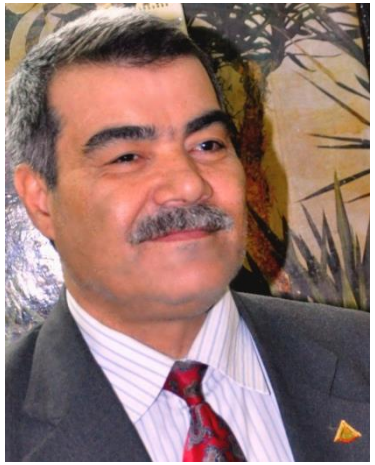
محاضرات
كيمياء الأنزيمات وتحميلها
المستوي الثالث (البيوتكنولوجي)
المحاضرة السابعة

اعداد



أ.د/ فرحات فودة علي فودة
أستاذ الكيمياء الحيوية

تحميل الانزيمات والخلية

Immobilzation of enymes and cells

يعتبر نظام تحميل الانزيمات والخلايا اسلوب حديث ومتنوع لتحفيز تفاعلات انزيمية كثيرة وبدرجة عالية من التخصص وهذا النظام لة امكانيات تطبيقية كثيرة في مجالات متعددة منها

organic chemistry - Analytical chemistry - Biology -Microbiology - Immunology - Chemical engineering - Biochemical engineering - Medicine.

ويهدف هذا الجزء من المقرر

(١) دراسة لماذا يتم تحميل الانزيمات وماهمية التحميل .

(٢) دراسة مميزات وعيوب نظام التحميل .

Advantages and Disadvantages

(٣) دراسة الطرق المختلفة لاتمام نظام التحميل .

(٤) دراسة اهم الاعتبارات الواجب مراعتها عند استخدام هذا النظام .

(٥)التعرف على طبيعة المواد الحاملة وكيفية التنشيط لها .

(٦) دراسة التاثيرات الايجابية والسلبية لنظام التحميل سواء على التفاعلات او الانزيم .

(٧) دراسة أهم أنواع المفاعلات ونظم السحب والتغذية.

(٨) دراسة النواحى التطبيقية لهذا النظام سواء فى التخليق العضوى ، الاختبارات الاكلينيكيةو الاساليب التحليلية وكذلك استخدامها فى المجالات الصناعية المختلفة .

Definition of system

تعريف النظام

التفاعلات الانزيمية تتم داخل انظمة يوجد فيها الانزيم بالصورة الذائبة **Soluble enzyme** وهذا الانزيم عند استخدامة فى الاغراض الصناعية والطبية وغيرها من المجالات الاخرى يفقد او يهلك عند اتمام العملية . ونظرللتكلفة العالية فى تحضير الانزيمومدى صعوبتها لانتاج مثل هذة الانزيمات فقد بذلت محاولات كثيرة لفصل الانزيم من محلول التفاعل لامكانية اعادة استخدامة **Reuse or Recycle** عديد من المرات .

وقد اسفرت تلك البحوث عند نجاح فصل الانزيم بعد اتمام عملة لاعادة استخدامة وذلك بتغير طبيعة وجود الانزيم فى مخلوط التفاعل من الحالة الذائبة الى الحالة الغير ذائبة وذلك بربط ،ادمصاص، اتحاد الانزيم بمواد اخرى(هى فى الغالب مواد عضوية) دون حدوث ادنى تاثير على نشاط الانزيم بيحيث يتكون معقد بين الانزيم والمادة الرابطة وفى صورة غير ذائبة فى محلول التفاعل وتسمى تلك العملية بعملية التحميل للانزيمات سواء الانزيمات او الخلايا وتسمى المادة التتربط الانزيم بالمادة الحاملة **Carrier** او الدعامة **Support** .

لماذا يتم تحميل الانزيمات Whey Immobilization

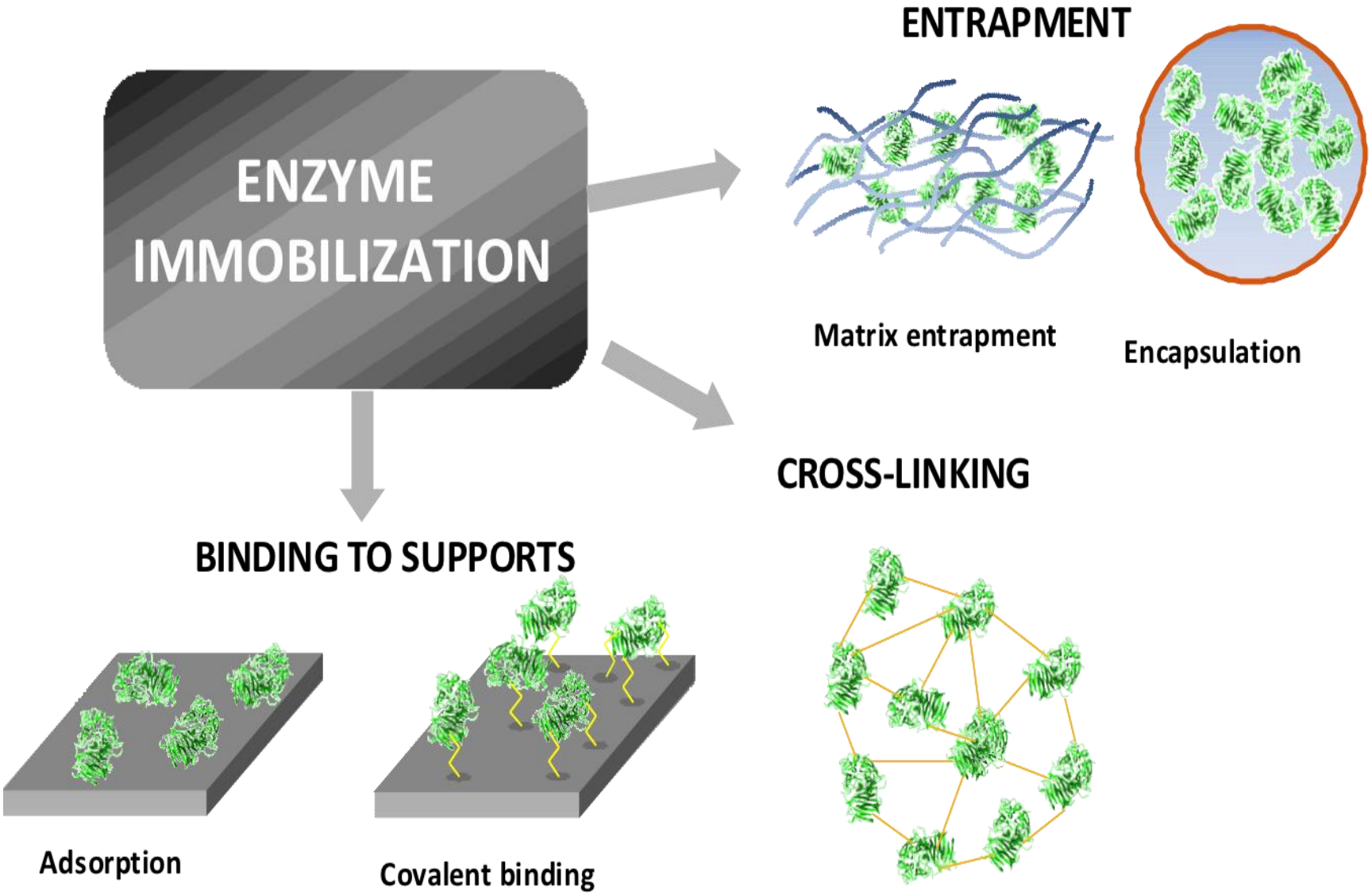
الانزيمات الحرة (الذائبة)

(١) الانزيمات الذائبة غير ثابتة تجاة استخدام المذيبات العضوية، درجات الحرارة المرتفعة .

(٢) الانزيمات الذائبة غير اقتصادية نظرا لفقدها بعد اتمام التفاعل .

(٣) من الصعب جدا اعادة استخدامها نظرا لصعوبة فصلها من مخلوط التفاعل

(٤) يحدث لها دنترة (تغير فى التركيب التكوينى لجزىء البروتين) .


ENZYME IMMOBILIZATION
ENTRAPMENT
Matrix entrapment
Encapsulation
CROSS-LINKING
BINDING TO SUPPORTS
Adsorption
Covalent binding

بينما ترجع اهمية تحميل الانزيمات Immobilized enzymes

(بمعنى مميزات الانزيمات المحملة)

(١) يمكن اعادة استخدامها (٢) تحسين فى ثبات الانزيم

(٣) الاستخدام المستمر عمليا (٤) انخفاض سعر (تكلفة) الانزيم

(٥) الاسراع من نشاط الانزيم (٦) عمل تعديل كيماوى للانزيم

(٧) زياة فترة حيوية الانزيم وبالتالى اطالة فترة نشاطة .

(٨) امكانية استخدام الانزيم اكثر من مرة .

(٩) يوجد افضل تحكم للتفاعل وارتفاع درجة الثباتية فى التشغيل .

(١٠) امكانية استخدام تفاعل خطوة واحدة يحتوى على عدة انزيمات بدلا من تتابعها .

(١١) تكون الانزيمات المحملة على درجة عالية من النقاوة والكفاءة للنواتج المتحصل عليها .

(١٢) تسهيل ارتباط الانزيم بالمادة العضوية(مادة التحميل) البوليمرية مثل السليلوز وغيرها .

