دانشکده دامپزشکی

گروه علوم پایه

پایان نامه برای دریافت درجه دکترای حرفه ای

در رشته ی دامپزشکی

عنوان فارسی

تثبیت آنزیم رودنیز کبد گاوی بر روی بستر MnO_2 نانوحفره جهت اندازه گیری سیانید

عنوان انگلیسی

Bovine liver rhodanese immobilization on nanoparous MnO_2 for detection of Cyanide

استاد راهنمای اول

دکتر حسین طایفی نصرآبادی

استاد راهنمای دوم

دکتر افضل کریمی

پژوهشگر

افشین رحمان پور

شهریور ۹۲

فهرست مطالب **صفحه**

چکیده.....

فصل اول .....

مقدمه.....۱

پیشینه آنزیم و آنزیم شناسی.....۲

خصوصیات کلی آنزیم ها.....۴

معرفی آنزیم رودنیز.....۶

سینتیک آنزیمی.....۸

تقسیم بندی واکنش های آنزیمی.....۹

تثبیت آنزیم ها.....۱۱

هدف از تثبیت آنزیم ها.....۱۱

روش های تثبیت آنزیم ها.....۱۲

خصوصیات نانوحفره MnO_2.....۱۸

فصل دوم.....۲۱

مواد و روش ها.....۲۱

فصل سوم.....۲۶

نتایج.....۲۶

فصل چهارم.....۳۶

بحث.....۳۶

فصل پنجم.....۴۲

نتیجه گیری و پیشنهادات.....۴۳

منابع.....۴۵

فهرست شکل ها **صفحه**

شکل ۱۰-۱ ..... ۱۸

شکل ۶-۲ ..... ۲۳

فهرست نمودارها **صفحه**

نمودار ۳-۱ ..... ۲۶

نمودار ۳-۲ ..... ۲۸

نمودار ۳-۳ ..... ۲۹

نمودار ۳-۴ ..... ۳۰

نمودار ۳-۵ ..... ۳۱

نمودار ۳-۶ ..... ۳۲

نمودار۳-۷ ..... ۳۳

نمودار ۳-۸ ..... ۳۴

نمودار ۳-۹ ..... ۳۵

فهرست جدول ها **صفحه**

جدول ۴-۱ ..... ۳۸

جدول ۴-۲ ..... ۳۹

جدول ۴-۳ ..... ۴۱

موضوع پایان نامه: تثبیت آنزیم رودنیز کبد گاوی بر روی بستر MnO_2 نانوحفره جهت اندازه گیری سیانید

استاد راهنمای اول: دکتر حسین طایفی نصرآبادی

استاد راهنمای دوم: دکتر افضل کریمی

پژوهشگر: افشین رحمان پور

چکیده:ورود مواد سیانوژنیک در چرخه غذایی یکی از مباحث مهم در امنیت غدایی می باشد این مسئله ضرورت استفاده از مواد مختلف به عنوان بیوسنسور را آشکار می سازد.آنزیم رودنیز یکی از آنزیم های مهم در سم زدایی یون سیانید محسوب می شود.برای تولید بیوسنسور سیانیدابتدا باید آنزیم رودنیز تثبیت گردد.به طور کلی تثبیت آنزیم ها به روش های مختلفی انجام می گیرد که یکی از این روش ها تثبیت به روش جذب سطحی است.در این تحقیق آنزیم رودنیز کبد گاوی بر روی بستر نانو حفره MnO_2 به روش جذب سطحی تثبیت و خصوصیات آن با آنزیم در حالت آزاد مقایسه شد.نتایج این مطالعه نشان می دهد که pH بهینه جهت فعالیت آنزیم رودنیز هم در حالت آزادو هم در حالت تثبیت شده برابر با۸ می باشد، همچنین دمای بهینه فعالیت آنزیم رودنیز در حالت آزادوتثبیت شده دمای ۴۰ درجه سانتیگراد بدست آمد. بررسی پارامتر های سینتیکی آنزیم رودنیز در حالت آزاد نشان داد که Km و Vmax آنزیم برای سوبسترای سیانید پتاسیم برابربا ۳/۲۵ و ۶/۱۱ و برای سوبسترای تیوسولفات ۵/۷۹ و ۷/۷۵ می باشد. بررسی پایداری آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد نشان داد که پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون میزان فعالیت آن ۶۹ درصد فعالیت کنترل می باشد. بررسی میزان تکرار پذیری قابل استفاده بودن آنزیم تثبیت شده نشان داد که آنزیم تثبیت شده بر روی نانو حفره MnO_2 پس از ۴ بار شستشو دارای کاهش فعالیتی در حدود ۹۰ درصد کنترل می باشد.

