تحميل إنزيمات مختلفة على جسيمات نانوية مغناطيسية

إعداد الطالب
ماجد حمد الحربى

إشراف
أ. د. صالح أحمد محمد
أ.د. إبراهيم حسن إبراهيم
أ.د. رضا محمد الششتاوى

الملخص العربى

يستخدم إنزيم البيروكسيديز والألف-أميليز في العديد من التطبيقات مثل التخلص من سمية و التحويل الحيوي للعديد من الفينولات والأمينات الأروماتية والصبغات الموجودة في المياه الملوثة للصرف الصحي والمصانع وتحليل الكربوهيدرات. إن الإنزيمات الذائبة لا يمكن إستغلالها بكمية كبيرة بسبب بعض العوامل التي تحد من استخدامها. من جانب أخر فإن استخدام الإنزيم المحمل له العديد من المميزات مثل زيادة الثباتية، حماية الإنزيم من العوامل التي تغير من طبيعته، التحلل البروتيني وتقليل قابليته للتلوث. وعلى هذا فإن الهدف من هذا العمل هو تطوير طريقة لتحميل إنزيم بيروكسيديز الفجل و الألفا-أميليز على جزيئات متناهية الصغر من أوكسيد الحديديك ليكون ملائما للعديد من التطبيقات. وكذلك تقييم الخواص البيوكيميائية للإنزيم المحمل بالمقارنة مع الإنزيم الذائب. وتتلخص النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة فيما يلي:

أولا تم تحميل إنزيم البيروكسد من الفجل على جزيئات متناهية الصغر غير محورة من أوكسيد الحديديك.ثبت أن قدرة تحميل الإنزيم تعتمد على تركيز جزيئات متناهية الصغر غير محورة من أوكسيد الحديديك، حيث أزدادت القدرة التحميلية مع زيادة أوكسيد الحديديك حتى ٢٠٠ مجم ثم تتناقص القدرة مع زيادة التركيزات. تبين أيضا أن القدرة التحميلية للإنزيم تزداد مع زيادة تركيز الإنزيم حتى ١٨٨ وحدة نشاط. تبين أن أعلى قدرة تحميلية للإنزيم عند أس هيدروجيني ٨. تمد دراسة خواص الإنزيم المحمل بالأشعة تحت الحمراء و الميكروسكوب الألكتروني. قد احتفظ الإنزيم المحمل ب ٥٥% من نشاطه الأصلي بعد ١٠ مرات من إعادة استخدامه. وقد تم إزاحة الأس الهيدروجيني الأمثل للإنزيم الذائب من ٧,٠ إلى ٧,٥ للإنزيم المحمل. وقد تم إزاحة درجة الحرارة المثلى للإنزيم الذائب من ٤٠ °م إلى ٥٠ °م للإنزيم المحمل. تبين أن الإنزيم المحمل أكثر ثباتية للحرارة من الإنزيم الذائب. كما تبين أن الإنزيم المحمل له القدرة على التفاعل مع كل المواد الوسيطة المختبرة أعلى من الإنزيم الذائب. قدرت قيم ثابت ميكائيل للإنزيم الذائب والمحمل ب ٣١ و ٤٥ مللى مولار بالنسبة للجوايكول و ٥ و ٧ مللى مولار لبيروكسيد الهيدروجين. وجد أن الإنزيم المحمل أكثر مقاومة للمعادن الثقيلة المحفزة للتثبيط مقارنة بالإنزيم الذائب. وقد تبين أن الإنزيم المحمل أكثر ثباتية لتغير طبيعته المحفزة بواسطة اليوريا، التريتون أكس- ١٠٠ والإيزوبروبانول. وكان الإنزيم المحمل أكثر ثباتية ضد التحلل البروتيني بواسطة إنزيم الترببسين عن الإنزيم الذائب.

ثانيا تم تحميل الألفا-أميليز من التريكوديرم هازيانم على جزيئات متناهية الصغر محورة من أوكسيد الحديديك. تم دراسة تأثير النسبة المئوية من البيرول/الفضة على وزن أوكسيد الحديديك والأس الهيدروجيني على تحميل إنزيم الألف-أميليز.تم تحديد أعلى قدرة لتحميل الإنزيم (٧٥%) عند ١٠% البيرول/الفضة/ أوكسيد الحديديك مركب متناهى الصغر وأس هيدروجيني ٧. تم دراسة خواص الإنزيم المحمل بالأشعة تحت الحمراء و الميكروسكوب الألكتروني. قد احتفظ الإنزيم المحمل ب ٨٠% من نشاطه الأصلي بعد ١٠ مرات من إعادة استخدامه.وجد أن الإنزيم المحمل ثابث ضد الخصائص الفيزيائية والكيميائية بالنسبة الأس الهيدروجيني، الحرارة أيونات الفلزات. كما تبين أن الإنزيم المحمل له القدرة عالية على تحليل شبيهات المادة الوسيطة مثل النشا، الجليكوجين، أميلوبكتين، أميلوز، ألفا-سيكلودكسترين وبيتا سيكلوديكسترين عن الإنزيم الذائب. كانت قابلية الإنزيم المحمل للنشا عالية مقارنة بالإنزيم الذائب، حيث قدرت قيم ثابت ميكائيل للإنزيم الذائب والمحمل ب ٣,٥ و ٢,٥ مجم نشا، على التوالى.