(١٣) المحصلة النهائية لنشلط الانزيم المحمل تكون عالية .

(١٤) حيز(حجم) التفاعلات المطلوبة ياخذ اقل حيز **less space** وخصوصا فى حالة استخدام المفاعلات **Reactors** .

تعريف الانزيمات المحملة

هى الانزيمات التى ترتبط كيمياويا اوطبيعيا مع بوليمر، مادة حاملة ، دعامة غير قابلة للذوبان فى الماء او تغليف الانزيم بواسطة كبسولة من جل غير قابل للذوبان فى الماء وذلك لامكان اعادة استخدام الانزيمات المحملة مرة اخرى او تكرار استخدامها فى تفاعلات اخرى مماثلة .

وحيث ان الانزيم فى مجملة(تكوينة) عبارة عن بروتين لها نشاط حيوى فان الارتباط **Attachment** الذى يحدث بين هذا الانزيم والمادة الحاملة **Support** هو عبارة عن ارتباط داخلى **Bonding interaction** يتم عن طريق تكوين روابط اخلية ، قد يتم فى نظام اخر بان يحبس، يحجز ، يغمس الانزيم **Entrapment** داخل المادة الحاملة او الدعامة بشكل يسمح للانزيم بمزاولة نشاطة مع مواد التفاعل التى تدخل وتخرج الى الانزيم دون ان يستطيع الانزيم الخروج ، الهروب فى مواد المحلول فى شكل ذائب .

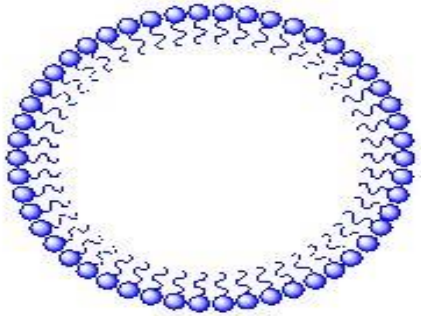
Immobilization :- The attachment or Entrapment of a species, such as an enzyme or cell to a support .

The attachment is a bonding interaction and the support is either soluble or insoluble inert or reactive .

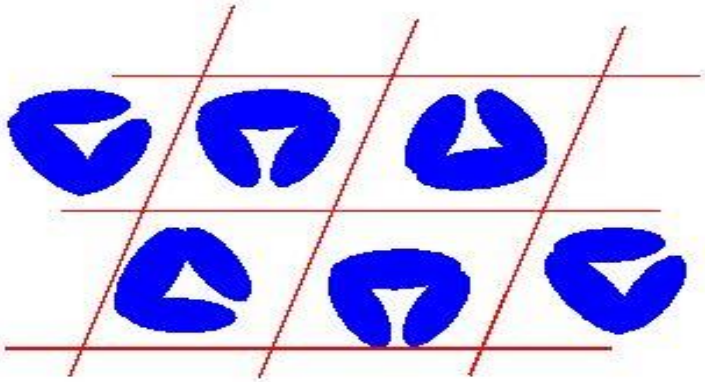
والمواد الحاملة قد تكون خاملة تحتاج الى تنشيط قبل استخدامها، مواد نشطة تستخدم مباشرة .

adsorption

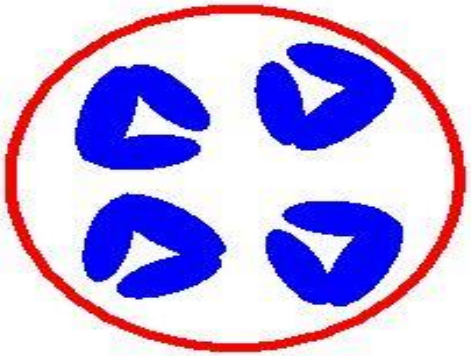
covalet binding



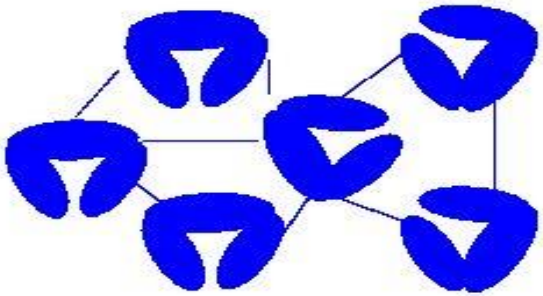
micelle



entrapment



encapsulation

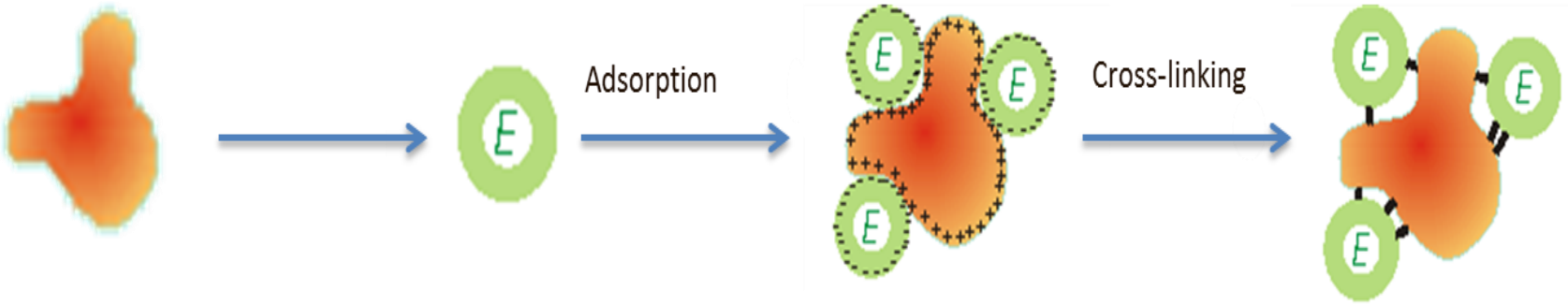


cross-linking

self-assembly

Adsorption

Adsorbtion + and cross-linking



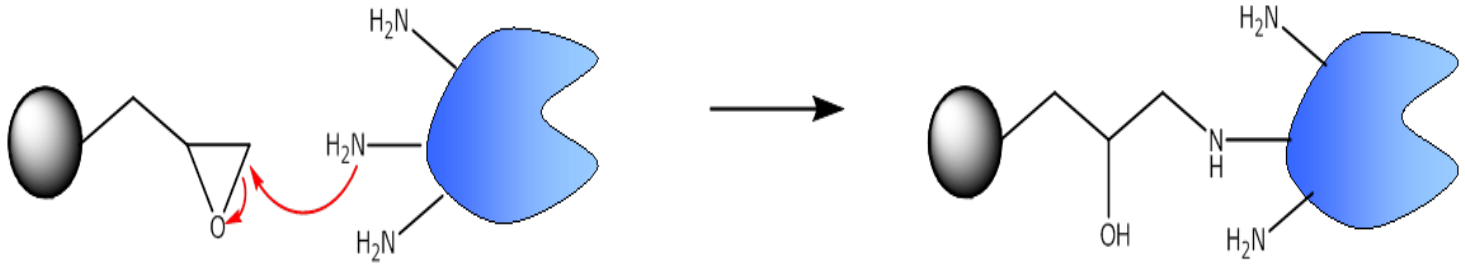
Porous solid support

Enzyme

Adsorbed enzyme on the support

Enzyme immobilized in a network

Covalent Immobilization (hydrophobic support functionalized with epoxy groups)



Hydrophobic support
Functionalized with epoxy groups

Enzyme

Covalently bonded enzyme

مايجب مراعاتة فى نظام التحميل

Guideline of immobilization system

هناك ثلاث نقاط هامة يجب ان توضع فى الاعتبارعند اختيار التكنيك، الطريقة المستخدمة فى التحميل وهى :-

(١) النظام التكوينى للعملية نفسها **System configuration**

يجب ان تلائم النظام من حيث الشكل ، الوضع ، وطبيعة العملية التى يقوم بها النظام بحيث يعطى التاثير المطلوب دون اى تاثيرات جانبية سواء فى نشاط الانزيم وا من المادة الحاملة .

(٢) **Chemistry** يجب مراعاة النواحى الكيميائية الخاصة بالنظام ومدى تغيير تلك النواحى وتاثيرها على طبيعة الانزيم المحمل وكذا تاثير النظام بكل من الحموظة ، وتركيب المادة المتفاعلة والمواد الناتجة والحرارة .

(٣) الاستخدامات **Applications** يجب اختيار النظام (انزيم + مادة حاملة) لتكون ملائمة تماما ، الى حدما للعملية المطلوبة لاستخدام مثل هذا النظام كما يجب ان يكون النظام ثابت وذو كفاءة عاليةوقابل للاستخدام بشكل جيد فى النواحى التطبيقية وخصوصا النواحى الصناعية

كما ذكر سابقا ترجع اهمية التحميل الى عدة مزايا ولكن فى نفس الوقت ينتج عنها بعض العيوب يمكن ابرازها فى النقاط التالية :-

(١) خطوات اضافية Additional steps

يحتاج هذا النظام الى كثير من الخطوات الاضافية فى تحضيرة وتصميم النظام وكذلك يحتاج الى وقت اطول هذا بالاضافة الى صعوبة تنفيذة ويحتاج الى خبرة عالية .

(٢) النواتج (المتحصل عليها) Yields

يتاثر نشاط الانزيم نفسة خلال تحضير، تصميم النظام بالرغم من زيادة الثباتية لة وبالتالى تقل كفاءتة ويكون الناتج اقل من حيث الكمية فى وحدة الوقت .

