enzyme itself.
- Some of the most commonly used carriers for enzyme immobilization are polysaccharide derivatives such as cellulose, dextran, agarose, and polyacrylamide gel.
- According to the binding mode of the enzyme, the carrier-binding method can be further sub-classified into:

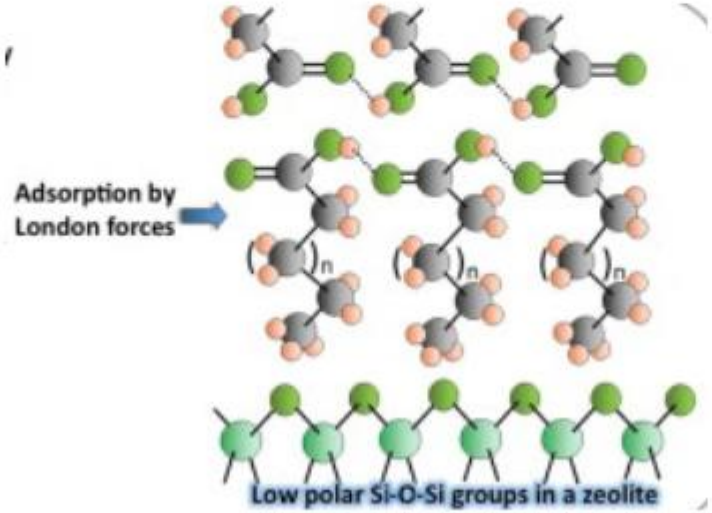
✓ **Physical Adsorption**

✓ **Ionic Binding**

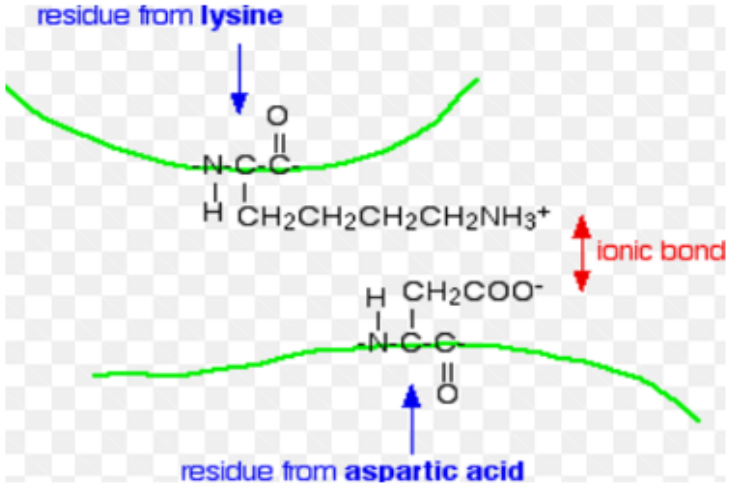
✓ **Covalent Binding**



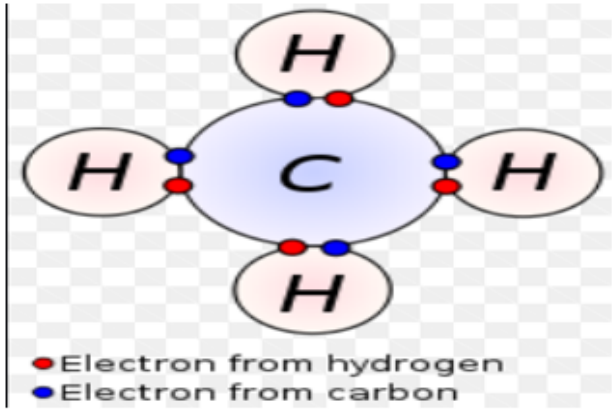
جذب فیزیکی نوعی فرایند جذب است که در آن نیروهای مؤثر، **نیروهای بین مولکولی (واندروالس)** بوده و در اثر این فرایند جذب، تغییر محسوسی در الگوی اوربیتال الکترونی اتم های درگیر به وجود نمی آید. این نوع جذب دارای انرژی فعال سازی نیست و انرژی آزاد شده در طی آن در مقایسه با جذب شیمیایی کمتر است. جذب فیزیکی همچنین انتخابی نبوده و از ماده ای به ماده دیگر در شرایط یکسان تفاوت چندانی ندارد و نیز برخلاف جذب شیمیایی می تواند به صورت چندلایه باشد.



