

إنزيم

Enzyme Immobilization

الأستاذ الدكتور ضياء فالح عبد الله حلو الفكيكي.

كيمياء حيوية – إنزيمات

قسم علوم الأغذية-كلية الزراعة – جامعة البصرة

2019

يعرف ربط الأنزيمات بأنه العملية التي يتم بواسطتها ربط او حجز الأنزيمات بطرائق فيزيائية على سطح او داخل مواد سائدة غير فعالة مع احتفاظ الإنزيم بفعاليتها و إمكانية استخدامه لعدة مرات و بشكل مستمر . وان أول عملية ربط أجريت من قبل الباحثين Nelson and Griffin عام 1916 من خلال ربط الانفرتيز بواسطة ادمصاص الأنزيم على سطح الفحم الفعال اذ احتفظ الأنزيم بفعاليتها و هذا الاكتشاف كان عرضي ولا يعلم الباحثين كيف حدثت عملية الربط و لكن من تلك المدة وضع حجر أساس لربط الإنزيمات. وبدأ التفكير الفعلي بربط الإنزيمات في فترات الأربعينيات و جاءت مرحلة الخمسينات اذ كانت عمليات الربط للإنزيم تحدث فقط بطرائق الفيزيائية مثل الادمصاص الفيزيائية غير المحدود للأنزيمات على سطح المواد الداعمة . وتمكن الباحثين في هذه المرحلة من ربط الالفا-أميليز على الكاربون الفعال . وجاءت فترة التسعينيات التي كانت مدة ربط الأنزيمات الأكثر عقلانية اذ استعملت طرائق جديد في ربط الأنزيم مع دراسة التغيرات التي تحدث على الأنزيمات و دراسة الصفات الحركية مع دراسة ثبات الأنزيمات المرتبط وقد أجري أكثر من 5000 بحث من ضمنها براءة اختراع حول تقنيات ربط الإنزيم اذ ربطت مئات الإنزيمات بتقنيات ربط مختلفة فقد ربط الاميليز و الليبيز و البروتيزات كذلك الانفرتيز

و هناك فوائد عديدة لربط الإنزيمات منها استعمال الأنزيمات المقيدة لمدة أطول،أذ إنها تحتفظ بفعاليتها عند كل عملية استخدام وبذلك تقلل من تكاليف الإنتاج، زيادة ثباتية الأنزيمات المرتبطة تجاه الحرارة و

الرقم الهيدروجيني و القوة الأيونية وذلك لحساسية الإنزيمات الحرة تجاه التغيرات هذه ، كما لها إمكانية إنهاء عملية التفاعل في الوقت المناسب وتقليل التفاعلات غير المرغوبة التي تحدث بعد انتهاء التخمير ، سهولة تنقية واستخلاص نواتج عملية التخمير لخلوها من الأنزيم و تنوع استعمالات الأنزيمات المرتبطة فضلاً عن الناحية الاقتصادية في استخدام كمية الأنزيم نفسها لأكثر من مرة و عدم خروج الإنزيم مع الناتج النهائي مما يؤدي ذلك الى حدوث عيوب في المنتج وقد استخدم كل من الالفا- أميليز و البكتيناز المرتبط في التحلل حبيبات النشوية والمواد البكتينية الموجودة في عصير التفاح الطبيعي اثناء مرحلة الترشيح الفائق للعصير.

2-18 : طرائق ربط الأنزيمات و Methods for Enzyme Immobilization

تقسم الى ثلاثة مجاميع رئيسة، كما موضح في الشكل (2-4) :