(٣) الجوانب الاقتصادية للنظام Economics

رغم ان هذا النظام يؤدى الى توفير تكاليف تحضير الانزيمات المتكرر واستخدامة اكثر من مرة الا ان تحضيرة بهذا النظام نفسة مكلف جدا بجانب ان المواد الحاملة هى الاخرى غالية الثمن .

(٤) تغير خواص الانزيم المحمل Changed enzyme properties

نتيجة لهذا النظام يحدث تغير فى خواص بروتين الانزيم داخل هذا النظام فقد يحدث هدم ،تكسير ، دنترة ،تثبيط لة ...الخ .

طرق تحميل الانزيمات

Methods of Immobilization

أمكن التعرف على عديد من الطرق ، التكنيكات المختلفة فى طبيعة ارتباط الانزيم بالمواد الحاملة وهى :-

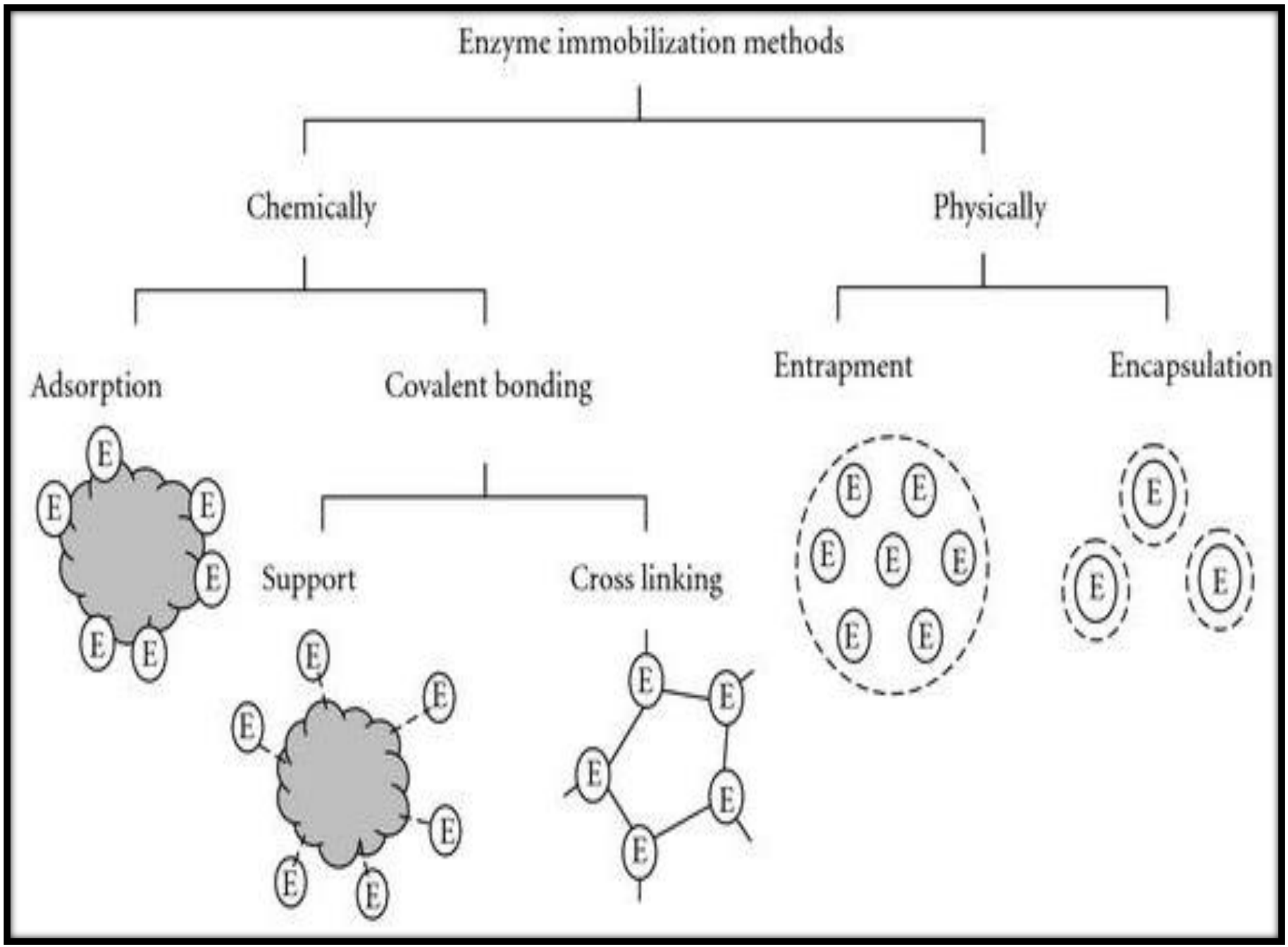
(١) الادمصاص Adsorption

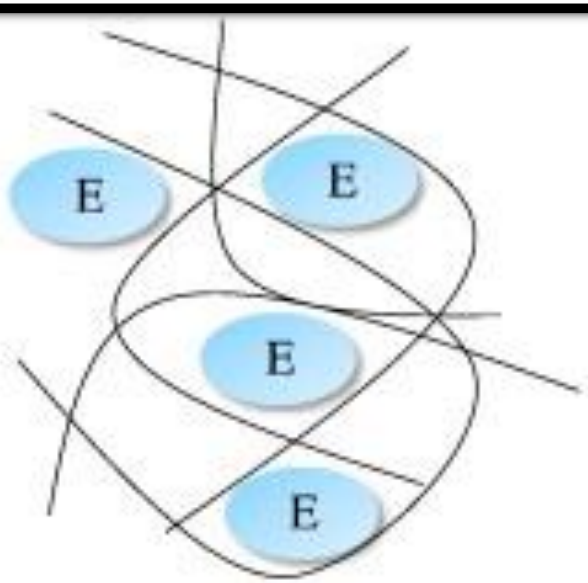
(٢) الحجز ، الحبس Entrapment

(٣) التغليف بالكبسولات Encapsulation

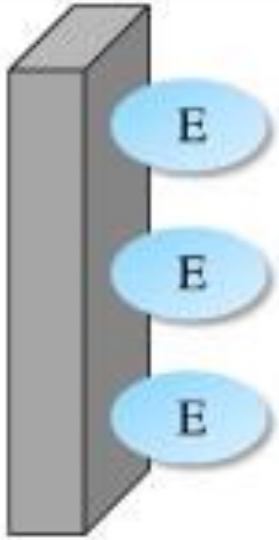
(٤) الارتباط التساهمى Covalent Attachment

(٥) الدمج بالبلمرة Copolymerization

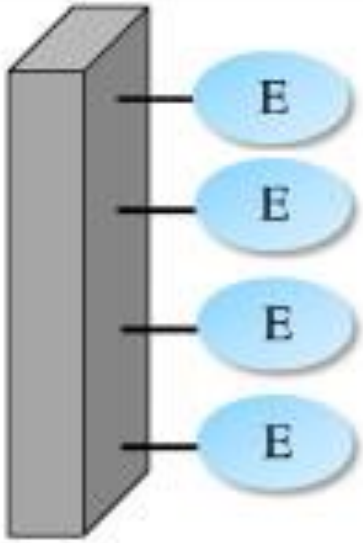

Enzyme immobilization methods
Chemically
Physically
Adsorption
Covalent bonding
Entrapment
Encapsulation
Support
Cross linking
E