فصل اول

مقدمه وکلیات

۱-۱ مقدمه

آنزیم رودنیز (تیوسولفات: سیانید سولفو ترانسفراز) پروتینی با عملکرد چند گانه است که در سم زدایی یون سیانید نقش دارد. بسیاری از گیاهان و محصولات گیاهی که توسط انسان، دام ، طیور و آبزیان به عنوان ماده غذایی مورد استفاده قرار می گیرند دارای ترکیباتی مانند آمیگدالین و لینا مارین می باشند که از هیدرولیز این مواد در دستگاه گوارش یون سیانید ایجاد می گردد. به این ترکیبات گلیکوزید های سیانو ژنیک میگویند. سیانید یک ترکیب سمی قوی است که ازانتقال اکسیژن در تنفس داخل سلولی هنگام تولید انرژی در داخل میتو کندری اختلال ایجاد میکند. مهمترین عامل در سم زدایی یون سیانید در بدن آنزیم رودنیز می باشد. در بسیاری از حیوانات منبع اصلی این آنزیم کبد می باشد در حالیکه تحقیقات جدید وجود این آنزیم را در سایر نقاط بدن نیز نشان می دهد. آنزیم رودنیز یک پروتئین با یک زنجیره پلی پپتیدی با وزن ملکولی در محدوده ۳۰-۴۰ کیلو دالتون می باشد. این آنزیم دارای عملکرد های متفاوتی می باشد. یکی از عملکرد های آنزیم رودنیز سم زدایی سیانید است که از طریق انتقال یک گروه سولفور به یون سیانید و تبدیل آن به یون تیو سیانات که یک ماده با سمیت کمتری است این عمل را انجام می دهد. علاوه بر سم زدایی مشخص شده است که این آنزیم میتواند در تولید سیستئین ، انتقال گروه سولفور در سنتز پروتئین ، به عنوان جزئی از مرکز آهن- سولفور زنجیره تنفسی نقش ایفا کند. با توجه به عملکرد وسیع ابن آنزیم و از همه مهمتر نقش در حذف یون سیانید، امروزه از این آنزیم می توان در تهیه بیوسنسور جهت تشخیص مقادیر کم یون سیانید در محلول ها ، مواد غذایی و آب و حذف آلاینده های بیو لوژیکی استفاده کرد. جهت استفاده از این آنزیم در بیو سنسور ابتدا باید این آنزیم تثبیت شود. آنزیم تثبیت شده آنزیمی است که در پایه جامد قرار داده شده است در حالیکه فعالیت کاتالیزوری آن باقی مانده و به طور پیوسته و مکرر میتوان از آن استفاده نمود.

به طور کلی تثبیت آنزیم ها به ۵ روش مختلف انجام میگردد که شامل:

۱- جذب سطحی

۲- ریزپوشینه سازی

۳- محبوس سازی

۴- پیوند عرضی

۵- پیوند کووالانسی

۲-۱ پیشینه آنزیم و آنزیم شناسی

آنزیمولوژی دانش مطالعه آنزیم ها است و بیشتر تاریخ بیوشیمی تاریخ تحقیق آنزیم ها است. کشف آنزیم ها در واقع به پژوهش های وسیع پاپن و پرسوز وابسته بود. آنان در سال ۱۸۳۳ موفق شدند از جو سبز شده ترکیبی را به نام مالت کشف کنند که نشاسته را به قند مبدل می ساخت و این ترکیب را دیاستاز نامیدند که امروزه به نام آنزیم آمیلاز معروف است. چند سال بعد شوان از شیره معده فردی که رژیم غذایی او پروتئین بود ، ماده ای جدا کردند و آن را پپسین نامیدند. این ترکیبات را تحت نام کلی مخمر می نامیدند. لیبیگ[1] درآن موقع اظهار داشت که این مخمرها می توانند مواد غیر زنده ای باشند که از سلول های زنده به دست می آیند در حالیکه پاستور و دیگران هنوز بر این باور بودند که مخمرها بایستی حاوی مواد زنده باشند. در واقع در دهه ۱۸۵۰ ، لوئی پاستور نتیجه گرفت که تخمیر قند به الکل توسط مخمر، به وسیله (خمیر مایه) کاتالیز میگردد. وی معتقد بود این خمیر های مایه غیر قابل جدا سازی از ساختمان سلول های مخمری زنده می باشند، تصویری که ویتالیسم نامیده شد وبرای سال های زیادی رواج داشت. با وجود این اختلاف

[1]- Liebig

نظرها ، کوهن[1] در سال ۱۸۷۸ از کلمه یونانی آنزیم (به معنای مخمر) استفاده کرد و نام آنزیم را پیشنهاد نمود[۱].

در واقع ریشه کلمه آنزیم از لغات یونانی en به معنای در و zyme به معنای مخمر می باشد که در سال ۱۸۷۸ و به منظور تاکید بر وجود عاملی در مخمر، غیر از خود خود مخمر ، که فرایند تخمیر را انجام می داد اقتباس گردید.

بوخنرز[2] در سال ۱۸۹۷ نشان داد که وقتی عصاره یک سلول مخمر (بدون حضور سلول زنده) به قند اضافه شود ، تخمیر قند صورت می گیرد. وبدین ترتیب ثابت نمود تخمیر توسط ملکول هایی تسریع میگردد که بعد از جدا شدن از سلول ها ، همچنان فعالیت خود را ادامه میدهند. سامنر[3] در سال ۱۹۲۶ آنزیم اوره آز را از عصاره لوبیا خالص کرد و آن را کریستاله نمود[۲]. سامنر دریافت که کریستال های اوره آز تماما از پروتئین تشکیل شده و ساختمان تمامی آنزیم ها را پروتئینی در نظر گرفت. در دهه ۱۹۳۰ بعد از کریستاله نمودن پپسین، تریپسین و سایر آنزیم ها ی گوارشی و مشخص شدن جنس پروتئینی آن ها توسط جان نور تروپ و موزس کوینز[4] بود که اسباط سامنر به طور وسعی پذیرفته شد. در طی این فاصله هالدان مطرح نمود که واکنش های متقابل ضعیف بین آنزیم و سوبسترای آن در تغییر سوبسترا و کاتالیز یک واکنش نقش داشته باشد. لازم به ذکر است سوبسترا به ماده ای گفته می شود که عمل کاتالیزی آنزیم بر روی آن انجام میگیرد[۱,۳].

---

[1] -Kuhne

[2] -Buchners

[3] -Sumner

[4] -jhone nortrop& mosses quinz

۳-۱ خصوصیات کلی آنزیم ها

به طور کلی آنزیم ها تابع همان قوانین حاکم بر رفتار سایر مواد هستند، به علاوه آنزیم ها در مقایسه با کاتالیزور های شیمیای دارای ویژگی های اختصاصی می باشند[۳].

۱-۳-۱سرعت واکنش های آنزیمی بیشتر است

سرعت واکنش هایی که توسط آنزیم ها کاتالیز می شوند عموما $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۱۲}$ مرتبه بیشتر از واکنش های معادل فاقد کاتالیزور است و حداقل چندین برابر بیش از واکنش های مشابهی است که توسط کاتالیزورهای شیمیایی کاتالیز می شوند[۴].

۲-۳-۱شرایط واکنش های آنزیمی ملایم تر است

واکنش های آنزیمی معمولا در شرایط نسبتا ملایم مانند دمای نه چندان بالا، فشار اتمسفری و نزدیک به خنثی انجام می شوند ، در حالیکه کاتالیزورهای قوی شیمیایی بر خلاف آنزیم ها اغلب به دما و فشار بالا و اسیدی یا باز قوی نیاز دارند[۴].