2-18-1 : الارتباط بالتحميل Carrier Binding

أ- الادمصاص الفيزيائي Physical Adsorption

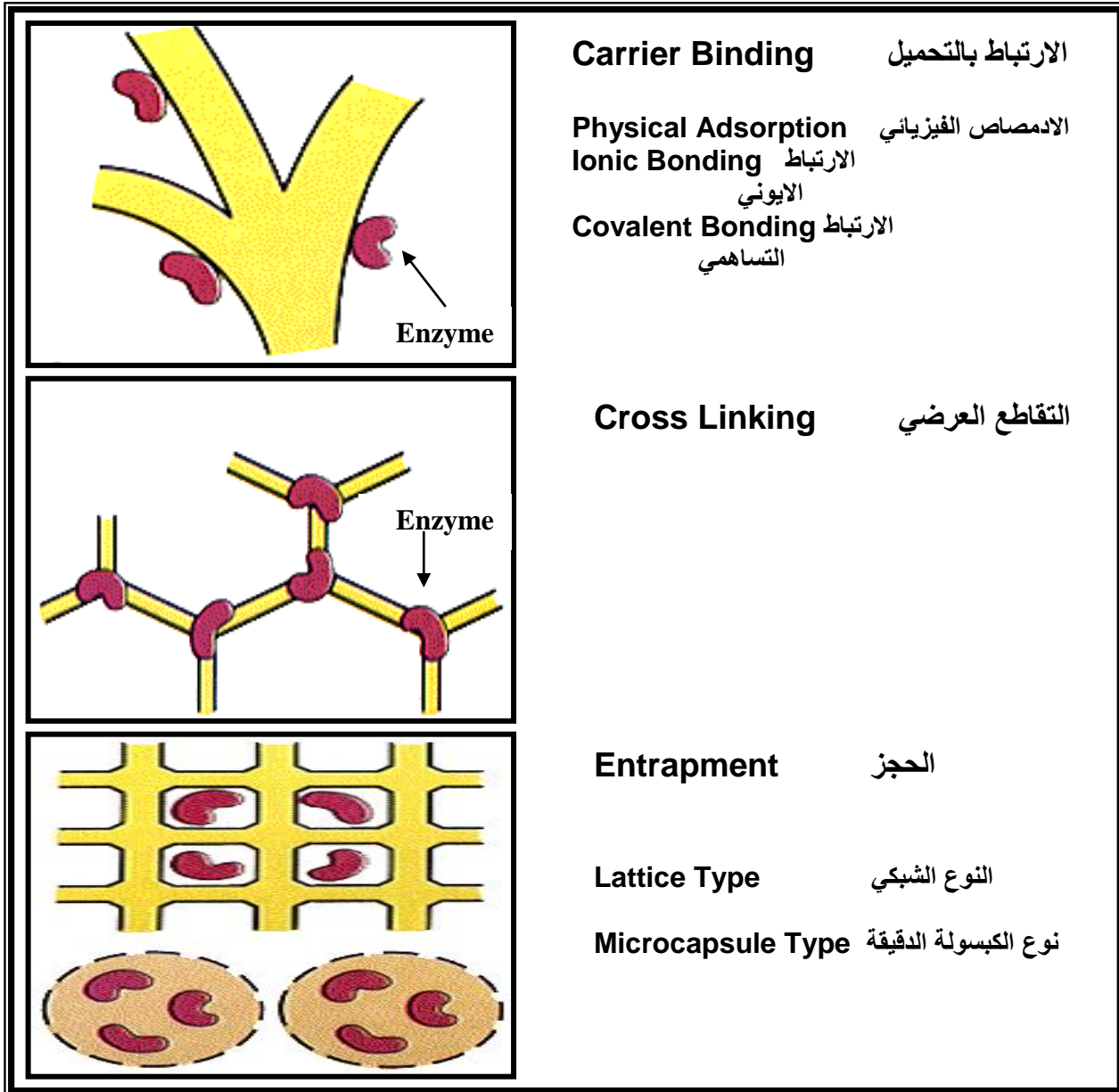
ب- الارتباط الأيوني Ionic Bonding

ج- الارتباط التساهمي Covalent Bonding

تعتبر هذه الطريقة منقى ربط الإنزيمات من أقدم طرائق ربط الإنزيمات وهي عملية أدمصاص فيزيائية تحدث للإنزيم المراد ربطه على المادة الداعمة الصلبة ، و هي من الطرائق السهلة و الرخيصة في الوقت نفسه، وتعتمد هذه التقنية على طبيعة الارتباط الفيزيائي غير المتخصص بين البروتين الأنزيمي و سطح المادة الداعمة ، و لهذه الطريقة مميزات : هي كونها رخيصة الثمن و سهولة ربط الأنزيم فيها و لها اقل تأثير في الأنزيمات المرتبط مقارنة بطرائق الارتباط الكيميائية ، و هي أكثر الطرق استعمالاً في ربط الأنزيمات على نطاق تجاري .