پیوند یونی (الکتروالانسی) که جزء **پیوندهای میان اتمی** است نوعی پیوند شیمیایی است که بین یونهای مثبت و منفی وجود دارد و آنها را در یک ساختار بلورین به هم نگه می‌دارد. این پیوند ناشی از انتقال الکترون بین اتم هاست.



پیوندی را کووالانسی (بین اتمی) گویند که در آن اتمها الکترون‌های منفرد خود را با هم به اشتراک بگذارند این پیوند بین نافلز و نافلز به وجود می‌آید



1-1 : Physical Adsorption

Of enzyme protein on the surface of water-insoluble carriers.

Advantages **:** no reagents and only a minimum of activation steps are required

Disadvantages **:** the adsorbed enzyme **may leak from the carrier** during use due to a **weak binding for**ce between the enzyme and the carrier. Moreover, the adsorption is non-specific, further adsorption of other proteins or other substances

1-2 : Covalent Binding

Based on the binding of enzymes and water-insoluble carriers by covalent bonds

The **functional groups** that may take part in this binding are Amino group, Carboxyl group, Sulfhydryl group, Hydroxyl group, Imidazole group, Phenolic group, Thiol group, Threonine group, Indole group

Disadvantages **:** covalent binding **may alter the conformational structure** and active center of the enzyme, resulting in major loss of activity and/or changes of the substrate

Advantages **:** the binding force between enzyme and carrier is **so strong that no leakage** of the enzymes occurs, even in the presence of substrate or solution of high ionic strength.

1-3 : Ionic Binding

Of the enzyme protein to water-insoluble carriers containing ion-exchange residues

Polysaccharides and *synthetic polymers* having ion-exchange centers are usually used as carriers

Advantages **:** the enzyme to carrier linkages is much stronger for ionic binding

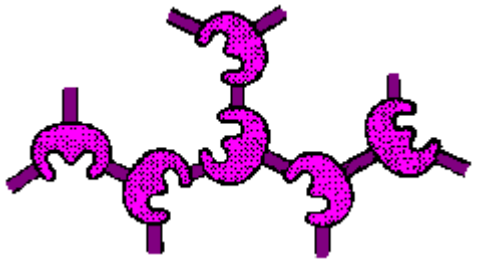
Disadvantages **:** the binding forces between enzyme proteins and carriers are weaker than those in covalent binding

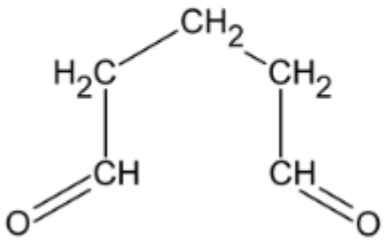
❷ Cross-Linking

Either to other protein molecules or to functional groups on an insoluble support matrix

It is used mostly as a means of stabilizing adsorbed enzymes and also for preventing leakage from polyacrylamide gels
The most common reagent used for cross-linking is glutaraldehyde