۳-۳-۱آنزیم ها یک واکنش خاص یا نوع خاصی از واکنش را کاتالیز می کنند.

بارزترین ویژگی یک آنزیم آن است که میتواند یک واکنش اختصاصی را کاتالیز کند و اساساً در واکنش دیگری نقش ندارد.بنا بر این سرعت و میزان انجام فرایند های متابولیک با تغییر کارایی کاتالیتیک آنزیم های خاص تنظیم می شود[۴].

۴-۳-۱ آنزیم ها درمورد نوع واکنش کاتالیز شده اختصاصی می باشند

آنزیم های لیتیک روی گروه های شیمیایی خاصی عمل می کنند. به عنوان مثال گلیکوزیداز بر روی گلیکوزیدها عمل می کنند[۴].

۵-۳-۱آنزیم ها نسبت به واکنش هایی که کاتالیز می کنند ویژگی بیشتری دارند

آنزیم ها در مقایسه در مقایسه با کاتالیزور های شیمیایی ، ویژگی فوق العاده بالاتری نسبت به ماهیت سوبسترا و فرآورده های واکنش نشان می دهند. این بدان معناست که واکنش های آنزیمی به ندرت دارای فرآوررده های جانبی نا خواسته هستند[۴].

۶-۳-۱برای شناخت ساختمان،عملکرد،مکانیسم واکنش و تنظیم یک آنزیم باید آن را خالص کرد

برای بدست آوردن اطلاعات موثق در مورد کینتیک، کوفاکتورها، جایگاه های فعال ، ساختمان و مکانیسم عمل آنزیم ها نیز به وجود آنزیم های خالص نیاز است[۴].

۷-۳-۱تخلیص آنزیم فعالیت اختصاصی آن را افزایش می دهد

هدف از روند تخلیص یک آنزیم جدا کردن یک آنزیم اختصاصی از عصاره خام سلول است که حاوی بسیاری از مواد دیگر است[۴].

۸-۳-۱آنزیم ها قابلیت تنظیم دارند

فعالیت کاتالیکی بسیاری از آنزیم ها نسبت به تغییر غلظت موادی بجز سوبسترا، حساس است. مکانسیم های این نوع فرآیند تنظیمی شامل کنترل آلوستریکی ، تغییرات کووالان در ساختار آنزیم ها و تغییر در میزان سنتز آن ها می باشد[۴].

۱-۴ معرفی آنزیم رودنیز

۱-۴-۱ پیشینه آنزیم

آنزیم رودنیز برای نخستین بار در سال ۱۹۳۳ توسط دانشمندی بنام لانگ[1] طی مطالعاتی که وی بر روی کبد انجام داده بود به اثبات رسید. لانگ کاتالیزوری را که رودنیز نام نهاده بود به عنوان کاتالیزور بیولوژیکی که می تواند یون سیانید سمی رابه تیوسیانید با سمیت کمتر تبدل نمایدمعرفی کرد. در سال ۱۹۴۸ دو دانشمند بنام های هیمویچ[2] و ساندرس[3] این کاتالیزور را به دلیل نوع فعالیتی که انجام می داد سولفور ترانسفراز نامیدند.در ضمن لازم به ذکر است اولین فردی که آنزیم رودنیز کبد گاو را جداسازی نمود دانشمندی به نام سوربو[4] بود [۵,۱۸].

۱-۴-۲ ساختمان آنزیم

آنزیمها ماهیتی پروتئینی دارند و ساختار بعضی ساده یعنی از یک زنجیره پلی پپتیدی ساخته شده‌اند و بعضی الیگومر هستند. ساختار بعضی از آنزیمها منحصرا از واحدهای اسید آمینه تشکیل شده است. آنزیم ها همانند پروتئین های دیگر ، دارای وزن های ملکولی بین ۱۲۰۰۰ تا بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ دالتون می باشند . آنزیم رودنیز از یک زنجیره پلی پپتیدی منفرد با وزن ملکولی ۳۲۰۰۰ تا ۳۸۰۰۰ دالتون تشکیل یافته اند. این آنزیم دو ساختار دامنه ای دارد که هر یک از این دامنه ها ۴ ساختار بتای موازی متصل،همراه با یک مارپیچ نا هم سو به صفحه ی بتا دارند. دو شکل دفسفورودنیز و فسفو رودنیز از این آنزیم ثبت شده اند[۵,۳۰].