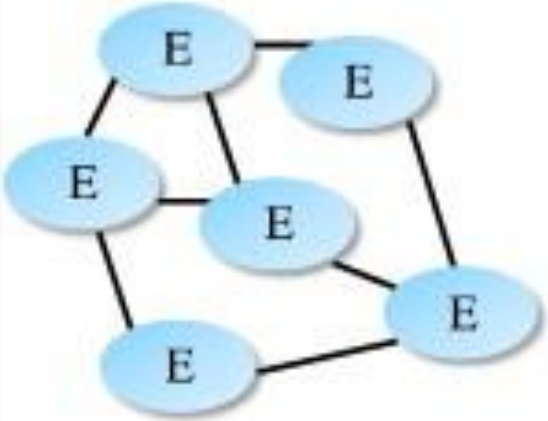
Entrapment

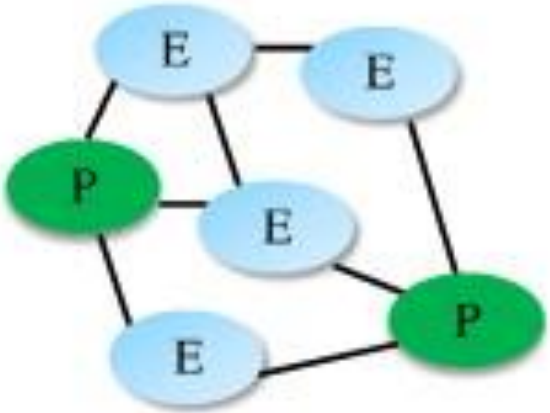


Adsorption

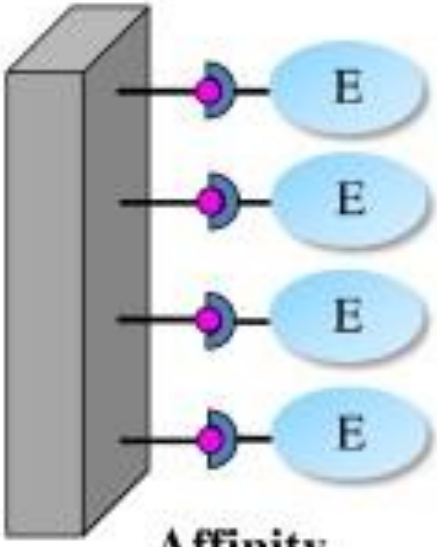


Covalence

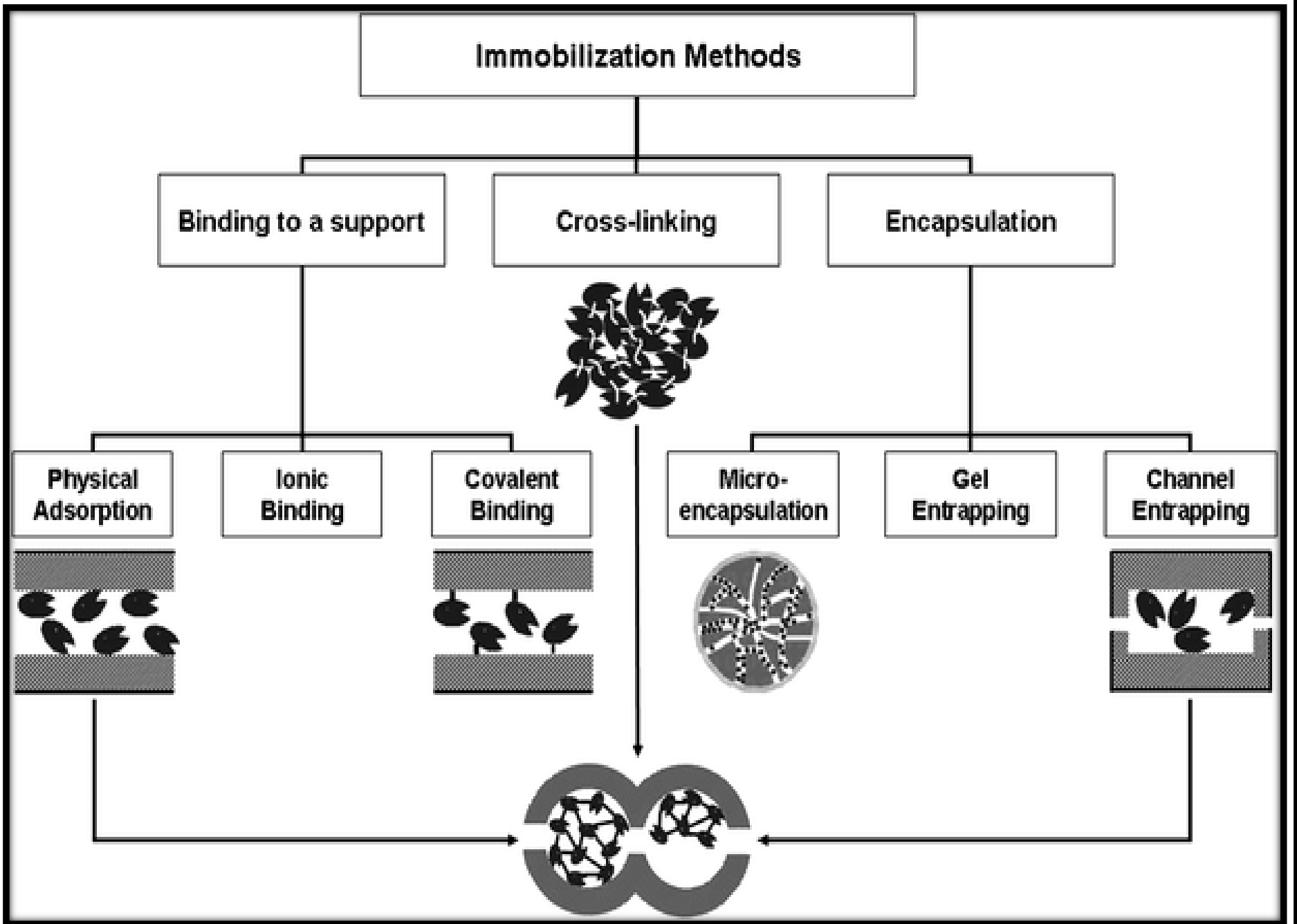




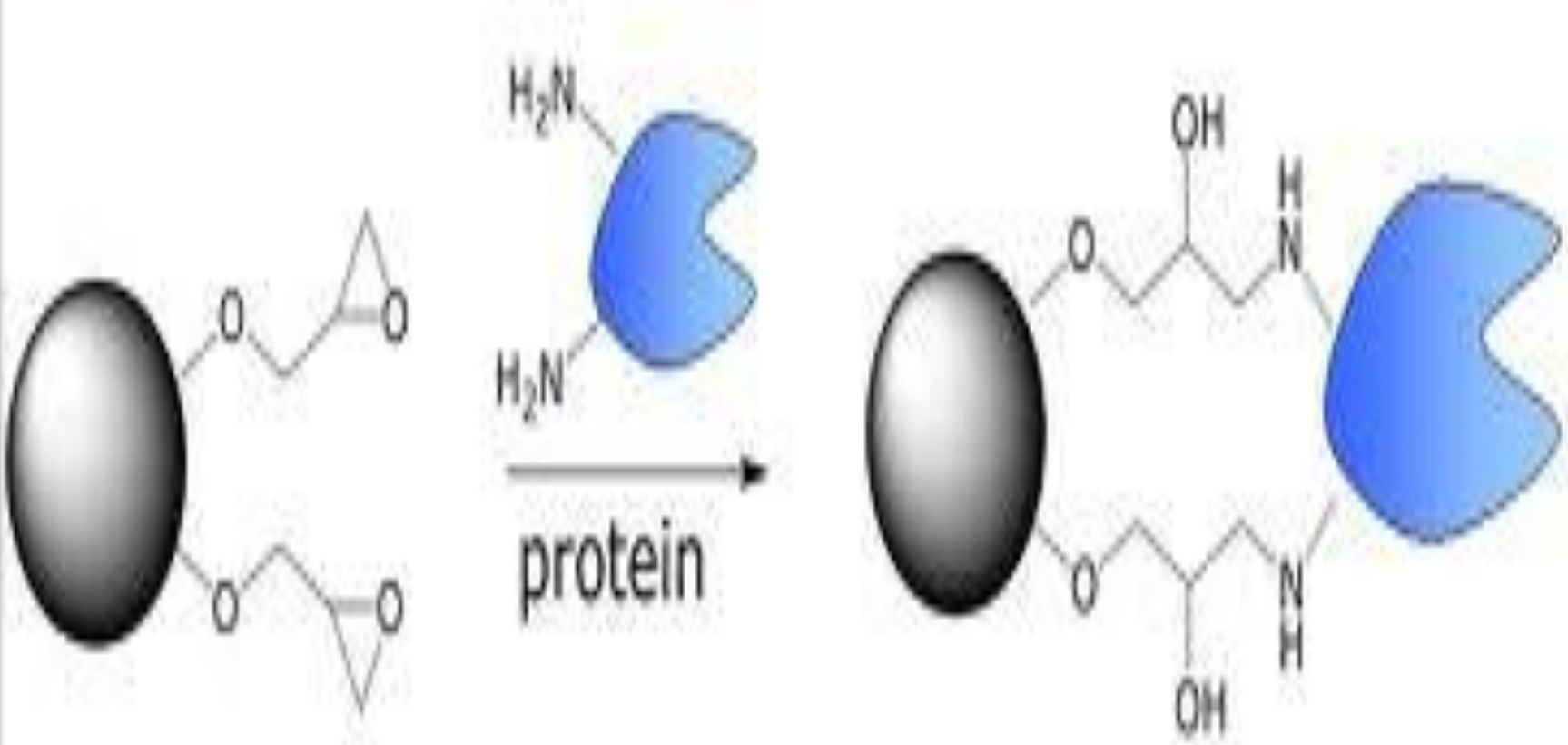
Cross-linking

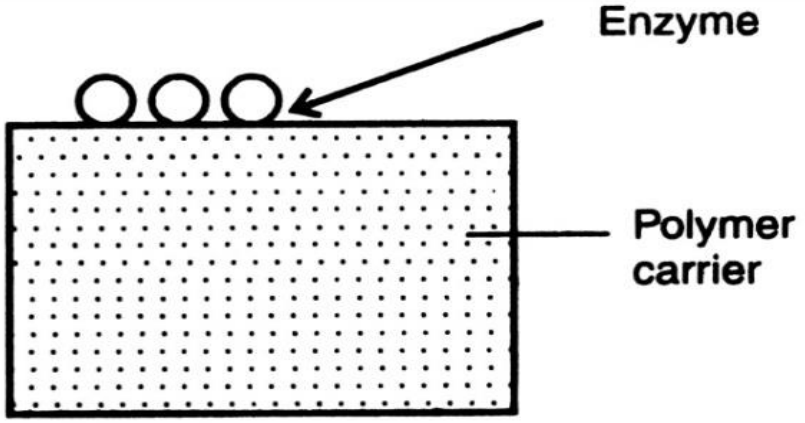


Affinity

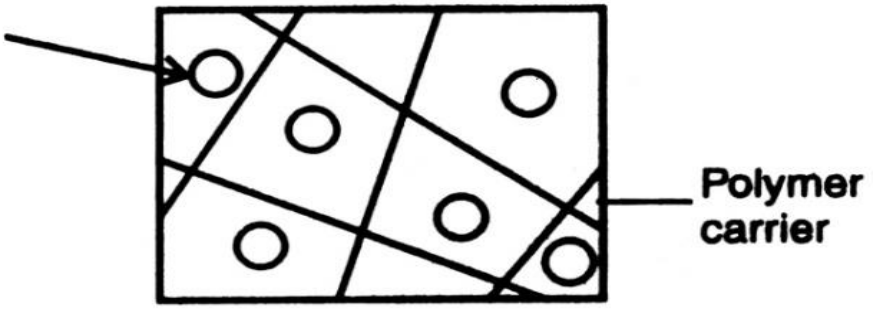

Immobilization Methods
Binding to a support
Cross-linking
Encapsulation
Physical Adsorption
Ionic Binding
Covalent Binding
Micro-encapsulation
Gel Entrapping
Channel Entrapping

