SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

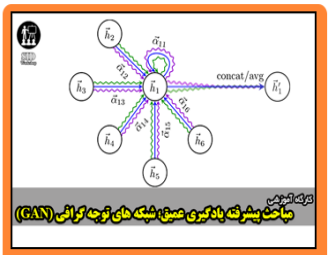
سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین مکالمه روزمره انگلیسی

کارگاه آنلاین آموزش استفاده از وب آو ساینس



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی

(Graph Attention Networks)

Archive of SID

INTERNATIONAL CONFERENCE ON RESEARCH IN SCIENCE AND TECHNOLOGY
14 December 2015, Kualalumpur –Malaysia

بیوالکتروشیمی درتثبیت آنزیم و پروتئین

مهنازمرادی

دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان ،بندرعباس،ایران

دانشگاه پیام نورتفت،یزد،ایران

Mahnazmoradi66@yahoo.com

جوادپوردکان

دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

Jpordakan2@gmail.com

چکیده

آنزیم و پروتئین تثبیت شونده، آنزیم یا پروتئینی است که به ماده ای نامحلول و بدون تحرک، نظیر کلسیم آلژینات متصل گردد. این وضعیت می تواند منجر به افزایش مقاومت نسبت به تغییرات اعمالی نظیر تغییرات pH و یا دما گردد.آنزیم ها و پروتئین های تثبیت شده بطور معمول در زمینه های پزشکی برای تشخیص و درمان بیماری های مختلف ودر زمینه های صنعتی مورد استفاده قرار می گیرند. روش های مختلفی برای تثبیت آنزیم بکار گرفته می شود که از جمله این روش ها به روش برگشت پذیر و غیربرگشت پذیر می باشد. مفهوم تثبیت غیربرگشت پذیر به این معنی است که بیوکاتالیست به ماتریس متصل می شود و در صورت جداسازی از ماتریس فعالیت بیولوژیکی خود را از دست می دهد. آنزیم تثبیت شده به روش برگشت پذیر می تواند از ماتریس تحت شرایط ملایم جدا شود. روش های برگشت پذیر تثبیت آنزیم به دلایل اقتصادی بسیار مورد توجه است،با این حال سطحی که انتخاب می گردد موجب پایداری عملکرد آنزیم تثبیت شده در سیستم می باشد ویژگی های ماتریس بیشترین اهمیت را در تعیین عملکرد سیستم تثبیت آنزیم دارند. آنزیم های تثبیت شده برای مقاصد تجاری بسیار مورد کاربرد هستند.

واژگان کلیدی: ماتریس،بیوکاتا لیست،تثبیت برگشت پذیر، غیربرگشت پذیر

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه ای بر تثبیت آنزیم و پروتئین

آنزیم ها قدرتمند ترین زیرساختارهای سلولی محلول در آب، در دنیای زیست شناسی هستند، که قادر به کاتالیز سوبسترای خود به مواد متنوع و محصولات متعدد بدون تغییر خود می باشند. صنایع کشاورزی، تولیدات صنعتی، داروسازی، تولید انرژی و تمامی مفاهیم و مبانی صنعتی و همچنین سعی و تلاش انسانی همگی به گونه ای وابسته به فعالیتهای آنزیمی هستند. یک آنزیم، مشابه یک کارخانه بسیار قدرتمند می باشد که بطور شیمیایی عمل نموده و نیاز به شرایط خاصی برای عملکرد مناسب دارد. سلول ها دارای هزاران کارخانه اینچنینی می باشند که واکنش های شیمیایی را برای تداوم بقا در خود ساخته و برای انجام کاربردهای مفید در درون خود مورد استفاده قرار می دهند. با این حال، آنزیم ها دارای ویژگی های شکننده ای بوده و تنها در دماها و شرایط محیطی خاص که در درون سلول سازنده آنها وجود دارد قادر به عملکرد می باشند. این خاصیت شکنندگی، تاکنون موجب محدود کردن محققین در کنترل واکنش های آنزیمی و یا استفاده مجدد از آنزیم ها شده است. در پی یافتن راهکار برای استفاده از آنزیم ها و پروتئین ها در محیط خارج از بدن سالها محققین سعی در تثبیت سازی آنزیم ها به منظور استفاده در واکنش های شیمیایی داشته اند؛ که بدلیل شکنندگی آنزیم در محیط هایی مغایر با سیستم های سلولی انجام می شود. تثبیت سازی پروتئین و آنزیم مجموعه ای از فرآیند ها می باشد که منجر به ایجاد محیطی مناسب برای جلوگیری از حذف پروتئین و آنزیم می گردد (Talbert & Goddard, 2012).

تعریف تثبیت

واژه تثبیت سازی به محدود کردن تحرک ترکیبات و یا ناتوان سازی در حرکت ترکیبات مورد نظر اتلاق می گردد و فرایندی را که در آن پروتئین یا آنزیم به صورت فیزیکی درفضایی از یک بستر تعیین شده، با حفظ فعالیت کاتالیتیکی محدود می شود و چندین بار قابلیت استفاده دارند تثبیت پروتئین یا آنزیم گویند.