---

[1] -lang

[2] -himwich

[3] -sanders

[4] -sorbo

۱-۴-۳ ترکیب آمینواسیدی آنزیم

بر اساس مطالعات صورت گرفته بر روی آنزیم حاصل از کبد طیور مشخص گردید که ساختار اولیه آنزیم دارای ۲۸۹ آمینو اسید می باشد که ۲۱۲ آمینو اسید آن با نتایج حاصل از آنزیم کبد گاو یکسان می باشد. بین ۵ تا ۱۱ تریپتوفان به ازای ۲۶ آلانین در رودنیز گاو گزارش شده است .آنزیم دارای ۱۰ تیروزین ، ۸ تریپتوفان و ۱۶ فینیل آلانین به ازای ۲۶ آلانین می باشد[۵].

۱-۴-۴ نحوه عمل آنزیم

عمل آنزیم ها بر پایه واکنش بین سوبسترا و آنزیم درجایگاه فعال استوار است. وجود کمپلکس آنزیم سوبسترا در سال ۱۸۸۰ توسط آدولف ورتز[۱] برای اولین بار پیشنهاد شد. براساس این فرضیه واکنش آنزیمی در قسمتی از آنزیم بنام جایگاه فعال[۲] انجام می پذیرد. ملکولی که به جایگاه فعال متصل شده و آنزیم بر روی آن اثر می نماید سوبسترا [۳] می نامند. جایگاه کاتا لیتیکی رودنیز در محل اتصال دو دامنه آنزیم تشکیل یافته است قرار دارد. در مطالعات انجام گرفته بیان شده است که گروه های (SH) در فعالیت کاتالیزوری آنزیم نقش بسزایی دارند. در مکانیسم عمل آنزیم ردونیز یک سوبسترا نقش پذیرنده گوگرد و سوبسترای دیگر نقش دهنده آن را ایفا می کند[۱۷].

دراین مکانسیم ابتدا آنزیم با تیو سولفات[۴] باند شده و کملکس آنزیم- تیوسولفات را تشکیل میدهد. سپس یون سیانید با این کملکس وارد واکنش شده وبا تشکیل یون تیوسیاتید[۵] آنزیم آزاد می گردد[۵].

---

[1] -adolf vortez

[2] - active site

[3] - substrate

[4] -thiosulfate

[5] -thiocyanide

۱-۴-۵ عملکرد آنزیم

مهمترین عملکرد آنزیم رودنیز سم زدایی سیانور می باشد در حالی که این آنزیم دارای نقش های متعدد دیگری مانند فراهم سازی سولفید ناپایدار در حشرات،تشکیل مرکز آهن- سولفور در اشرشیا کولای و غیره می باشد[۵].

۱-۵ سینتیک آنزیمی

سینتیک آنزیمی عرصه ای در بیوشیمی است که با اندازه گیری کمی سر عت واکنش های آنزیمی و مطالعه اصولی عوامل موثر بر این سرعت ارتباط دارد.

۱-۵-۱ عوامل موثر بر سرعت واکنش ها

۱-۱-۵-۱درجه حرارت

با اینکه افزایش درجه حرارت موجب بالا رفتن سرعت انجام واکنشی که توسط آنزیم کاتالیز می شود،می گردد،اما این امر تنها در محدوده خاصی از دما صادق است[۳].

۱-۲-۵-۱غلظت آنزیم

سرعت ابتدایی یک واکنش ، سرعتی است که پیش از تولید محصول کافی جهت انجام واکنش برگشتی اندازه گیری می شود. سرعت ابتدایی واکنشی که توسط آنزیم کاتالیز می شود همواره متناسب با غلظت آنزیم است. البته توجه داشته باشید که این مطالب تنها در مورد سرعت ابتدایی واکنش صادق است[۳].