epoxy support



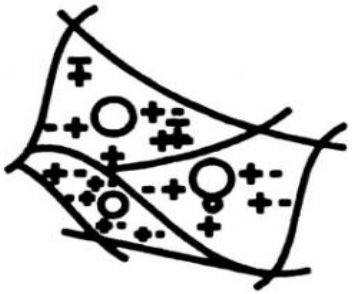


I. Adsorption

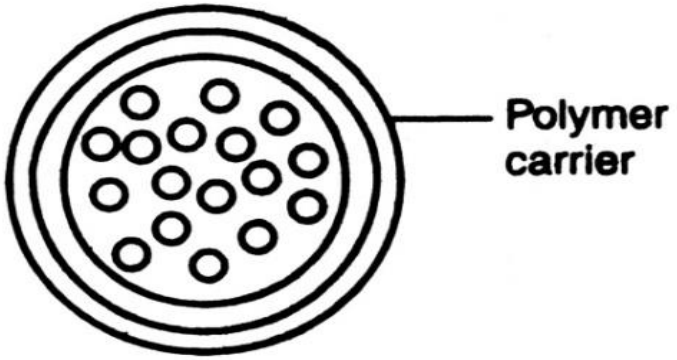


C. Entrapment

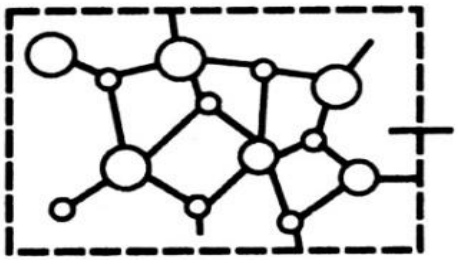
A.



II. Ionic bonding

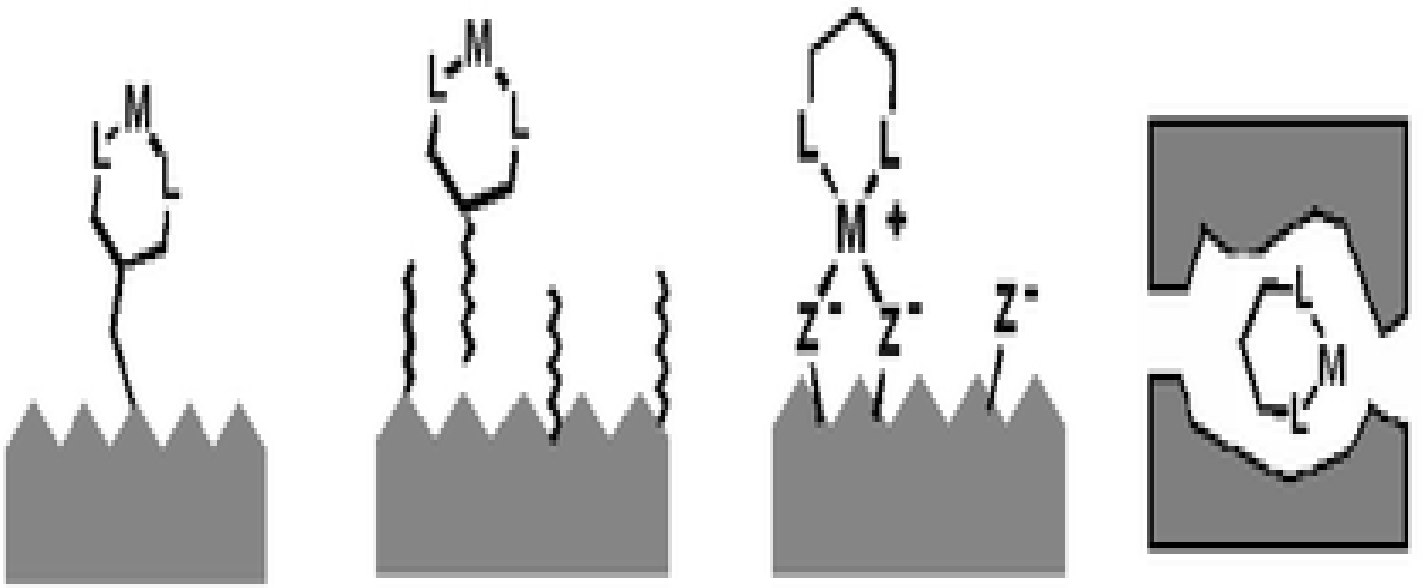


D. Encapsulation



B.

Covalent bonding
(Copolymerization)



immobilisation method	covalent bonding	adsortion	ion pair formation	entrapment or "ship in a bottle"
application (problems)	broad	restricted (competition with solvent, substrates, salts)	restricted (competition with ionic substrates, salts)	restricted (size of substrates, diffusion)

ولا يمكن تحميل كل الانزيمات بطريقة واحدة وبصورة جيدة ولكن يتوقف اختيار طريقة التحميل على :-

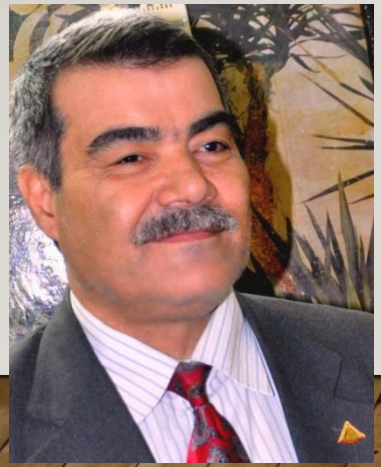
- الاختلاف فى طبيعة تركيب الانزيم
- خواص الشحنات Charge Characteristics
- الاختلاف فى تركيب ال Active prosthetic group
- خواص مادة التفاعل حيث لها ارتباط باختيار النظام للتحميل .

محاضرات كيمياء الأنزيمات وتحميلها

المستوي الثالث (البيوتكنولوجي)

المحاضرة الثامنة

اعداد



أ.د/ فرحات فودة علي فودة

أستاذ الكيمياء الحيوية

(١) التحميل بالادمصاص

Adsorption Immobilization

تعتبر هذة الطريقة هى ابسط الطرق لتحميل الانزيمات حيث يتم ادمصاص الانزيم على سطح المادة الحاملة الغير ذائبة . ويتوقف نجاح تحميل الانزيمات على مواد التحميل بالادمصاص على:-

- الروابط الفيزوكيميائية **Physicochemical bonds**

- الشحنات الكهربية المتضادة **Opposite electrical charges**

والروابط الضعيفة المسئولة عن عملية الادمصاص هى :