فرایندهای تثبیت سازی بیوکاتالیست ها از نظر اقتصادی بسیار قابل توجه بوده و منجر به توسعه فرایندهای زیستی مدوام می گردد. بیوکاتالیست ها را می توان با استفاده از آنزیم های ایزوله شده و یا سلول های کامل تثبیت نمود. مزیت های استفاده از آنزیم های تثبیت شده در انجام فرایندهای شیمیایی بی نهایت زیاد است. رویکردهای جدید و متنوع تحقیقاتی نظیر تولید انرژی بر اساس منابع هیدروژنی بواسطه سلول ها، تخلیص و جداسازی مواد زیستی و شیمیایی برای تجویز و استفاده دارویی،

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی- خنثی سازی مواد شیمیایی بالقوه خطرناک بواسطه ترکیبات زیستی تنها تعداد کمی از موارد کاربردی معدود واکنش های آنزیمی هدفمند هستند. آنزیم ها و پروتئین های تثبیت شده بطور گسترده ای در بسیاری از زمینه ها مورد استفاده قرار گرفته و دارای کاربردهای پزشکی و صنعتی میباشند. آنزیم ها و پروتئین های تثبیت شده پتانسیل زیادی در آنالیزهای کلینیکی، صنعتی و نمونه های محیطی دارند و به میزان بالایی در تولید آنتی بادی ها، متابولیسم دارو، صنعت غذا، تولید سوخت زیستی و پاکسازی زیستی مورد استفاده قرار میگیرند. ویژگی های بستر تثبیت و روش تثبیت از موارد مهم در تثبیت آنزیم و پروتئین به شمار می روند. (Mohamad et al., 2015). در حال حاضر آنزیم و پروتئین تثبیت شده به طور معمول در زمینه های پزشکی برای تشخیص و درمان بیماری های مختلف مورد استفاده قرار می گیرند. پروتئین های مختلف مانند آنتی بادی ها، آنزیم ها، گیرنده ها در زمینه های پزشکی تحولات اساسی در مدت زمان تشخیص، نیروی انسانی، دقت و تکرارپذیری ایجاد کرده اند. این کاربردها شامل استفاده از آنتی بادی ها یا آنتی ژن های تثبیت شده در کروماتوگرافی میل ترکیبی، گیرنده یا لیگاندهای تثبیت شده برای مطالعه میانکنش های آنها و سلولهای تثبیت شده در زیست حسگرها می باشد. الکترود های بر پایه آنزیم کاربرد اصلی آنزیم های تثبیت شده را در پزشکی ارائه می دهند. زیست حسگرهای مورد استفاده در کاربردهای کلینیکی دارای مزایایی مانند تکرارپذیری، حساسیت، دقت، حمل آسان و هزینه پایینتر در مقایسه با روشهای تشخیص متداول میباشند (D'Orazio, 2003).

در ابتدا، فقط تثبیت یک نوع آنزیم استفاده می شد، اما در سال ۱۹۷۰ استفاده از سیستم کمپلکس، شامل دو آنزیم که با عوامل بازسازی کوفاکتور و سلول های زنده واکنش می دهند انجام شد. اجزای اصلی در تثبیت آنزیم، بستر و نوع پیوند است یعنی بستر تثبیت نقش مهمی را در کاربردی بودن آنزیم تثبیت شده با توجه به مقرون به صرفه بودن و فراهم کردن سطح کافی برای تثبیت مناسب به عهده دارد. پروتئین ها و آنزیم ها می توانند به صورت فیزیکی برگشت پذیر، بر روی بستر جذب و یا به حالت پایدار پیوند کووالانسی تشکیل دهند. معمولاً پیوند کووالانسی از طریق پیوند آمیدی، اتر، تیو اتر، یا کاربامات حاصل می شود. در نتیجه ی تثبیت آنزیم، ویژگی هایی از قبیل فعالیت کاتالیتیکی یا پایداری حرارتی تغییر می یابند. این اثرات کاملاً اثبات شده هستند. مفهوم پایداری از مهمترین مفاهیم در تثبیت آنزیم هاست (برای مثال تثبیت پروتئین از طریق اتصال چندتایی کووالانسی) (Sassolas et al., 2012).

www.SID.ir

Archive of SID

تاریخچه تثبیت

تثبیت یک پدیده طبیعی است که در تمامی اکوسیستم های زیستی دیده می شود. میکروارگانیسم ها در طبیعت دارای توزیع نامنظمی هستند و غالبا به صورت بیوفیلم ها دیده می شوند. بیوفیلم ها مجموعه ای از میکروارگانیسم های متصل به سطوح می باشند که تشکیل چندین لایه سلولی و شبکه های هیدراته ای را می دهند. در تمامی اکوسیستم های شناخته شده، باکتری ها معمولا بر روی سطوح تکثیر می یابند که این وضعیت نسبت به تکثیر در فاز سوسپانسیونی و در فاز آبی ارجحیت دارد. بیوفیلم ها در ابتدا در طی سالهای ۱۹۴۰ تحت بررسی قرار گرفتند اما به طور خاص در دهه ۱۹۷۰ به تمامی محیطهای زیستی و طبیعی نسبت داده شدند. سنگ های رودخانه، اعضاء و قطعات کاشته شده در بدن انسان، دندان ها، لوله های آب و فاضلاب و بسیاری موارد دیگر همگی جایگاه شکلگیری و رشد بیو فیلم ها هستند. این پدیده طبیعی منجر به شکل گیری انگیزه های انسان در جهت استفاده از آن شد. از آن زمان تاکنون مطالعات بسیار گسترده ای برای تثبیت سلول ها و صنعتی سازی آنها به انجام رسیده است. در سال ۱۹۱۶ این مطلب که آنزیم زمانی که در آب بصورت غیر محلول قرار بگیرید ویژگی های کاتالیتیکی از خود بروز می دهد، کشف گردید. آنزیم اینوتاز جداسازی شده از مخمر جذب سطحی زغال گردید و همچنان فعالیت اصلی و طبیعی خود را نیز حفظ کرد.