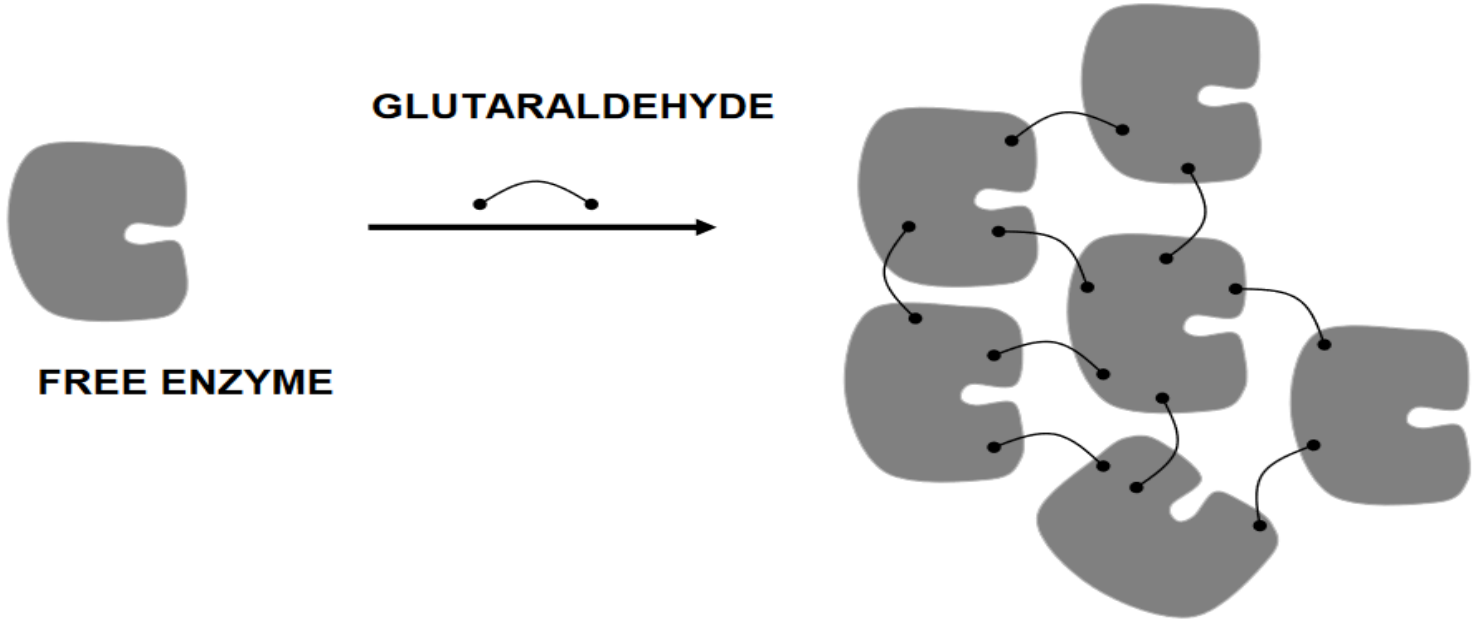
Disadvantages : Cross-linking reactions are carried out under relatively severe conditions. These harsh conditions can change the conformation of active center of the enzyme; and so may lead to significant loss of activity.