- **Electrostatic (ion - ion)**

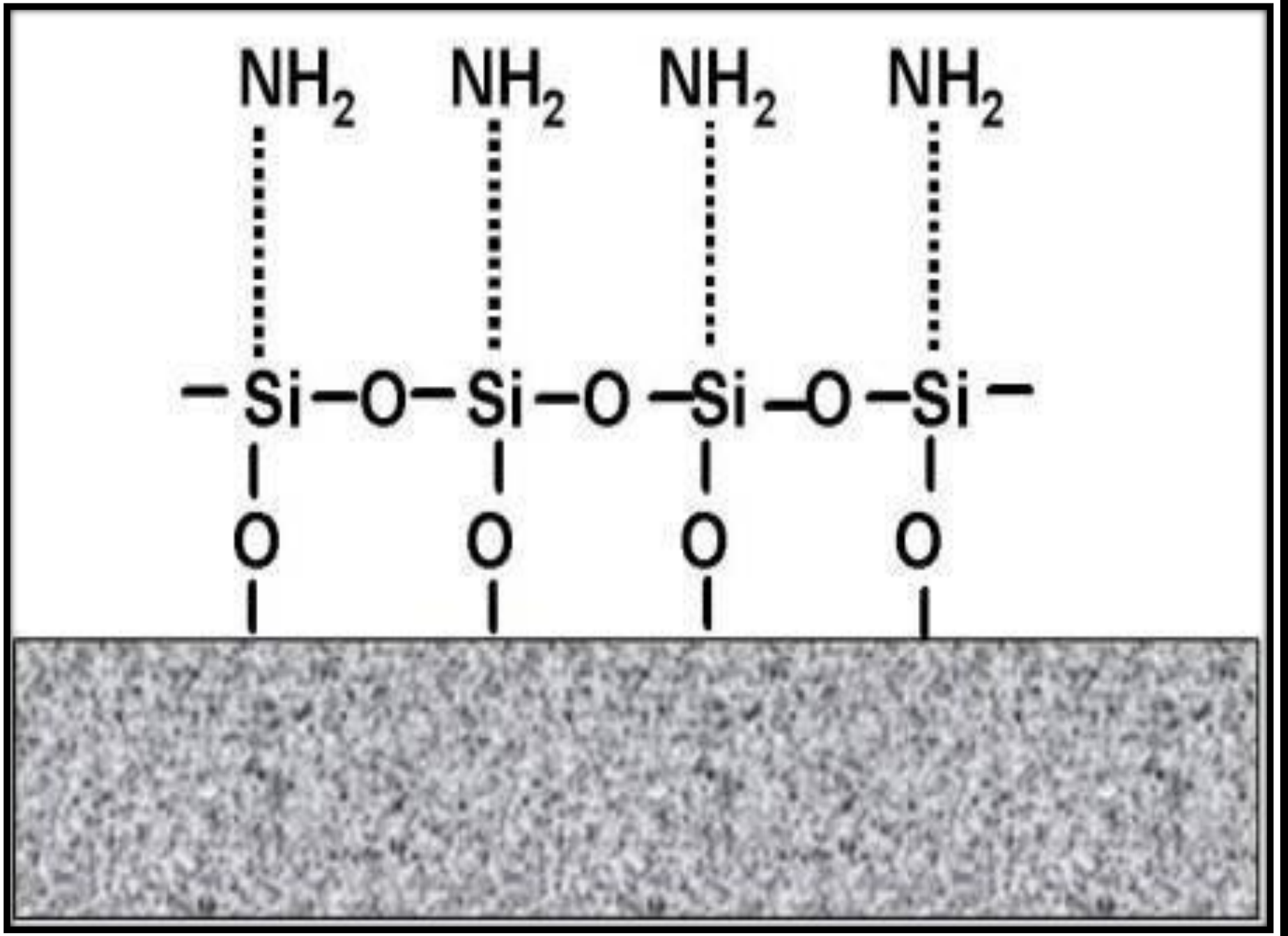
- **Hydrogen bonding**

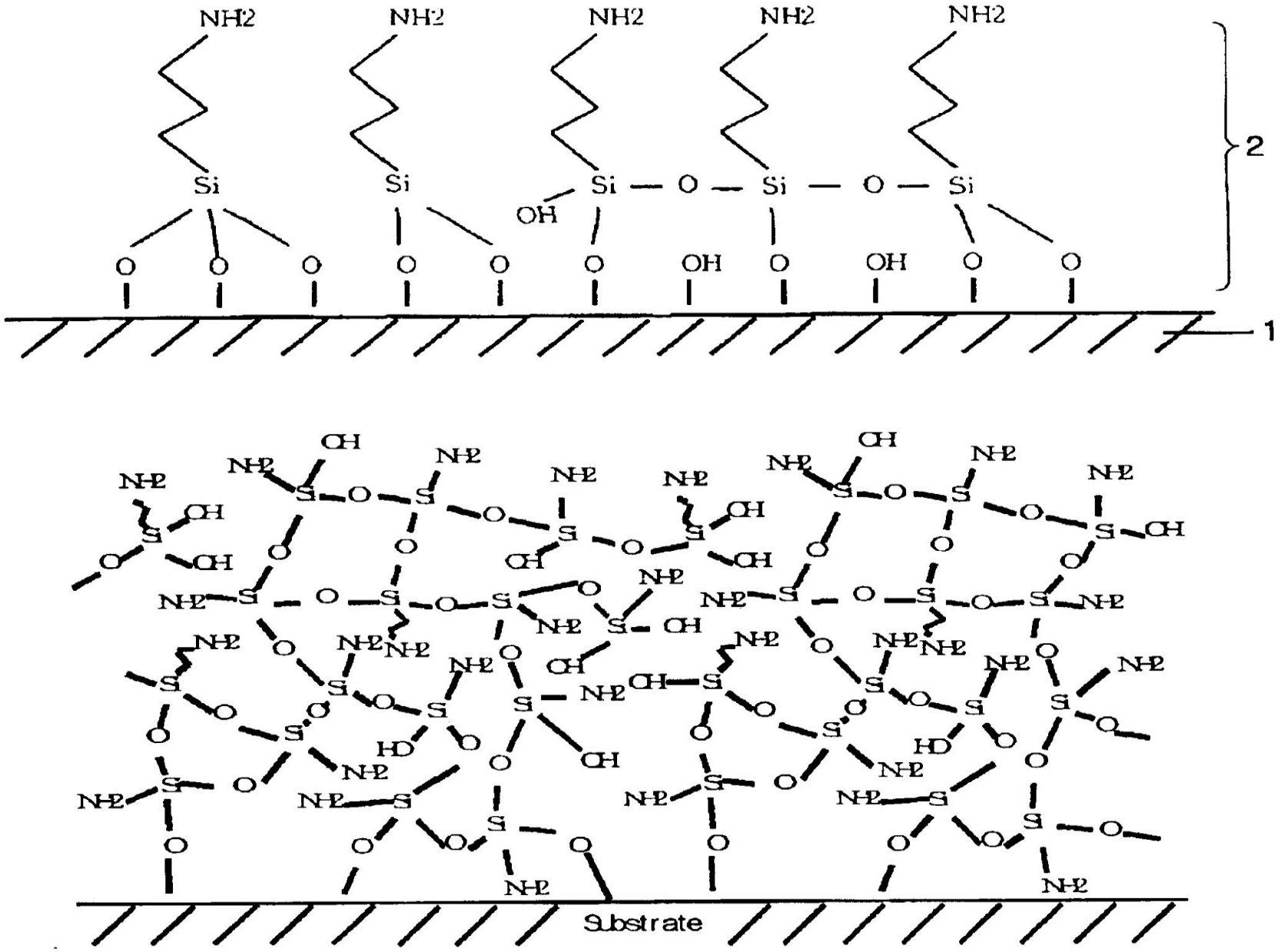
- **Hydrophobic interaction**

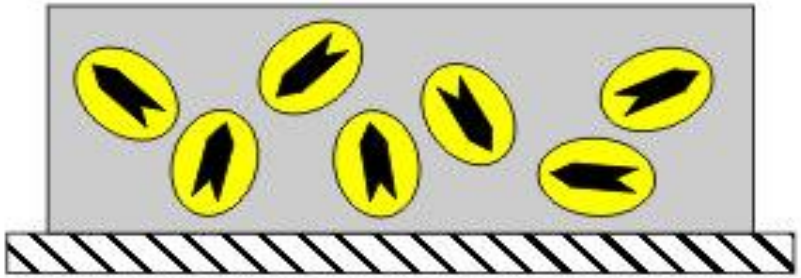
- **Van der waals forces**

الروابط الالكتروستاتيكية - الروابط الهيدروجينية - رابطة عدم الذوبان - وقوى فان دير فالس . وهى ضعيفة وبالتالى فان اى حدوث تغير فى الوسط سوف ينتج عنة عدم الادمصاص

Desorption

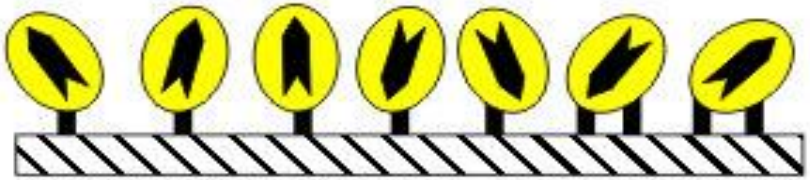

NH2
NH2
NH2
NH2
Si
O
Si
O
Si
O
Si
O
O
O
O
O


NH2
Si
O
OH
2
1
Substrate

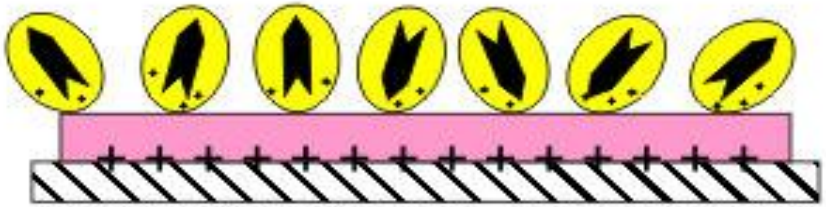


Polymer entrapment

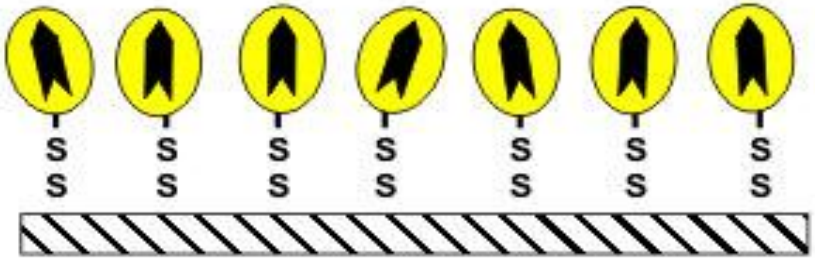
Surface adsorption



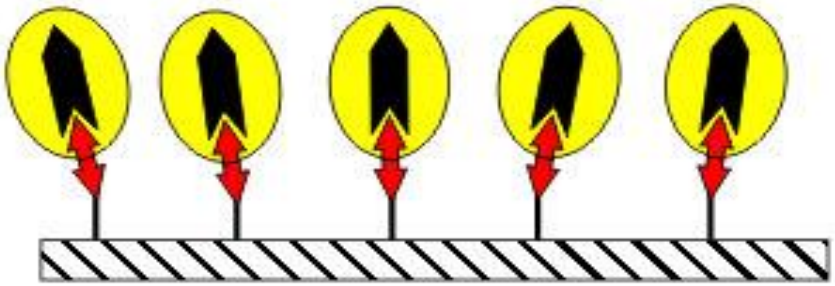
Covalent binding
(non-directional)



Electrostatic



Defined covalent
binding



Biospecific interaction
(e.g., biotin-avidin)

بعض المجالات التطبيقية لهذا النظام

- ادمصاص الانزيمات الصناعية على سطح الزجاج .
- ادمصاص الخلايا على الراتنجات Resins ذات التبادل الايونى
- الاستخدامات الطبية فى الدورة الدموية .
- ادمصاص انزيم الانفرتيز على اسطح المواد الصلبة .