همچنین در سال ۱۹۴۸ تحقیقاتی پیرامون آنزیم اوره آز انجام شد که در محیط آبی نامحلول حاوی ۳۰٪ الکل و کلرید سدیم به مدت ۱ الی ۲ روز در دمای اتاق نگهداری شد و در طول این مدت آنزیم اوره آز نامحلول مذکور واجد فعالیت زیستی بود. بنابراین از مدتها قبل این مطلب که آنزیم ها در محیط آبی نامحلول خاصیت کاتالیتیکی از خود نشان می دهند کاملا شناخته شده بود. با این حال، سعی و تلاش های اولیه برای تثبیت سازی آنزیم بر اساس ویژگی های آنزیم مربوطه در محیط و بستر مناسب تا سال ۱۹۵۳ به انجام نرسید؛ تا در این زمان کربوکسی پپتیداز، دی استاز و پپسین و ریبونوکلئاز با استفاده از رزین پلی آمینوپلی استیرن دیازوتیز تثبیت گردیدند (Cao, 2006).

آنزیم ها می توانند در دو حالات واکنش ها را کاتالیز کنند:

- به شکل مولکولهای منفرد در توده محلول با مواد دیگر
- به شکل متصل شده به سطح

www.SID.ir

Archive of SID

حالت تثبیت شده یا متصل شده مورد توجه کسانی است که تمایل به بهره برداری از آنزیم ها برای مقاصد فنی دارند. تثبیت کاتالیزورها در بسیاری از موارد موجب افزایش عملکرد فرآیندهای صنعتی و بهبود هزینه های اقتصادی می شود .

اولین کاربرد صنعتی تثبیت آنزیم ها در سال ۱۹۶۷ توسط چیباتا[1] و همکاران گزارش شد، که آمینواستیلازآسپرژیلوس اورایزه[2] را برای وضوح سنتز اسیدهای آمینو راسمیک[3] تثبیت کردند از کاربردهای دیگرتثبیت آنزیم ها در صنعت، تولید قند، آمینواسیدها، و مواد دارویی است (جدول ۱-۲) در برخی از فرآیندهای صنعتی، سلولهای میکروبی حاوی آنزیم مورد نظر، تثبیت شده و به عنوان کاتالیزوراستفاده می شوند (Katchalski-Katzir, 1993).

در سال ۱۹۷۳ محققین به انجام فرایندهای پیوسته صنعتی برای تولید اسید آمینه L- آسپارتات از تثبیت سازی، دست یافتند. گذشته از استفاده در فرآیندهای صنعتی، برای تکنیک های تثبیت پایه ای کاربردهای درمانی نیز پیش بینی شده اند، مانند استفاده آنزیم در شانت بدنی[4] (Guibault, et al., 1991; Taylor, 1991). از سه یا چهار دهه گذشته، تکنولوژی تثبیت به سرعت در حال توسعه است و به طور فزاینده ای تبدیل به یک طراحی منطقی مهم شده است، اما هنوز هم نیاز به توسعه بیشتر وجود دارد. گسترش استفاده از پروتئین ها و آنزیم های تثبیت شده برای فرآیندهای دیگر، نیاز به روش های جدید و درک بهتر از تکنیک های فعلی دارد تا عملی شود (Bickerstaff, 1992).

مراحل توسعه تثبیت آنزیم و پروتئین

به طور کلی تاریخچه تثبیت بیوکاتالیست ها در سه مرحله مورد توجه قرارمی گیرد (جدول۱-۳). مرحله اول، در آغاز قرن ۱۹، تثبیت میکروارگانیسم های صنعتی به صورت تجربی انجام شد (Hartmeier, 1988). تاریخ مدرن تثبیت آنزیم به سال ۱۹٤۰ باز می گردد، اما کارهای اولیه در این زمینه توسط زیست شیمی دانها نادیده گرفته شد چون تحقیقات اولیه در ژورنالهای سایر رشته ها چاپ می شد. پایه تکنولوژی های امروز در سال ۱۹۶۰ گسترش یافت و مقالات افزایش زیادی داشت. در مرحله دوم، تثبیت آنزیم تنها، انجام شد، اما در سال ۱۹۷۰ سیستم های پیچیده تری، شامل واکنش دو آنزیمی با کوفاکتور و سلول زنده توسعه یافت (Bickerstaff, 1995).

[1] Chibata
[2] *Aspergillus oryzae* aminoacylase
[3] Racemic D-L amino acids
[4] Shunt

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم و پروئین تثبیت شونده

آنزیم و پروتئین تثبیت شونده، آنزیم یا پروتئینی است که به ماده ای نامحلول و بدون تحرک، نظیر کلسیم آلژینات متصل گردد. این وضعیت می تواند منجر به افزایش مقاومت نسبت به تغییرات اعمالی نظیر تغییرات pH و یا دما گردد. این امر همچنین منجر به حفظ فعالیت آنزیمی بدنبال جداسازی آنها از سطح مورد استفاده گردیده و استفاده مجدد از آنزیم را در مراحل بعدی امکان پذیر می سازد که این مسئله در نوع خود در تولیدات صنعتی و واکنش های صنعتی بسیار موثر، کارآمد و مورد نیاز می باشد. روش مشابه و جایگزین برای تثبیت سازی، روش تثبیت سازی سلولی می باشد.