و تجري عملية الربط بشكل رئيس بوساطة الأواصر الهيدروجينية و الجسور الملحية و قوة فاندروالز Van der waals بين الإنزيم و المادة الداعمة و من عيوب هذه الطريقة ضعف قوة الأواصر التي تربط الإنزيم و المادة الداعمة نتيجة تأثرها بالقوة الأيونية و الرقم الهيدروجيني للوسط الموجود فيه الأنزيم المرتبط وقد يحدث تسرب أو فقد للأنزيم المرتبط نتيجة كسر الأواصر بين الأنزيم و المادة الرابطة لذا يجب توفر الظروف المناسبة من الرقم الهيدروجيني و القوة الأيونية في الوسط التفاعلي الذي يحوي الأنزيم المرتبط . و هذه بعض المواد المستخدمة في ربط الإنزيمات في تقنية الادمصاص :وهي الكربون

silica gel, calcium ، الألويمينات الكالسيوم ، alumina ، الألويمينات ، activated carbon الفعال
 CM-Sephadex, CM- ، DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex, ، alumina carbonate,
 Amberlite CG-50 ، ion exchange resin, وراتجات المبادلات الأيونية ، Cellulose
 (Monsan and Combes 1988)



شكل (4-2): أنواع تقنيات ربط الإنزيمات

في هذه الطريقة تتم عملية الربط بوساطة ربط الإنزيمات إلى مواد داعمة صلبة عبر الالتصاق التساهمي، وهذا يؤدي إلى ربط الإنزيمات بشكل قوي، و يكون الإنزيم أكثر استقراراً و يحتفظ بفعاليتة

الأنزيم لمدة طويلة عند الاستخدام ، و تعد هذه الطريقة من الطرائق الصعبة مقارنة مع الطرائق الأخرى ؛ لأنها تحتاج إلى توفر ظروف خاصة لكي تجري عملية ارتباط تساهمي بين الأنزيم و المادة الداعمة للأنزيم فضلاً عن ذلك قد يحدث ارتباط للأنزيم بالمادة الداعمة في المواقع الفعالة ، مما يؤدي لتقليل نشاط الإنزيم الذي بدوره ينعكس على عملية ربط الأنزيم . ميزات ربط الالفا-أميليز بوساطة تقنية الارتباط التساهمي هي ان الأنزيم المرتبط لا يحدث فيه فقد لان عملية الربط قوية كذلك يسمح هذا النوع من الربط الى تفاعل الأنزيم بسهولة مع المادة الخاضعة مع زيادة الثبات الحراري للأنزيم المرتبط بسبب التفاعل القوي بين الأنزيم و المادة الداعمة له .

2-18-2 الحجز Entrapment

و تقسم هذه التقنية الى نوعين من الارتباط هما

أ - نوع الشبكة Lattice Type

ب- نوع الكبسولة الدقيقة Microcapsule Type

و هي من طرائق ربط الإنزيمات التي تعتمد على حجز الإنزيمات ضمن شبكة من الهلام المتعدد سواء كان هذا الهلام صناعي ام طبيعي ، و هذه التقنية من ربط الإنزيمات تسمح للانتشار الحر لجزيئات المادة الخاضعة ذات الوزن الجزيئي المنخفض في حبيبات الربط للإنزيمات في هذه التقنية فضلاً عن انتشار نواتج التفاعل في الوسط . وتعتمد هذه العملية على خلط الأنزيم مع المواد الرابطة للإنزيم قبل البلمرة ، و ثم تجري مرحلة البلمرة اذ يحجز الإنزيم داخل الشبكة المتعددة نتيجة تكون جسور رابطة بين جزيئات المادة المتبلرة ولا تحدث إي عملية ارتباط بين الإنزيم و المادة المتبلرة ، و إنما فقط حجز الإنزيم داخلها و بالتالي لا تسبب هذه العملية إي عرقلة لجزيئات الإنزيم . و تتميز هذه الطريقة من الربط لكونها تجعل المادة الخاضعة سهلة الاتصال بالإنزيم ، وسهولة انتشار المواد الناتجة من تفاعل الإنزيم مع المادة الخاضعة في الوسط . و يعاب على هذه الطريقة هو فقط استخدام الإنزيمات التي تعمل على مواد خاضعة ذات أوزان جزيئية واطئة كذلك يحدث تسرب و فقد للإنزيم بمرور الوقت ما لم يتم تقوية ربط الأنزيمات بالمادة المتبلرة ، مما تؤدي هذه العملية الى أطالة عمر الأنزيمات المرتبط حتى بعد عمليات الغسل الطويلة للأنزيم المرتبط و من المواد المستخدمة في هذه الطريقة هي الألبينات Alginate ، و البولي اكريل اميد Polyacrylamide و الجيلاتين والأكاروز Agarose