المميزات والعيوب لطريقة التحميل بالادمصاص

Advantages and Disadvantages of Adsorption

من المزايا لهذة الطريقة

1) Simple

2) Economical

انها بسيط وسهلة فى الاجراء حيث يتم خلط الانزيم مع مادة السبورت (الدعامة) تحت الظروف المناسبة والتحضين لمدة محددة ثم تفصل المادة الغير ذائبة من المحلول بالترشيح ، الطرد المركزى . ومن ناحية اخرى فهى اقتصادية لامكانية اعادة الاستخدام الانزيم المحمل لاكثر من مرة .

بينما عيوب التحميل بالادمصاص

Adsorption immobilizatin يمكن ذكرها فى النقاط التالية:-

1) Prosthetic group dissociation

انحلال المجموعة الاضافية المرتبطة بالانزيم حيث يقف عمل الانزيم نتيجة هدم هذة المجموعة .

2) Active site adsorption

من المحتمل حدوث ادمصاص على المركز الفعال للانزيم ولكن يمكن التغلب على ذلك بان تضاف المادة المتفاعلة اثناء اجراء عملية التحميل فتقوم بحماية المركزالفعال .

3) PH , ionic strength control

القوة الايونية ودرجة الحموضة يجب التحكم فيهم، طبيعة المذيب، درجة الحرارة حيث يتوقف نجاح تحميل الانزيمات بالادمصاص على هذة العوامل .

4)Loading Available sites - Diffusion

5) Time and temperature

6) Desorption

ومع ذلك يعتبر الادمصاص هو ارخص الانظمة وأكثرها انتشارا وافضلها وابسطها فى الاستخدام فى مجال التحميل ويعرف ايضا بالادمصاص الطبيعى **Physical Adsorption** نظرا لان الارتباط بين الانزيم والمادة الحاملة **Support** من النوع الطبيعى.

تحميل الإنزيمات بالإدمصاص على الدعامات الصلبة Solid Supports

من الدعامات الصلبة المستخدمة هى الرمل - اكسيد الحديد المغناطيسى F_3O_4 -السيلكا - كريات الزجاج - الفحم المنشط - البولى استيرين - السيليلوز- الالومينا - الكربوكسى مثيل سليلوز- رقائق الكولاجين -والبوليمرات الفينولية ومواد التبادل الايونى . ويجب تنشيط هذة الدعامات قبل استخدامها للتحميل .

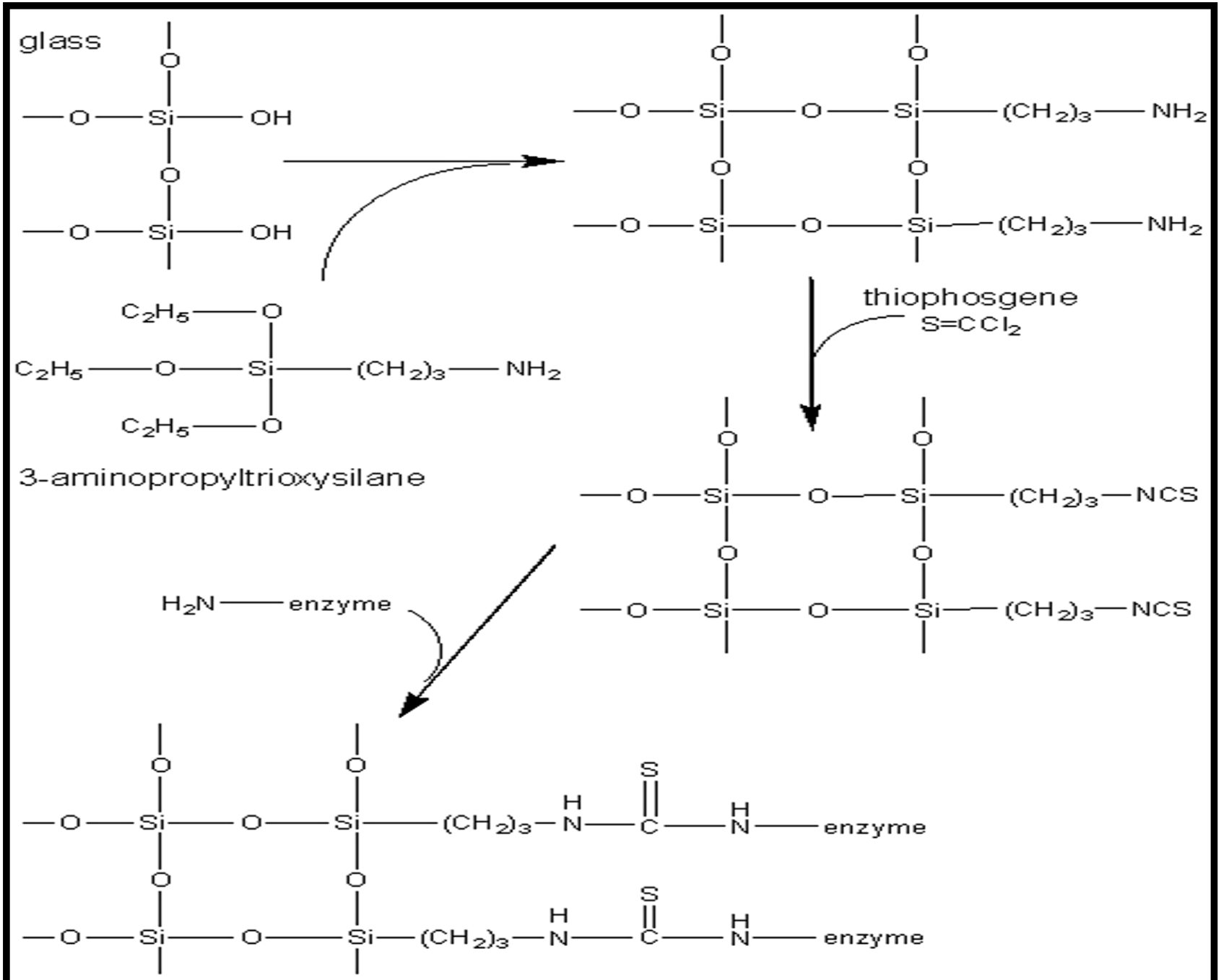
عمليات التنشيط لبعض الدعامات وعملية التحميل .

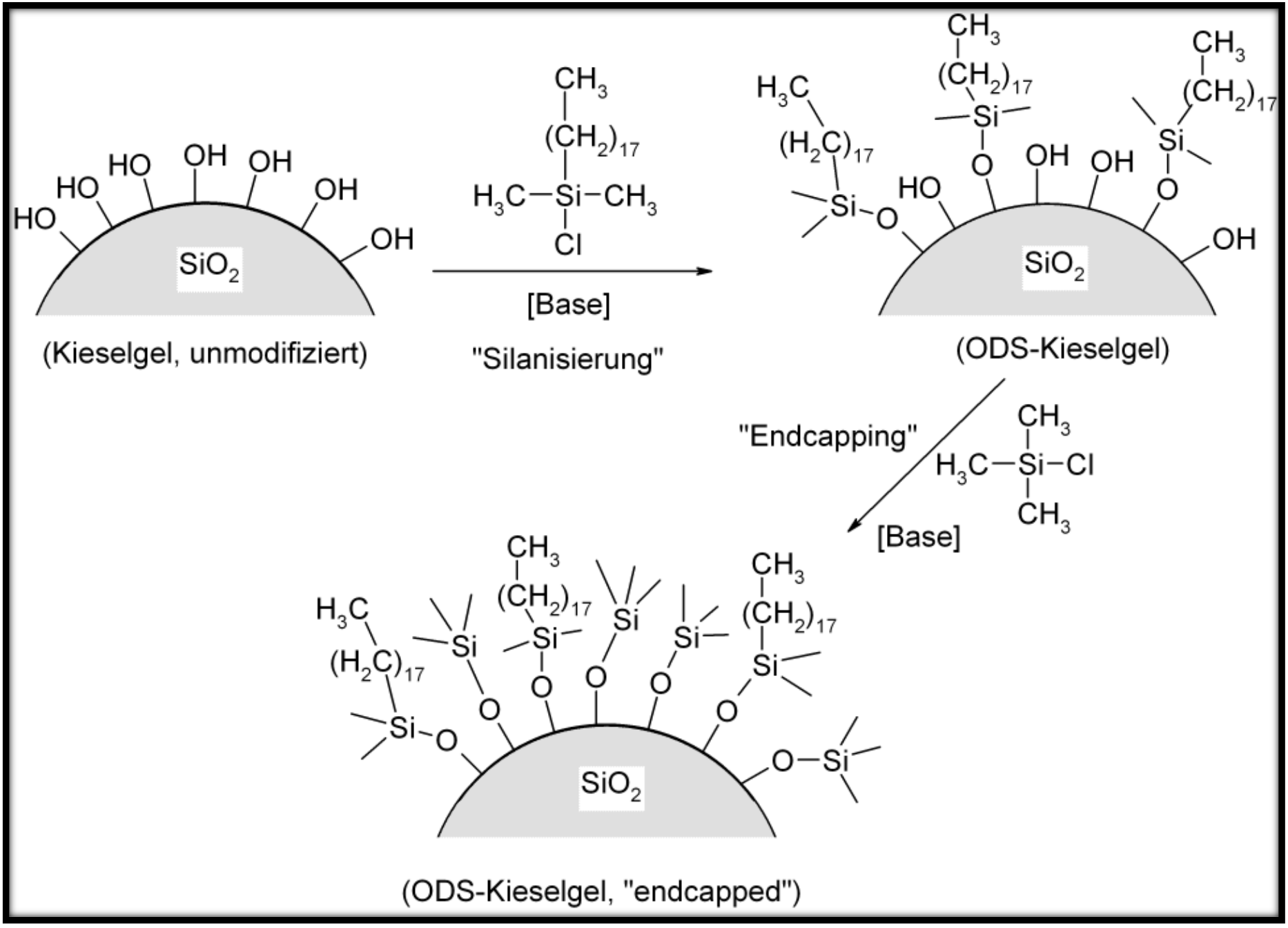
(١) تنشيط الرمل مع ٣-امينوبروبيل تراى ايثوكسى سيلان