توانایی آنزیم در انجام واکنش های کاتالیتیکی، این ترکیبات را به شکل غیرقابل اجتنابی به مهمترین عوامل انجام واکنش های زیستی در طول ده های گذشته تبدیل نموده است. تثبیت سازی آنزیم ها به طور شگفت آوری با ارزش است چراکه قادر به استفاده مجدد از آنزیم ها پس از استفاده از آنها در طول یک فرایند خاص خواهیم بود و بدین ترتیب نیمه عمر بالا و تجزیه پذیری کمتری را مشاهده خواهیم کرد که بدین ترتیب واکنش ها نه تنها کنترل می گردند بلکه نرخ انجام واکنش ها و سرعت انجام آنها، همچنین شروع یکسری واکنش ها و توقف آنها چه از نظر زمانی و چه از نظر نوع انجام واکنش کاملا تحت کنترل خواهند بود. تثبیت سازی آنزیم ها منجر به جلوگیری از آلودگی سوبستراهای پروتئینی/ آنزیمی و سایر ترکیبات نیز می گردد که میزان هزینه تخلیص را نیز کاهش می دهد. تثبیت آنزیم پایداری و نیمه عمر آنزیم را افزایش می دهد اما در عین حال اجازه می دهد تا آنزیم ها در مقیاس وسیعتر و محدوده های اکو سیتمی بزرگتر و احتمالا در تعامل با سایر آنزیم ها عمل نماید. تثبیت آنزیم ها نیازمند شکل گیری محیطی می باشد که فعالیت آنزیمی در آن از نظر دمایی و pH مربوطه، مشابه محیط ابتدایی عملکرد آن در سلول مبدا باشد (Tischer & Wedekind, 1999).

کاربرد تثبیت در صنعت

پیشرفتهای اخیر در بیوتکنولوژی صنعتی استفاده از آنزیم های تثبیت شده را برای انواعی از کاربردهای صنعتی و تولیدی، قابل استفاده ساخته است. این افزایش کاربردها در تعداد زیادی از رویکردهایی که با تثبیت آنزیمی هم راستا هستند، دارای زمینه های تحقیقاتی متنوع و زیادی نیز در زمینه تثبیت آنزیم ها می باشند. اخیرا تحقیقات ویژه ای در ارتباط با ابداع روش های

www.SID.ir

Archive of SID

جدیدتری برای تثبیت انجام شده است که منجر به شکل گیری روش های جدیدتری برای تولید و یا تجزیه یکسری ترکیبات، بواسطه واکنش های بیوکاتالیتیکی شده و همچنین آنزیم های تثبیت شده ای برای هدف گیری داروها و شناسایی تومورهای مورد نظر و استفاده از آنها در حسگرهای زیستی شده است،که از کاربردهای مهم تثبیت آنزیم ها و پروتئین ها به شمار می رود. روشهای ابتدایی برای تثبیت سازی بدون تنوع سوبستراهایی که آنزیم ها بر روی آنها جذب می شوند ارائه گردید، اما می بایست روش هایی برای اتصال و جذب فیزیکی در قالب ترکیبی از چندین روش توضیح داده شود که این مسئله خود زمینه ساز تحقیقات و ابتکارات بسیار زیادی می باشد. کاربردهای سنتی تثبیت سازی آنزیم ها به شکل موثر و انتخابی واکنش های کاتالیتیکی را به انجام می رسانند، بدین ترتیب که قادر به سنتز یک ترکیب از ترکیب دیگر می باشند. کاربردهای صنعتی آنزیم های تثبیت شده آسان می باشند، این آنزیم ها برای چندین مرحله استفاده در طول فرایندهای تولیدی و انجام واکنش های بیوکاتالیستی شیمیایی مورد استفاده قرار می گیرند. در میان تولید ترکیبات مطلوب، آنزیمهای تثبیت شده قادر به شکست و تجزیه ترکیبات ناخواسته ایجاد شده در طی فرایند تولید در تخلیص و بازفراوری می باشند.

کاربرد تثبیت در پزشکی

در علوم پزشکی و طب بالینی نیز تثبیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفته است. آنزیم تثبیت شده دارای کاربردهای زیادی در زمینه ارسال و انتقال دارو به سیستم های مختلف زیستی و شناسایی تومورها می باشد. همچنین شبیه به حسگری برای کنترل وزن و دیابت نیز استفاده می شوند. در طراحی و ساخت حسگرهای تجزیه شونده، به میزان زیادی از تثبیت آنزیم استفاده می کنند. آنزیم های تثبیت شده به عنوان بیوکاتالیست هایی در جهت تغییر ترکیبات استفاده می شوند که سابقا از طریق الکتروشیمیایی این فرایندها انجام می گردید تا به کاهش پتانسیل ردوکس انجامیده و نهایتا جریان قابل شناسایی را ایجاد کند. بیشترین و عمومی ترین حسگر زیستی شامل انواعی می گردد که برای تعیین گلوکز بیماران دیابتی مورد استفاده قرار می گیرد.

