تحميل إنزيم بيروكسيديز الفجل على مبلمر طبيعى

إعداد الطالب
أنس عابد عمر درويش

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

المستخلص

إن الإنزيم المحمل يقدم العديد من الفوائد مثل زيادة الثباتية، إستعادة المنتج بسهولة وتنقيته، حماية الإنزيم من المواد التى تغير من طبيعته كالتحلل البروتينى و تقليل التأثر بالملوثات. لذلك فإن هدف هذا العمل هو تحميل إنزيم بيروكسيديز الفجل ليصبح متلائم مع تطبيقاته.

وتشتمل الطرق على تنقية جزئية لإنزيم البروكسيديز من الفجل بإستخدام الترسيب بسلفات الأمونيم، تحميل الإنزيم على صوف معالج بكلوريد السيانوريك ودراسة خواص الإنزيم الذائب والمحمل. واستخدام تقنية الأشعة تحت الحمراء والمجهر الإلكتروني لدراسة خواص الإنزيم المحمل.

قد احتفظ الإنزيم المحمل ب 62% من نشاطه الأصلي بعد 6 مرات من إعادة استخدامه. وقد تبين أن الأس الهيدروجينى الأمثل للإنزيم المحمل متسع عند 7 و 8، حيث كان أعلى من الإنزيم الذائب (أس هيدروجني 6). وجد أن درجة الحرارة المثلى للإنزيم الذائب 30ºم ، التي تتبدل إلى 40ºم بالنسبة للإنزيم المحمل. تبين أن الإنزيم الذائب والمحمل ثابت حتى 30ºم و 40ºم بعد تحضينه لمدة 15 دقيقة وأحتفظ ب 44 و 56% من نشاطه عند 60ºم، على التوالي. كما تبين أن الإنزيم المحمل له القدرة على التفاعل مع كل المواد الوسيطة المختبرة وأن سرعة تكوين المنتج للإنزيم المحمل أعلى من الإنزيم الذائب. قدرت قيم ثابت ميكائيل للإنزيم المحمل ب 10 مللى مولار بالنسبة للجوايكول و 2.5 مللى مولار لبيروكسيد الهيدروجين والتي تعتبر أعلى من الإنزيم الذائب. وكان الإنزيم المحمل أكثر ثباتية ضد التحلل البروتينى بواسطة إنزيم التريبسين. وجد أن الإنزيم المحمل أكثر مقاومة للمعادن الثقيلة المحفزة للتثبيط. وقد تبين أن الإنزيم المحمل أكثر ثباتية لتغير طبيعته المحفزة بواسطة اليوريا، التريتون أكس- 100 والإيزوبروبانول. تبين أن الإنزيم الذائب يفقد 46% من نشاطه بعد 16 أسبوع من التخزين، بينما الإنزيم المحمل يحتفظ ب 86% من نشاطه في نفس المدة.
وفى الاستنتاج، إن الإنزيم المحمل في هذه الدراسة يمكن استخدامه في العديد من الأغراض الصناعية والبيئية.

Immobilization of Horseradish Peroxidase on Natural Polymer

By Anas Abed Omar Darwish

Supervised By

Prof. Saleh Ahmed Mohamed

Prof. Reda Mohamed El-Shishtawy

Abstract

The immobilized enzyme has offered several advantages, such as enhanced stability, easier product recovery and purification, protection of enzymes against denaturants, proteolysis and reduced susceptibility to contamination. Therefore, the goal of this work is to immobilize horseradish peroxidase (HRP) to be compatible with its further application.

The methods included partial purification of HRP using ammonium sulphate precipitation, immobilization HRP on modified wool by cyanuric chloride and characterization of soluble of immobilized enzyme. The fourier transform infrared FT-IR spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM) were used to characterize HRP immobilization.

The immobilized HRP retained 62% of initial activity after six reuses. Immobilized HRP showed broad optimum pH at 7.0 and 8.0, which was higher than that of the soluble HRP (pH 6.0). The soluble HRP had an optimum temperature of 30°C, which was shifted to 40°C for immobilized enzyme. The soluble and immobilized HRP were stable up to 30 and 40°C after incubation for 15 min. The immobilized HRP was able to react with all tested substrates and the velocity of the product for immobilized enzyme was higher than that soluble enzyme The apparent kinetic constant values (Kms) of immobilized HRP were 10 mM for guiacol and 2.5 mM for H_2O_2, which were higher than that of soluble HRP. The immobilized HRP was remarkably more stable against proteolysis mediated by trypsin. The immobilized HRP exhibited more resistance to heavy metal induced inhibition. The immobilized HRP was more stable to the denaturation induced by urea, Triton X-100 and isopropanol. The soluble HRP lost 46% of its activity after 16 weeks of storage, while the immobilized HRP retained 86% of its original activity at the same time.

In conclusion, the immobilized HRP could be exploited for several industrial and environmental purposes.