۳-۱-۵-۲غلظت سوبسترا

اگر غلظت آنزیم را ثابت نگه داشته و غلظت سوبسترا را افزایش دهیم مراحل واکنش شامل دو مرحله است. در ابتدای واکنش غلظت سوبسترا باعث افزایش سرعت واکنش ولی در انتهای واکنش دیگر این افزایش صورت نخواهد گرفت[۳].

pH ۴-۱-۵-۱

آنزیم ها دارای pH (یا یک دامنه pH) مطلوب می باشند. که در آن حداکثر فعالیت را نشان داده و در pH بالاتر یا پایین تر از آن ، فعالیت آن کاهش می یابد[۳].

۶-۱تقسیم بندی واکنش های آنزیمی بر اساس تعداد سوبسترا

۱-۶-۱واکنش های آنزیمی تک سوبسترایی

در این گونه واکنش ها آنزیم فقط بر یک سوبسترای خاص عمل مینماید. مانند اثر آنزیم کاتالاز بر پروکسید هیدروژن[۳]

۲-۶-۱واکنش های آنزیمی چند سوبسترایی

در این گونه واکنش ها آنزیم فقط بر دو سوبسترا یا بیشتر عمل می نماید. مانند اثر هگزوکیناز بر ATP و گلوکز در جریان گلیکو لیز[۳]

۳-۶-۱انواع واکنش های آنزیمی چند سوبسترایی

مکانیسم های اتصال سوبسترا به آنزیم در واکنش های آنزیمی bibi

۱-۳-۶-۱واکنش های اتفاقی

در واکنش های اتفاقی می توان هریک از سوبستراها را در ابتدا اضافه کرد که به این ترتیب ترکیب E-A یا E-B تشکیل می گردد[۳].

۲-۳-۶-۱واکنش های اجباری

در این نوع واکنش ها تنها ترکیب A می تواند با E واکنش انجام دهد حال آنکه ترکیب B تنها می تواند با کمپلکس E-A واکنش دهد[۳].

۳-۳-۶-۱واکنش های پینگ پنگی

عبارت پینگ پنگ در مورد مکانیسم هایی به کار می رود که در آن ها قبل از اضافه کردن همه سوبستراها،یک یا چند محصول آزاد شوند. واکنش های پینگ پنگی BiBi واکنشهای جابجایی مضاعف هستند، زیرا گروه منتقل شده G ابتدا توسط E از ترکیب A_G جدا می شود و سپس توسط B از ترکیب E_G خارج می شود و محصول Q_G تشکیل می گردد. اتصال سوبسترا در آنزیم رودنیز توسط این واکنش انجام می گیرد[۳].

۱-۷ تثبیت آنزیم ها

۱-۷-۱ تاریخچه تثبیت آنزیم ها

تاریخچه تکامل تثبیت[1] آنزیم ها را می توان به صورت کلی به سه مرحله تقسیم بندی کرد.شروع مرحله اول تکامل تثبیت آنزیم ها به قرن ۱۹ برمیگردد . دراین زمان تثبیت میکرو ارگانیسم ها به صورت تجربی در صنایع مورد استفاده قرار گرفت. در سال ۱۹۴۰ برای اولین بار تثبیت آنزیم ها در مجلات عملی ارایه گردید که توسط دانشمندان بیوشیمی مورد تایید قرار نگرفت. از تحقیقات انجام گرفته در این مرحله می توان به تحقیقات تجربی در مورد اسید استیک و جلوگیری از هدر رفتن آب اشاره کرد.مرحله دوم تکامل تثبیت آنزیم ها در سال ۱۹۶۰ به وقوع پیوست که در این هنگام آنزیم ها به صورت تکی تثبیت می شدند. از تحقیقات انجام گرفته در این زمان می توان به تولی Lآمینواسید و ایزومریزاسیون گلوکز اشاره نمود[۴۰].

مرحله سوم تکامل تثبیت آنزیم ها در سال ۱۹۷۰ به وقوع پیوست که در این مرحله آنزیم ها به صورت کمپلکس تثبیت می شدند . که این کمپلکس کوفاکتور و سلول های زنده را شامل می شد. از تحقیقات صورت گرفته در این دوره می توان به ساخت L آمینواسید از کتو اسید در غشای سلول اشاره نمود[۴۰].