مبانی بنیادی تثبیت آنزیم و پروتئین

روش های مختلفی برای تثبیت آنزیم بکار گرفته می شود که از جمله این روش ها؛ اتصال متقاطع، جذب فیزیکی، اتصال یونی، اتصال فلزی، اتصال کووالانسی و روش های جذبی نظیر جذب ژلی، جذب فیبری، برای آنزیم های نامحلول و در عین حال غشاهای اولترا فیلتری برای آنزیمهای محلول می باشند. با این حال سطحی که انتخاب می گردد موجب پایداری عملکرد آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID

تثبیت شده در سیستم می باشد. اینچنین تصور می شود که حامل عمومی برای کلیه آنزیم ها وجود نداشته و تنها بر اساس ویژگی هایی که برای تثبیت سازی در نظر گرفته می شود حامل مورد نظر انتخاب می گردد (Brena et al., 2013).

انتخاب ماتریس مناسب

ویژگی های ماتریس بیشترین اهمیت را در تعیین عملکرد سیستم تثبیت آنزیم دارند. ویژگی های ایده آل ماتریس عبارتند از؛ مقاومت فیزیکی نسبت به فشرده سازی، آبدوستی، بی اثر بودن نسبت به آنزیم، زیست سازگاری، مقاومت نسبت به حمله های میکروبی، در دسترس و ارزان بودن.

ماتریس ها بر اساس ساختار شیمیایی شان به دو دسته آلی و غیرآلی تقسیم می شوند ماتریس های عالی را نیز می توان به دو دسته طبیعی و پلیمرهای صنعتی تقسیم کرد (Cabral & Kennedy, 1991). ویژگی های فیزیکی ماتریس ها از جمله قطر ذرات ، قدرت مکانیکی و رفتار فشرده سازی، در عملکرد سیستم های تثبیت و تعیین شرایط فنی راکتور (برای مثال تانک همزن دار، خوراکدهی، بستر ثابت) نقش مهمی دارند .مخصوصاً، پارامترهای منافذ و اندازه ذرات، سطح کل را تعیین می کند و بنابراین تاثیر حیاتی در ظرفیت اتصال به آنزیم ها دارند. ماتریس های نانو ذره محدودیت های کمتری در نفوذ، اما ظرفیت بارگذاری کمتری نیز دارند. بنابراین، ماتریس های متخلخل معمولاً ترجیح داده می شوند چراکه سطح (مساحت) بالا امکان بارگذاری آنزیم بیشتر و حفظ آنزیم تثبیت شده از محیط زیست را فراهم می کند. ماتریس های متخلخل به منظور بهینه سازی ظرفیت و ویژگی های جریان، باید توزیع منافذ کنترل شده ای داشته باشند. با وجود مزایای بسیارحامل های غیر آلی به عنوان مثال، پایداری بالا در برابر تخریب فیزیکی، شیمیایی و میکروبی، بسیاری از کاربردهای صنعتی با ماتریس های آلی انجام می شوند. ویژگی هیدروفیلی یکی از مهمترین عوامل در تعیین میزان فعالیت آنزیم های تثبیت شده است (Gemeiner, 1992). اجزای اصلی سیستم تثبیت آنزیم شامل آنزیم، ماتریس و حالت اتصال آنزیم به ماتریس است. عبارت های فاز جامد، حامل و ماتریس هم معنی هستند.

آنزیم ها می توانند از طریق جذب فیزیکی برگشت پذیر و یا اتصال های کووالانسی پایدار به ماتریس متصل شوند. یکی از طبقه بندی های تثبیت آنزیم در دو دسته: روش های برگشت پذیر و برگشت ناپذیر است (Mattiasson, 1991). قدرت اتصال معمولا رابطه معکوس با برگشت پذیر بودن دارد. این دو هدف متناقض پایداری و برگشت پذیری به سختی به طور همزمان

www.SID.ir

Archive of SID

جواب می دهند. روش های متنوعی برای تثبیت سازی آنزیم ها وجود دارد. بدون در نظر گرفتن روش تثبیت سازی، موادی که برای تثبیت سازی آنزیم مورد استفاده قرار می گیرند می بایست در حلال مورد استفاده نامحلول باشند که غالبا این حلال آب می باشد.

روش های تثبیت غیربرگشت پذیر آنزیم

مفهوم تثبیت غیربرگشت پذیر به این معنی است که بیوکاتالیست به ماتریس متصل می شود و در صورت جداسازی از ماتریس فعالیت بیولوژیکی خود را از دست می دهد. رایج ترین روش های تثبیت آنزیم غیر برگشت پذیر اتصال کووالانسی، به دام انداختن[۱] یا کپسوله کردن[۲] و اتصال عرضی[۳] است.

روش های تثبیت برگشت پذیر

در این روش ها به دلیل نوع پیوند آنزیم و ماتریس، آنزیم تثبیت شده به روش برگشت پذیر می تواند از ماتریس تحت شرایط ملایم جدا شود. روش های تثبیت برگشت پدیر شامل جذب غیر اختصاصی یا جذب سطحی، پیوند یونی، جذب هیدروفوبی، پیوندهای وابسته، کلیشن[۴] یا اتصالات فلزی وپیوندهای دی سولفیدی می باشند.روش های برگشت پذیر تثبیت آنزیم به دلایل اقتصادی بسیار مورد توجه است، چراکه فعالیت آنزیم که کاهش یافته می تواند توسط آنزیم جدید جایگزین شود. اغلب، هزینه ماتریس از فاکتورهای مهم در هزینه های کلی تثبیت کاتالیزور است.