وفى الأستنتاج، فقد تبين أن تحميل إنزيم البيروكسيديز والألف-أميليز على جزيئات متناهية الصغر من أوكسيد الحديديك قد حسن ثابنية الإنزيم تجاه تغيير طبيعة الإنزيم المستحثة بواسطة الأس الهيدروجينى، الحرارة، الأيونات الفلزية، مزيلات السطوح و المذيبات العضوية . كما أكسد الإنزيم البيرزكسيديز المحمل بعض المواد الفينولية مثل الجوايكول ، الأورثو-فينيلينديامين ، الأورثو-دينازيدين ، البارا-أمينوأنتيبيرين و البيروجالول والتى تعتبر من الملوثات البيئية. :كما حلل إنزيم الألفا-أميليز النشا، الجليكوجين، أميلوبكتين، أميلوز، ألفا-سيكلودكسترين وبيتا سيكلوديكسترين.إن تجميل هذه الإنزيمات على جزيئات متناهية الصغر من أوكسيد الحديديك يمكن إستخدامها بنجاح فى تطبيقات التخلص من الملوثات، الغذاء والطب.

Immobilization of different enzymes on magnetic nanoparticles

By
Majed Hamd Al-Harbi

Supervised By

Prof. Saleh Ahmed Mohamed

Prof. Ibrahim Hassan Ibrahim

Prof. Reda Mohamed El-Shishtawy

Abstract

Firstly, horseradish peroxidase (HRP) was immobilized on non-modified Fe_3O_4 magnetic nanoparticles. Immobilized HRP was characterized by FT-IR spectroscopy, scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray. The immobilized HRP retained 55% of its initial activity after ten reuses. The pH was shifted from 7.0 for soluble HRP to 7.5 for the immobilized HRP. The optimal temperature of soluble HRP was shifted from 40°C to 50°C for the immobilized HRP. The immobilized HRP is more thermal stable than soluble HRP. Various substrates were oxidized by immobilized HRP with higher efficiency than that of soluble HRP. Km values of the soluble HRP and the immobilized HRP were 31 and 45 mM for guaiacol and 5.0 and 7.0 mM for H_2O_2, respectively. Some tested metals had shown less inhibitory effect on immobilized HRP compared with soluble HRP. The immobilized HRP was more stable against high concentration of urea, Triton X-100 and isopropanol. The immobilized HRP was found to exhibit high resistance to proteolysis by trypsin than soluble enzyme.

Secondly, a new enzyme carrier had been developed using covalent immobilization of α-amylase from *Trichoderma harzianun* onto modified magnetic Fe_3O_4-nanoparticles. The effect of polypyrrole/silver nanocomposite (PPyAgNp) percentage on weight of Fe_3O_4 and pH on the immobilization of α-amylase was studied. The maximum immobilization efficiency (75 %) was detected at 10 % PPyAgNp/Fe_3O_4-nanocomposite and pH 7.0. Immobilization of α-amylase on 10 % PPyAgNp/Fe_3O_4-nanocomposite was characterized by FT-IR spectroscopy and scanning electron microscopy. The reuse capability of immobilized α-amylase was 80% of its initial activity after 10 runs. Immobilized α-amylase was found to be stable against both physical and chemical properties with regard to pH, temperature and metal ions. The immobilized α-amylase hydrolyzed substrate analogs such as starch, glycogen, amylopectin, amylose, α-cyclodextrine and β-cyclodextrin with high efficiency than that of soluble α-amylase. The affinity of immobilized α-amylase towerds starch was higher compared with soluble enzyme, where Km values of the soluble α-amylase and the immobilized α-amylase were 3.5 mg and 2.5 mg of starch, respectively. In conclusion, the physical immobilization of peroxidase and α-amylase on iron magnetic nanoparticles improved the enzyme stability toward the denaturation induced by pH, heat, metal ions, urea, detergent and water–miscible organic solvent. The immobilization of these enzymes on magnetic nanoparticles could be successfully used in bioremediation, food and other medical applications.