۱-۸ هدف از تثبیت آنزیم ها

برای کاتالیز کردن واکنش های شیمیایی می توان یا با صورت خالص از آنزیم،ویا از آنزیم تثبیت شده استفاده کرد. با توجه به اینکه استفاده از آنزیم ها به صورت خالص دارای معایبی مانند گران بودن هزینه ، ناپایداری آنزیم ها برای بکار گیری در صنعت، سخت بودن آشکار سازی محصولات و سوبسترا در محلول و غیره می باشند. در نتیجه قبل از به‌کارگیری صنعتی آنزیم‌ها آنها را تثبیت می

[1] - immoblization

کنند . آنزیم تثبیت شده آنزیمی است که در پایه جامد قرار داده شده است در حالی که فعالیت کاتالیزوری آن باقی مانده است و به طور پیوسته و مکرر میتوان از آن استفاده نمود. استفاده از آنزیم به صورت تثبیت شده دارای مزایای است که ازجمله می توان به موارد زیر اشاره نمود[۴۲].

۱. استفاده مکرر از آنزیم تثبیت شده در واکنش شیمیایی مورد نظر

۲. توانایی توقف سریع واکنش به وسیله بر داشتن آنزیم از محلول

۳. پایداری بالای آنزیم

۴. جلو گیری از مخلوط شدن محصولات و آنزیم

۵. جدا کردن آنزیم و محصولات آسان است

۶. توانایی انجام واکنش چند آنزیم با همدیگر

۹-۱ روش های تثبیت آنزیم ها

تثبیت آنزیم ها به ۵ روش کلی زیر انجام می گیرند که این رو ش ها عبارتند از :

۱- پیوند کووالانسی[۱]

۲- ریزپوشینه سازی[۲]

۳- محبوس سازی[۳]

۴- پیوند عرضی[۴]

۵- جذب سطحی[۱]

---

[1] - covalan binding

[2] -microencapsulation

[3] -entrapment

[4] -cross linking

۱-۹-۱تثبیت آنزیم ها به روش پیوند کووالانسی

این روش زیر مجموعه روش تثبیت آنزیم ها به روش تثبیت اتصال به سطح می باشد که در این روش کلی برای تثبیت ازپیوندکووالانسی، واندروالس، پیوند یونی استفاده می شود.در میان این پیوند ها، پیوند کووالانسی قویترین نوع پیوند و پیوند وان در والسی ضعیف ترین نوع پیوند را ایجاد می نمایند. تثبیت آنزیم ها به روش کووالانسی یکی از پر کاربرد ترین روش های تثبیت آنزیم ها در صنایع است. .در این روش برای پیوند از گروه های نوکلئوفیلیک مانند SH,OH,COOH,NH2 استفاده می کنند. در این روش آنزیم مورد نظر توسط پیوند کووالانسی به گروه های عملکردی مورد نظر تثبیت می گردد.البته لازم به ذکر است که این گروه های عملکردی در فعالیت کاتاللیتکی آنزیم نقش چندانی ندارند. در این روش لازم است که واکنش در دمای پایین و pH خنثی صورت گیرد[۴۶] .

۱-۱-۹-۱مزایای تثبیت آنزیم ها به روش پیوند کووالانسی

۱. پیوند کووالانسی به دلیل تشکیل پیوند های مستحکم بین آنزیم وحامل، روشی پایدار است که از شستشوی پروتئین ها توسط محصولات و سلیر عوامل جلوگیری می نماید.

۲. دامنه انتخاب این روش ازنظر انتخاب مواد حامل و روش های پیوند گسترده می باشد

۳. نشت آنزیمی ندارد[۳۲،۳۶].

۲-۱-۹-۱معایب تثبیت آنزیم ها به روش پیوند کووالانسی

۱. از احاظ اقتصادی هزینه بر است

۲. شیوه اجرا آن پیچیده می باشد

۳. باعث تغییر در جایگاه فعال آنزیم می شود[۳۲،۳۶]

---

[1] - physical adsorbstion