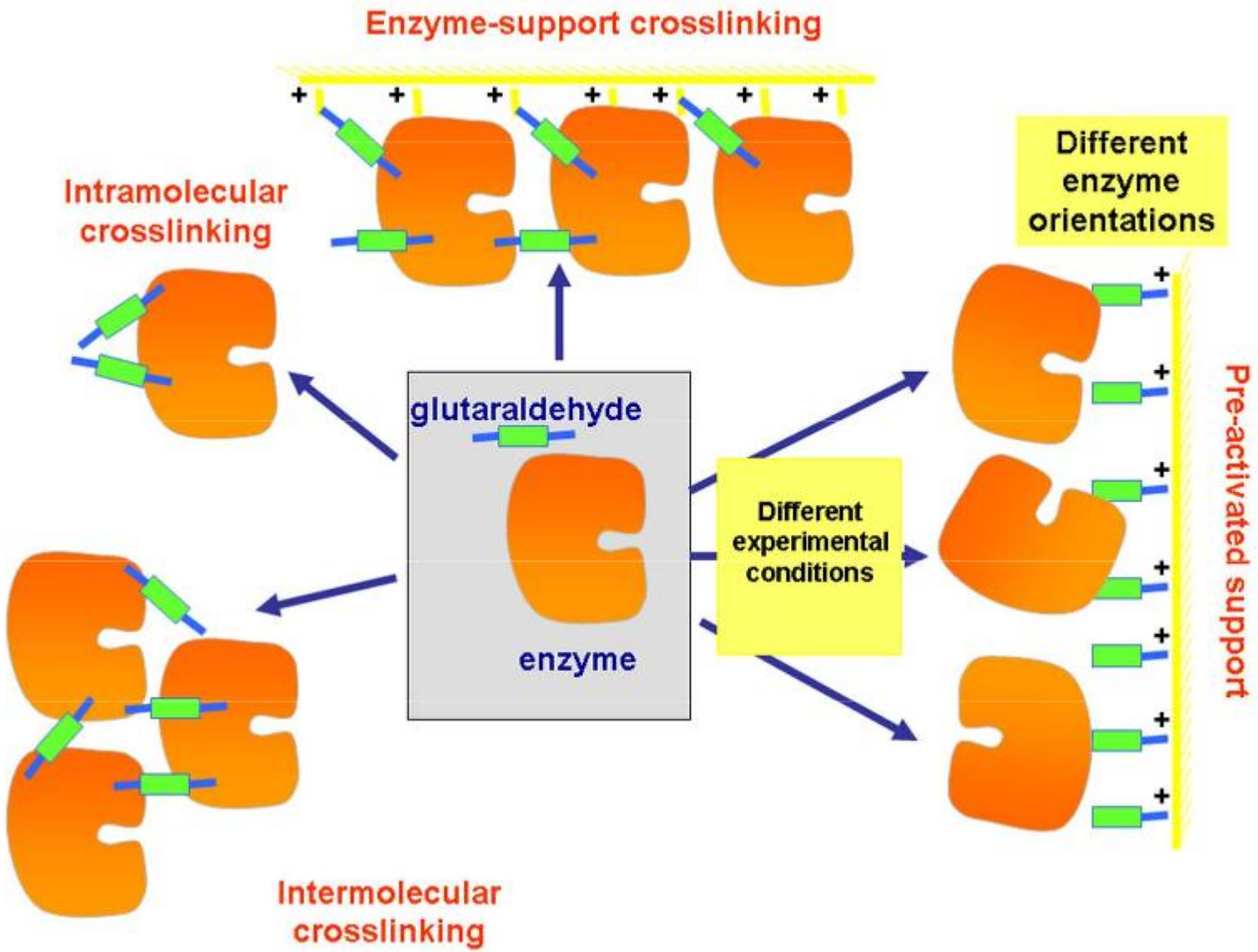




- Two aldehyde groups per molecule, with a longer, flexible hyrocarbon chain

Glutaraldehyde as intermolecular crosslinker of proteins




Enzyme-support crosslinking
Intramolecular crosslinking
Different enzyme orientations
glutaraldehyde
enzyme
Different experimental conditions
Pre-activated support
Intermolecular crosslinking

Entrapment:

Enzymes can be immobilized by physical entrapment inside a polymer or a gel matrix. The size of the matrix pores is such that the enzyme is retained while the substrate and product molecules pass through. In this technique, commonly referred to as lattice entrapment, the enzyme (or cell) is not subjected to strong binding forces and structural distortions.

This method differs from the covalent binding and cross linking in that the enzyme itself does not bind to the gel matrix or membrane. This results in a wide applicability

Entrapping Enzymes/cells

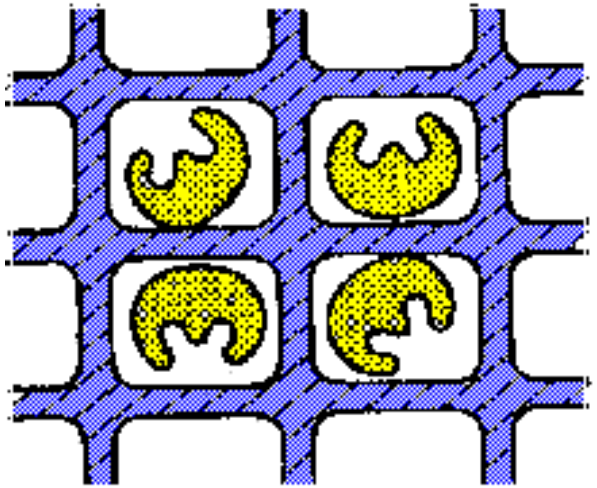
Entrapment immobilization process is conducted through two steps:

(1) mixing enzyme into a monomer solution

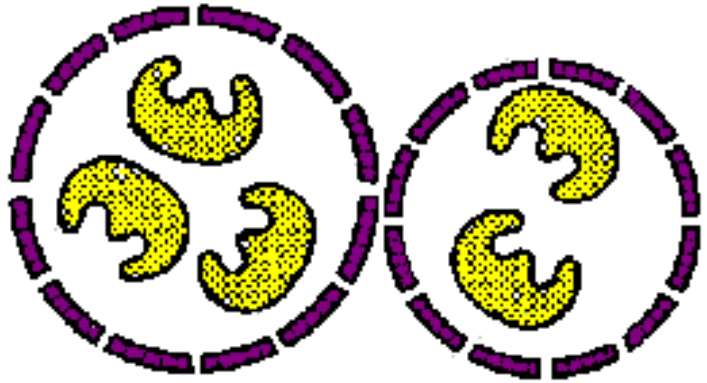
(2) polymerization of monomer solution by a chemical reaction

The method thus could **improve enzyme stability and minimize enzyme leaching and denaturation**. Another advantage of the method is the **capability to optimize microenvironment** for the enzyme by modifying the encapsulating material to have the optimal pH, polarity.

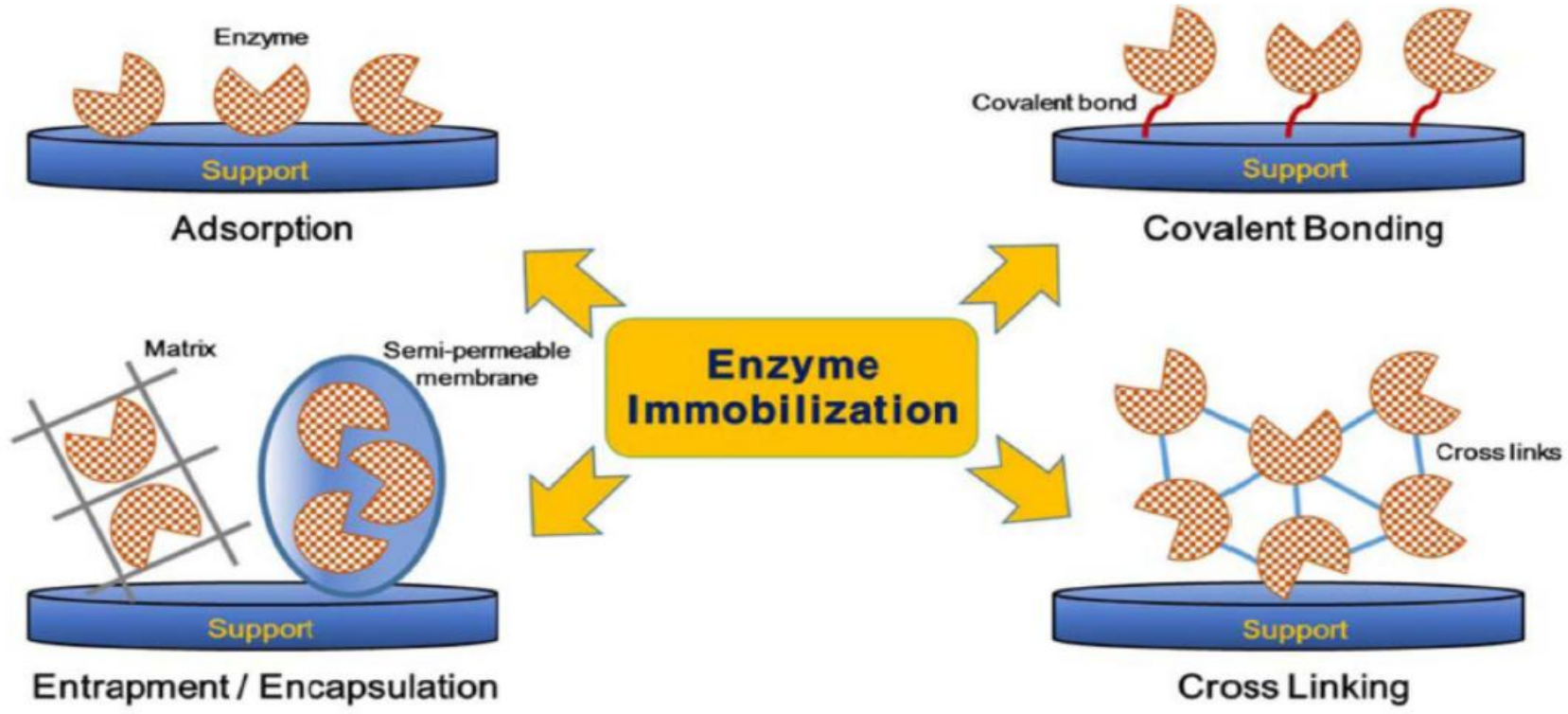
A limitation of the method is the **mass transfer resistance** occurred as polymerization extension tends to increase the gel matrix thickness, substrate for this reason can not diffuse deep into the gel matrix to reach the enzyme active site. Furthermore, the entrapped enzymes are likely to suffer from **leakage** if the pores size of the support matrix is too large.