ویژگی آنزیم های تثبیت شده

یکی از مهمترین خصوصیات یک آنزیم در یک فرآیند صنعتی این است که پایداری آن با نیمه ی عمر آن، اندازه گیری می شود. نیمه ی عمر به صورت مدت زمان لازم برای از دست رفتن 50٪ فعالیت آنزیم تعریف می شود. غالباً افزایش دما که در برخی واکنش ها برای افزایش میزان تولید و جلوگیری از آلودگی لازم است، سبب غیرفعال شدن سریع آنزیمی می گردد.

---

[۱] Entrapment
[2].Encapsulation
[۳]Cross-linking
[۴] Chelation

www.SID.ir

Archive of SID

هرچند جزئیات مکانیسم غیر فعال شدن آنزیمی مبهم باقی می ماند، وجوه مشخصی واضح می گردد. فعالسازی گرمایی، شامل تغییرات انطباقی چشمگیری است. تثبیت آنزیم ها به ویژه با اتصال چند نقطه ای به طور برجسته ای مقاومت گرمایی آنها را افزایش می دهد. از آنجایی که تا نخوردگی یک وجه عمومی از غیر فعال سازی آنزیمی است (بواسطه عوامل دناتوره کننده و pH)، تثبیت نیز مقاومت آنزیم ها را در مقابل این عوامل افزایش می دهد (Tischer & Wedekind, 1999).

کیفیت آنزیم های تثبیت شده و آنزیم های آزاد متفاوت است به خاطر اینکه اولی یک سیستم نامتجانس را بیان می کند. کیفیت های فیزیکوشیمیایی فاز جدید (نظیر آنزیم در یک ژل یا بر یک تعویض گر یونی) از آنهایی که در توده ی محلول وجود دارند، متفاوت هستند .تاثیر این تغییر در محیط ذره بینی برای توضیح تغییرات درpH بهینه غالباً در آنزیم های تثبیت شده، پیشنهاد شده است. یک نگهدارنده با بار منفی، به علت بر هم کنش یک آنزیم الکتروستاتیک، غلظتی بالاتر از یونهای هیدروژن نسبت به توده ی محلول دارد. بنابراین pH بهینه آنزیم یک جابجایی به سمت مقادیر پایین تر را ظاهر خواهد ساخت. اصلاح شیمیایی زنجیره های باقیمانده ی آمینواسیدی سمت آنزیم به علت اتصال کووالانسی بر بهینه pH تاثیر خواهد داشت. برخی از مسائل همراه با آنزیم های تثبیت شده با محدودیت های نفوذپذیری و موانع فضایی، همراه هستند. فعالیت آنزیم های تثبیت شده ممکن است کاهش یابد، به این دلیل که محدودیت های نفوذی خارجی، از انتقال سوبسترا از توده ی محلول به آنزیم های تثبیت شده از میان لایه ی مرزی آب، ناشی می شود. محدودیت های داخلی به خاطر این است که سوبستر اها بایستی از میان یک نگهدارنده ی متخلخل عبور نمایند. این مشکلات با کاهش اندازه ی ذرات، افزایش غلظت سوبسترا، افزایش تخلخل ماتریس یا کاهش عمق لایه ی مرزی می تواند کاهش یابد (Brena et al, 2013).

مزایا و کاربردهای آنزیم های تثبیت شونده

آنزیم های تثبیت شده برای مقاصد تجاری بسیار مورد کاربرد هستند که از جمله این کاربردها می توان به موارد زیر اشاره کرد:

تسهیلات: مقادیر بسیار کمی از پروتئین نامحلول تولید را در واکنش های انجام فرایندهای بالادستی و پایین دستی، بسیار ساده تر می نماید. مجموعه ای از واکنش ها به شکل معمول حاوی حلال و واکنش هایی می باشد که منجر به تولید محصول می شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

صرفه اقتصادی: آنزیم های تثبیت شده را می توان به راحتی از سیستم های بیوراکتور حذف نمود که این مسئله خود در چرخه کاتالیستی زیستی فرایندها، بسیار مقرون به صرفه می باشد.

پایداری: آنزیم های تثبیت شده به شکل معمول دارای پایداری بسیار بیشتری در برابر دما و فرایندهای اجرایی در طول فرایند تولیدی نسبت به انواع محلول آنزیم ها می باشند.

رویکردها و افق های آینده

به عنوان یک نیاز در فضای بیوتکنولوژی سبز[1] می بایست فرایندهای صنعتی در راستای افزایش بازده از طریق چنین روش هایی نظیر تثبیت آنزیمی پیش روند. در سالهای اخیر استراتژی های بیشتری برای تثبیت آنزیمی و گسترش این روش ها مطالعه شده است که تقریبا همگی در جهت افزایش فعالیت و پایداری آنزیم های مورد استفاده در صنعت بوده اند. بدون شک استراتژی های آینده نیز در راستای پایداری تثبیت آنزیم ها در محلول های ارگانی، پایداری نسبت به آلودگیها، پایداری در مواجه شدن با تغییرات pH و تحمل محدوده دمایی بالاتر پیش خواهد رفت (نیلچی زاده رهبر،۱۳۹۰)