3-18-2 التقاطع العرضي Cross Linking

تتم عملية ربط الانزيمات بهذه الطريقة بوساطة الترابط المتقاطع بين جزيئات كل من البروتين الانزيمي بجزيئات بروتين الأخرى المرتبطة بمادة داعمة لها غير فعالة . او عبر الارتباط في مجموعة وظيفية تتكون من مادة سائدة غير ذائب و بالتالي سوف تكون سلاسل من الببتيدية المتعدد Polypeptide . ومن مميزات هذه الطريقة الادمصاص القليل جداً للأنزيم و عملية الربط بوساطة الأواصر التساهمية قوي جداً كما تستخدم في هذه الطريقة مواد مستقرة في ربط الأنزيمات و لا يحدث تسرب للأنزيم . و من عيوب هذه الطريقة ان عملية الارتباط قد تسبب تغيرات هامة في المواقع الفعالة النشطة للإنزيمات ، كما يحدث فقدان في فعالية الأنزيمات عند إجراء عملية الربط .

2- 19: طرق استخدام الإنزيمات المرتبطة

لقد استعملت الأنزيمات المرتبطة في مجالات مختلفة على نطاق تجاري بالشكل الآتية :

1 - الطريقة المستمرة

يمثل الإنزيم المرتبط الطور الصلب الساكن في العمود المفتوح الطرفيين ، و يتم ضخ المادة الخاضعة الى العمود و هذه الطريقة تستخدم على نطاق تجاري لما لها من مميزات .

2 - طريقة الوجبة

و هو استخدام الإنزيم المرتبط فضلاً عن الوسط بشكل وجبة ، و استخراجها من وسط التفاعل و غسله ، و استخدامه مرة أخرى، وهذه الطريقة قليلة الاستخدام في النطاق التجاري

3 - طريقة الرقائق

و هي طريقة يربط فيها الإنزيم على صفائح او رقائق و هذا النوع من الإنزيمات المرتبطة ذات استخدام واحد .هي مستخدمة بشكل كبير في مجال الطب و الكيمياء الحياتية .

واستطاع (2002) Varavinita et al. من ربط الالفا- أميليز المقاوم للحرارة المستخلص من بكتريا على مادة البكاز المؤكسد Bagasse الذي يتم اكسدته بوساطة حامض بيردوك periodic acid وذلك لتكوين جذور حرة من الالديهيدات على المادة السليلوزية الغني في البكاز و

استطاع (2003) Atia et al., من ربط البيتا - أميليز المنتج من الشعير على نوعين من مادة polyacrylamide polymer derivatives و باستعمال تقنيتين من الربط هما Covalent

و Cross linking و قد أعطت تقنية Cross linking أعلى كفاءة ربط من الطريقة Covalent اذ

بلغت 70% . كما تمكن (2003) Dey et al. من ربط الالفا- أميليز المنتج من بكتريا *Bacillus*

circulans باستعمال تقنية الحجز entrapment من خلال حجز الأنزيم بحبيبات مادة beads calcium alginate ودرس تأثير حجم حبيبات الجينات الكالسيوم على كفاءة الربط و تأثير الربط على الصفات الحركية للالفا- أميليز المرتب . و توصل (Raviyan et al., 2003) الى ربط الالفا-أميليز المنتج من *Aspergillus oryzae* من خلال تقنية الحجز باستعمال مادة polyacrylamide gel و استخدام للالفا-أميليز المرتبط مؤشر في نجاح او فشل عملية البسترة في بعض في الصناعات الغذائية و خصوصاً في صناعة الروبيان المثلوم و البطاطة المهروسة . واستطاع (Pandya et al., 2005) من دراسة ثباتية الالفا-أميليز المرتبط على مادة السيلكا silicas اتجاه التغير بالرقم الهيدروجيني. كما تمكن (Kara et al., 2005) من استخدام تقنية الادمصاص على ربط الالفا- أميليز البكتيري على مادة ethylene glycol dimethacrylate-n-vinil imidazoli . و تمكنوا من ربط و البيتا- أميليز و كلوكوأميليز على مادة الاكيرييل acrylic باستعمال تقنية الارتباط بالتحميل . كما قام (Kahraman et al., 2006) من ربط الالفا- أميليز على Acrylated epoxidized soybean resin باستعمال تقنية الحجز و الربط التساهمي ، و درس خصائص الأنزيم المرتبط و الحر .