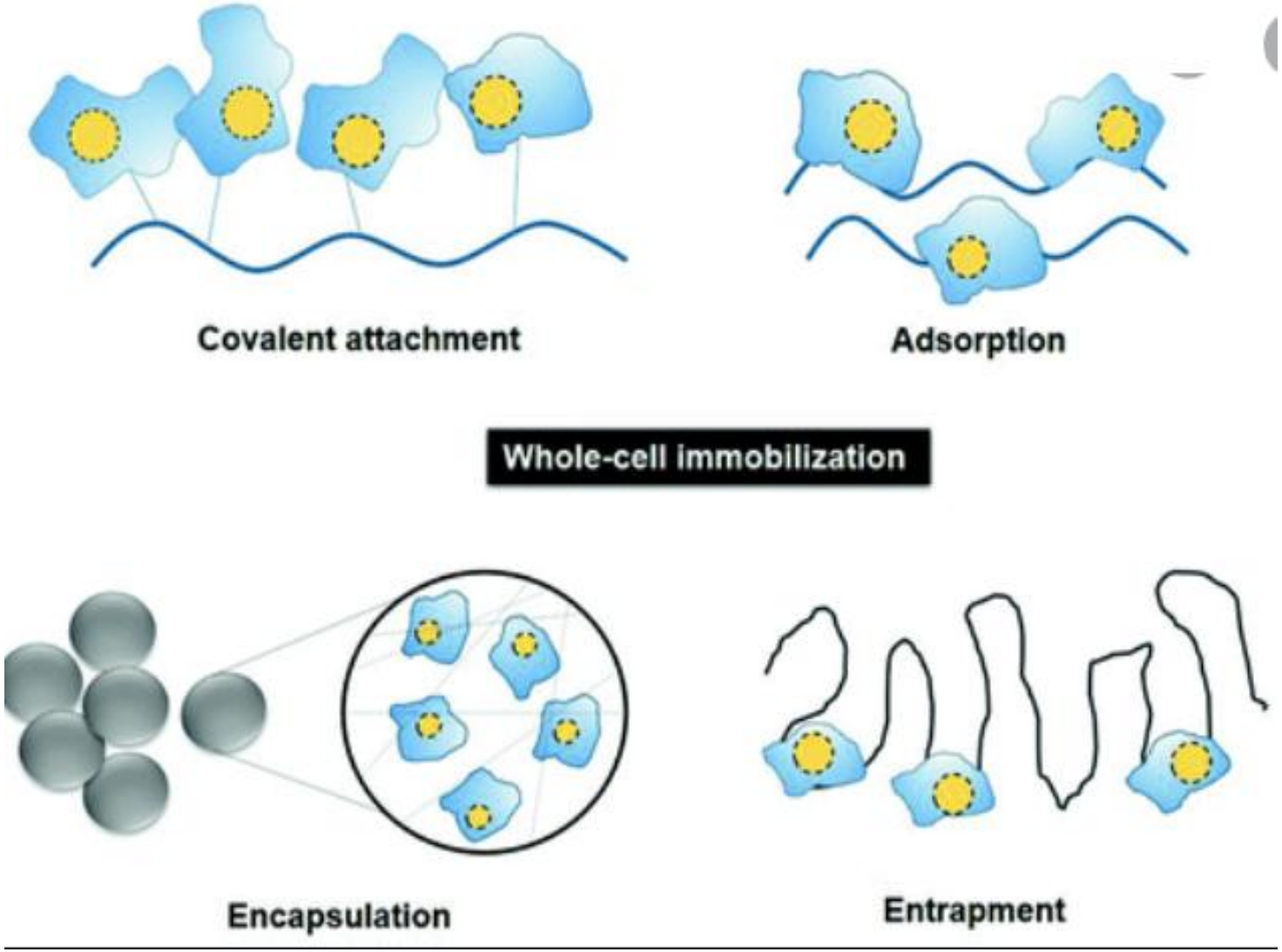
entrapped in a matrix



entrapped in droplets



Various methods of enzyme immobilization.