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش روز افزون تحقیقات در حوزه تثبیت گونه های زیستی و طراحی حسگرهای زیستی در زمینه های پزشکی و صنعتی منجر به بررسی راهکارهای جدید و آسان برای تثبیت آنزیم ها و پروتئین ها در بسترهای مختلف شده است. از زمانی که کلارک و لیون اولین حسگر در سال ۱۹۶۲ را ارائه نمودند تاکنون پیشرفت فوق العاده ای در زمینه حسگرهای زیستی آنزیمی حاصل شده است. استفاده از یک تکنیک تثبیت مناسب برای ساخت زیست حسگر کارا ضروری می باشد. جذب فیزیکی ساده ترین روش تثبیت است که در آن محلول آنزیمی طی مدت زمان مشخصی با سطح در ارتباط است و سپس بیومولکهای جذب نشده از سطح شسته می شوند. با این حال این روش به دلیل جدا شدن بیومولکول از سطح به دلیل ضعیف بودن پیوند و ویژگی قابل برگشت بودن پیوند، دارای نقص می باشد. همچنین آنزیم می تواند با استفاده از روش به دام اندازی در ماتریکس سه بعدی مانند الکتروپلیمرها، فوتوپلیمرها یا سلیکاژل تثبیت شود. این روش ساده است و هیچ واکنش شیمیایی میان مونومر و آنزیم که فعالیت آنزیم را تحت تاثیر قرار دهد اتفاق نمی افتد. با این حال آنزیم می تواند از ماتریکس متخلخل منتشر شود. اتصال متقاطع یا اتصال عرضی نیز یکی از تکنیکهای تثبیت متداول است، اما این روش شامل استفاده از عامل چند عملکردی

[1] Green Biotechnology

www.SID.ir

Archive of SID

مانندگلوتارآلدهید است که سمی بوده و باعث از دست رفتن فعالیت آنزیم می شود. اتصال کووالانسی آنزیم به سطح روش متداول دیگری از تثبیت است که در آن ابتدا فعال سازی اولیه سطح با استفاده از عامل جفت کننده و سپس پیوند آنزیم به این سطح فعال شده انجام می شود. جفت کردن با گلوتارآلدهید و کربودی ایمید از متداول ترین تکنیکهای مورد استفاده برای اتصال کووالانسی آنزیم به ماتریکس های مختلف است. تکنیک لایه های خود مجتمع یا لایه های خود تشکیل شونده در تثبیت دارای مزایایی برای پیوند کووالانسی و جهت گیری آنزیم روی سطح است. آنزیم ها همچنین می توانند از طریق میل ترکیبی بین یک گروه عملکردی در سطح (مانند آویدین، لکتین، چلاته کننده های فلزی) و گروه ویژه (مانند بیوتین، کربوهیدرات، هیستیدین) که به طور طبیعی حضور دارند یا بطور ژنتیکی در یک موقعیت ویژه در توالی آنزیم مهندسی می شوند بطوری که فعالیت یا تاخوردی پروتئین را تحت تاثیر قرار ندهند. میانکنش های میل ترکیبی اجازه میدهد ساختارهای بسیار منظم و جهت یافته ایجاد شود. چندین روش تثبیت میتواند برای توسعه زیست حسگرهای پروتئین

آنزیمی با هم ترکیب شود. برای مثال آنزیم یا پروتئین می تواند روی دانه ها توسط روش جذب، کووالانسی یا میل ترکیبی پیش تثبیت شده و سپس در پلیمرهای متخلخل به دام افتد (Sassolas et al., 2012). سادگی تثبیت، هزینه، زمان فرایند و تکرارپذیری تثبیت از مواردی هستند که باید مورد توجه قرار گیرند. انتخاب مناسبترین روش تثبیت منجر به طراحی حساس ترین یا پایدارترین حسگر می شود که بستگی به طبیعت آنزیم، نوع مبدل و چگونگی تشخیص دارد. به هر حال هر روش تثبیتی که انتخاب شود آنزیم پس از تثبیت باید فعالیت زیستی خود را حفظ کرده و در طول فرایند تشخیص نباید از سطح حسگر رها گردد. حساسیت (حد تشخیص) و انتخاب گری زیست حسگرها بطور مستقیم مربوط به دسترسی و فعالیت آنزیم ها و پروتئین های تثبیت شده دارد. اتصال کووالانسی پایداری بهتری را موجب می شود. دسترسی بهبودیافته می تواند از طریق یک لینکر که از ممانعت فضایی ناخواسته جلوگیری می کند حاصل شود. آنزیم ها یا پروتئین هایی که به صورت تصادفی جهت می یابند توانایی اتصال به سوبسترا را از دست می دهند. تثبیت آنزیم کنترل شده می تواند با استفاده از تغییرات شیمیایی آنزیم و با تگ هایی مانند هیستیدین یا گروه های تیول قبل از تثبیت انجام شود. تثبیت بهینه شامل جهت دهی منظم و مناسب و کمترین تغییرات در سطح آنزیم است. یک تثبیت جهت دار و منظم با نتایج جذب یا تثبیت تصادفی مقایسه شد و در حالت اول فعالیت بالاتری به دست آمد.