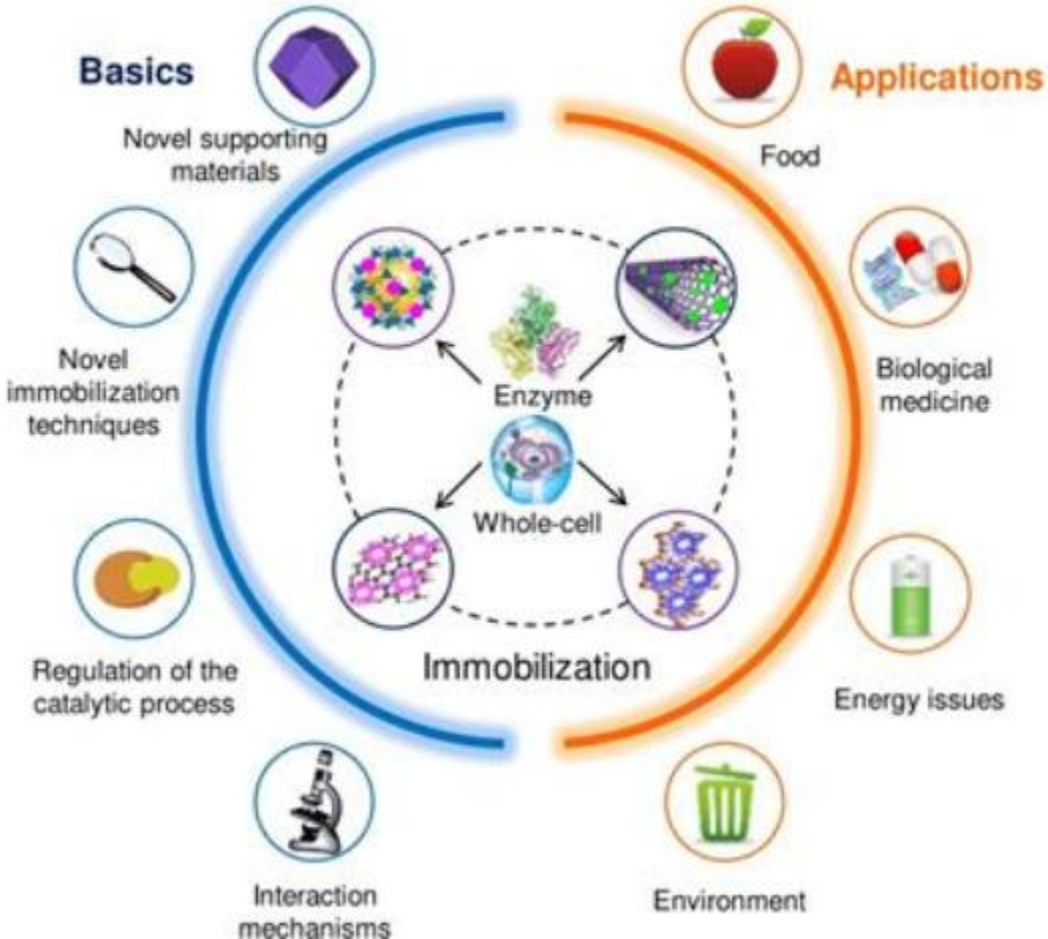

Covalent attachment
Adsorption
Whole-cell immobilization
Encapsulation
Entrapment

Advantages

- Enzymes are costly, Immobilization permits their repeated use.
- The product can be easily separated without any additional cost.
- Immobilized enzymes can be used in nonaqueous system.
- Continuous production system can be used.
- Thermo stability of some enzyme can be increased by immobilization.
- Enzyme can be used at much higher concentration then free enzyme.

Applications of immobilization

1. **Industrial production:** Industrial production of antibiotics, beverages, amino acids etc. uses immobilized enzymes.
2. **Biomedical applications:** Immobilized enzymes are widely used for diagnosis and treatment of many diseases such as inborn disorder.
3. **Food industry:** Enzymes like pectinases and cellulases immobilized on suitable carriers are successfully used in the production of jams, jellys and syrups from fruits and vegetables.
4. **Research:** The use of immobilized enzyme allow researcher to increase the efficiency of different enzymes such as different proteases for cell and organelle lysis.
5. Biodiesel production from vegetable oils.
6. **Textile industry:** Scouring, bio polishing and desizing of fabrics.
7. **Waste water management:** Treatment of sewage and industrial effluents.
8. **Detergent industry:** Immobilization of lipase enzyme for effective dirt removal from cloths.



Disadvantages

- Additional cost.
- It sometime affects stability and activity of enzyme.
- This approach can not be used when one of the substrates is insoluble.
- Some immobilization methods restricts the diffusion of substrate.

Applications of immobilized enzymes

Enzyme	Substrate	Product
Glucose isomerase	D-glucose	HFCS
Invertase	Sucrose	Invert sugar
Lipase	Vegetable oil	Cocoa butter substitute
Lactase	Milk and whey	Lactose free milk &whey
Nitrile hydratase	Acrylonitrile	Acrylamide
Raffinase	Raffinose	Raffinose free solution
Glucoamylase	Dextrins	D-glucose

Immobilized microorganism (microbial biocatalyst)	*Application(s)*
Escherichia coli	For the synthesis of L-aspartic acid from fumaric acid and NH_3
Escherichia coli	For the production of L-tryptophan from indole and serine
Pseudomonas sp	Production of L-serine from glycine and methanol
Saccharomyces cerevisiae	Hydrolysis of sucrose
Saccharomyces sp	Large scale production of alcohol
Zymomonas mobilis	Synthesis of sorbitol and gluconic acid from glucose and fructose
Anthrobacter simplex	Synthesis of prednisolone from hydrocortisone
Pseudomonas chlororaphis	Production of acrylamide from acrylonitrile
Humicola sp	For the conversion of rifamycin B to rifamycin S
Bacteria and yeasts (several sp)	In biosensors