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر روش تثبیت یک آنزیم یا پروتئین می تواند در عملکرد زیست حسگر مورد مقایسه قرار گیرد. نتایج زیست حسگر در ارتباط با لایه حسگر حاصل از آنزیم تثبیت شده و مبدل مرتبط با یک روش تشخیص، ارائه شده است. عملکرد زیست حسگر بطور آشکار تحت تاثیر نه تنها آنزیم و روش تثبیت بلکه توسط مبدل و چگونگی تشخیص است. به عنوان مثال تشخیص گلوکز با استفاده از گلوکز اکسیداز به عنوان آنزیم تثبیت شده و روش آمپرومتری به عنوان روش تشخیص محدوده آنالیزی با توجه به روش های تثبیت مختلف از جمله به دام اندازی، جذب سطحی، اتصال متقاطع، کووالانسی یا میل ترکیبی متفاوت است. بنابراین روش تثبیت در عملکرد زیست حسگر موثر است. از سوی دیگر روش تشخیص نیز حائز اهمیت است. آنزیم یکسان (گلوکز اکسیداز) تثبیت شده با روش تثبیتی یکسان (به دام افتاده در سلیکا ژل) چندین محدوده خطی متفاوت را برای تشخیص گلوکز با توجه به روش تشخیص نشان میدهد. قبل از انتخاب روش تثبیت باید توجه ویژه ای به ویژگی های ساختاری پروتئین شود. بر اساس آنالیز باقیمانده های آمینواسیدی سطح پروتئین، می توان ماتریکس مناسب را برای تثبیت موفقیت آمیز پروتئین انتخاب نمود. روش انتخاب بستر تثبیت بر اساس آنالیز ساختار سطح پروتئین بطور موفقیت آمیز به عنوان مثال در مورد تثبیت جذبی جهت دار آنزیم استراز بر روی بستر دارای گروه های هیدروفیل اثبات شده است (Ren & Yu, 2011). از نظر علمی دخالت ترکیبات نمونه مشکل مهمی در عملکرد به حساب می آیند. اگر چه آنزیمها بسیار اختصاصی و انتخابی عمل می کنند تشخیص الکتروشیمیایی می تواند شدیدا تحت تاثیر گونه های الکترو فعال موجود در نمونه های زیستی باشد. روش های مختلفی برای بهبود عملکرد انتخابی زیست حسگرهای بر پایه آنزیم گزارش شده است. انتخاب روش تثبیت می تواند اثر گونه های الکتروفعال را به حداقل برساند. برای مثال فیلم های الکتروپلیمریزه شده نه تنها بعنوان بسترهای تثبیت بلکه به عنوان موانعی برای حذف عوامل مداخله گر به کار می روند.

نانومواد شامل نانوذرات، نانو سیم ها و نانولوله ها به دلیل ویژگی های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردشان اخیرا توجه زیادی را در زمینه طراحی زیست حسگرهای آنزیمی الکتروشیمیایی و نوری (برای مثال بر اساس الکتروکمی لومینسانس) به خود جلب کرده اند. نانومواد تهیه شده از فلزات، کربن یا گونه های پلیمری ، امکان توسعه زیست حسگرهایی را فراهم می کنند که دارای حساسیت و پایداری بالاتری هستند. ویژگی های رسانایی بالای آنها برای افزایش انتقال الکترون بین مرکز ردوکس پروتئین ها و سطح الکترود گزارش شده است. این ترکیبات همچنین برای افزایش سطح به منظور تثبیت آنزیم ها مورد استفاده قرار می گیرند. طراحی های مختلف از زیست حسگرهای آنزیمی بر پایه نانومواد گزارش شده است. پروتئین ها و آنزیم ها می توانند بر روی نانو مواد عامل دار شده با روش های جذب سطحی یا پیوند کووالانسی تثبیت شوند. در سایر موارد، آنزیم ها و نانومواد می توانند به طور همزمان در یک پلیمر یا الکترود خمیر کربن به دام افتند (wang et al, 2009).

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

نیلچی زاده رهبر، ا. (۱۳۹۰). کاربرد تثبیت آنزیم در زیست فناوری، دوماهنامه زیست فن، سال سوم، شماره ۹-۱۰.

Bickerstaff, G. F. (1992). Protein Immobilization. Fundamentals and Applications: (Bioprocess Technology Series/14) Edited by Richard F. Taylor. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44: 71.

Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 1051, 15-31.

Cao, l. (2006). *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design, Chapter 1. Introduction: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects*. Wiley Online Library.

D'Orazio, p. (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clin.Chim. Acta*, 334, 41-69.

Katchalski-Katzir, E. (1993). Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures. *Trend Biotechnol*, 471-478

Mattiasson, B., & Kaul, R. (1991). *Determination of coupling yields and handling of labile proteins in immobilization technology, In: Protein immobilization.Fundamentals and Applications,* New York, Marcel Dekker, 161-179.

Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220.

Ren G, Yu H. (2011). Oriented adsorptive immobilization of esterase BioH based on protein structure analysis. *Biochem Eng J*, 53, 286-91.

Sassolas, A., Blum, L. J., Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30, 489-511.

Talbert, J. N., & Goddard, J. M. (2012).Enzymes on material surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93, 8–19.

Tischer, W & Wedekind, F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Biocatalysis - From Discovery to Application*, 200, 95-126.

Wang P, Liu M, Kan J. (2009). Amperometric biosensor based on polyaniline. *Sens Actuators B*, 140, 577-84.

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

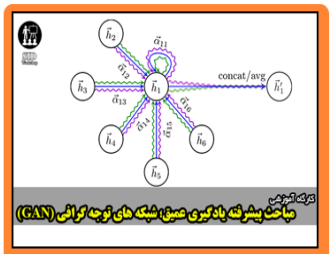
سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین مکالمه روزمره انگلیسی

کارگاه آنلاین آموزش استفاده از وب آو ساینس



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی

(Graph Attention Networks)