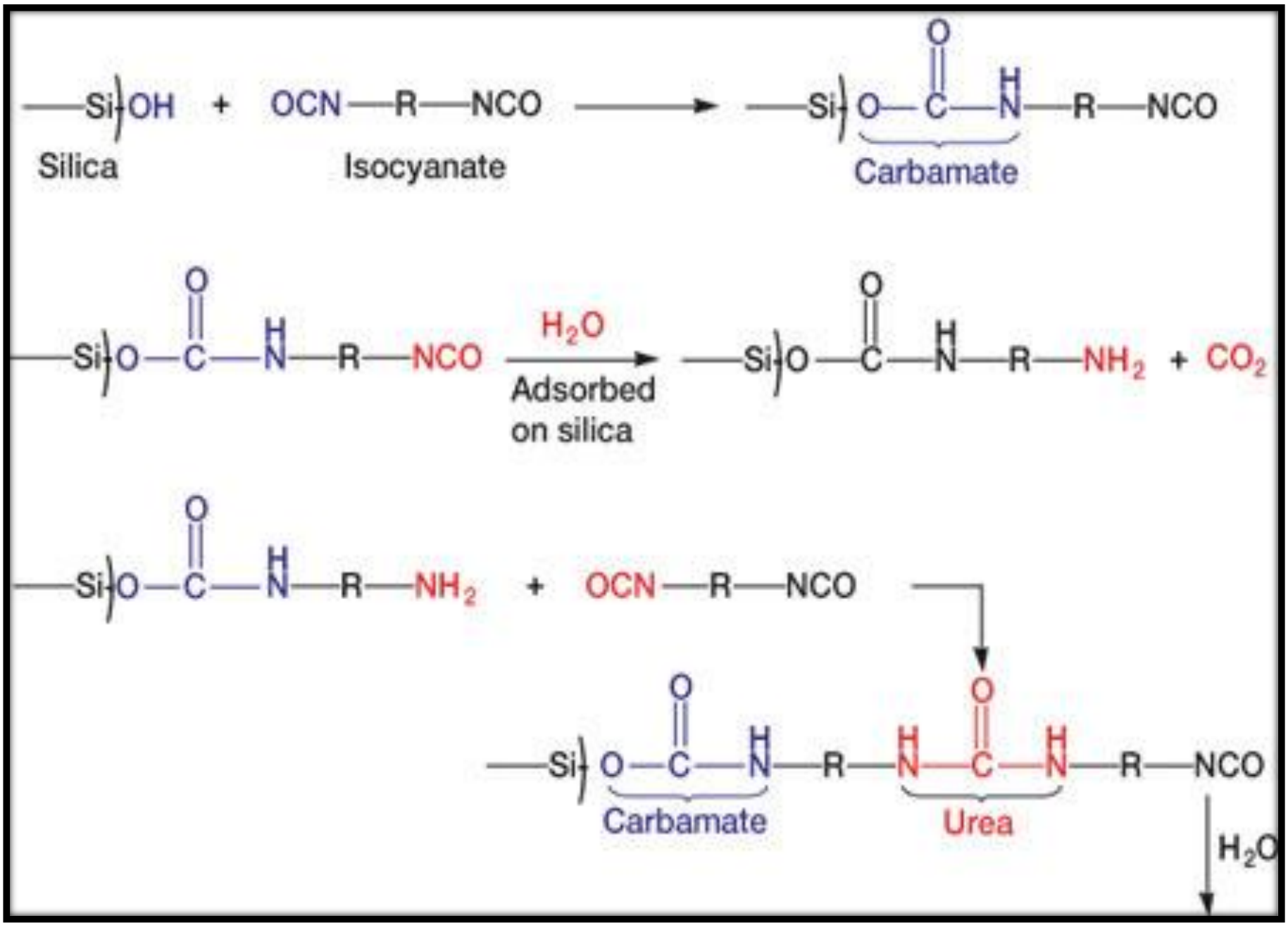
3-Aminopropyltriethoxy silane (ATS)

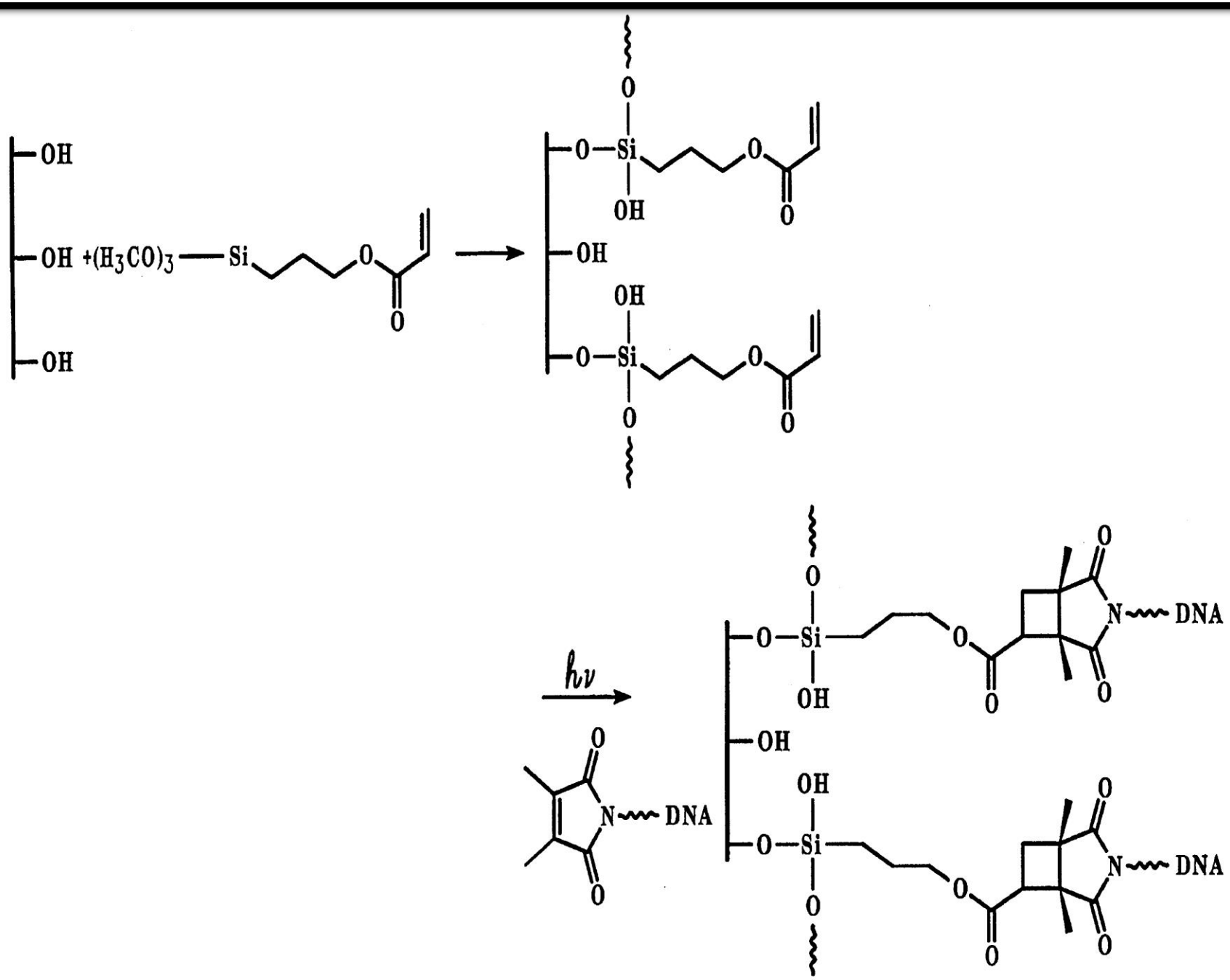
الذى يحتوى على السيلكون حيث يمكنة عمل او تكوين اوضاع مخلبية مع مجاميع الايدروكسيل الحرة على سطح الرمل ويتكون مايعرف بالكيل أمين ساند **Alkylamine Sand** .

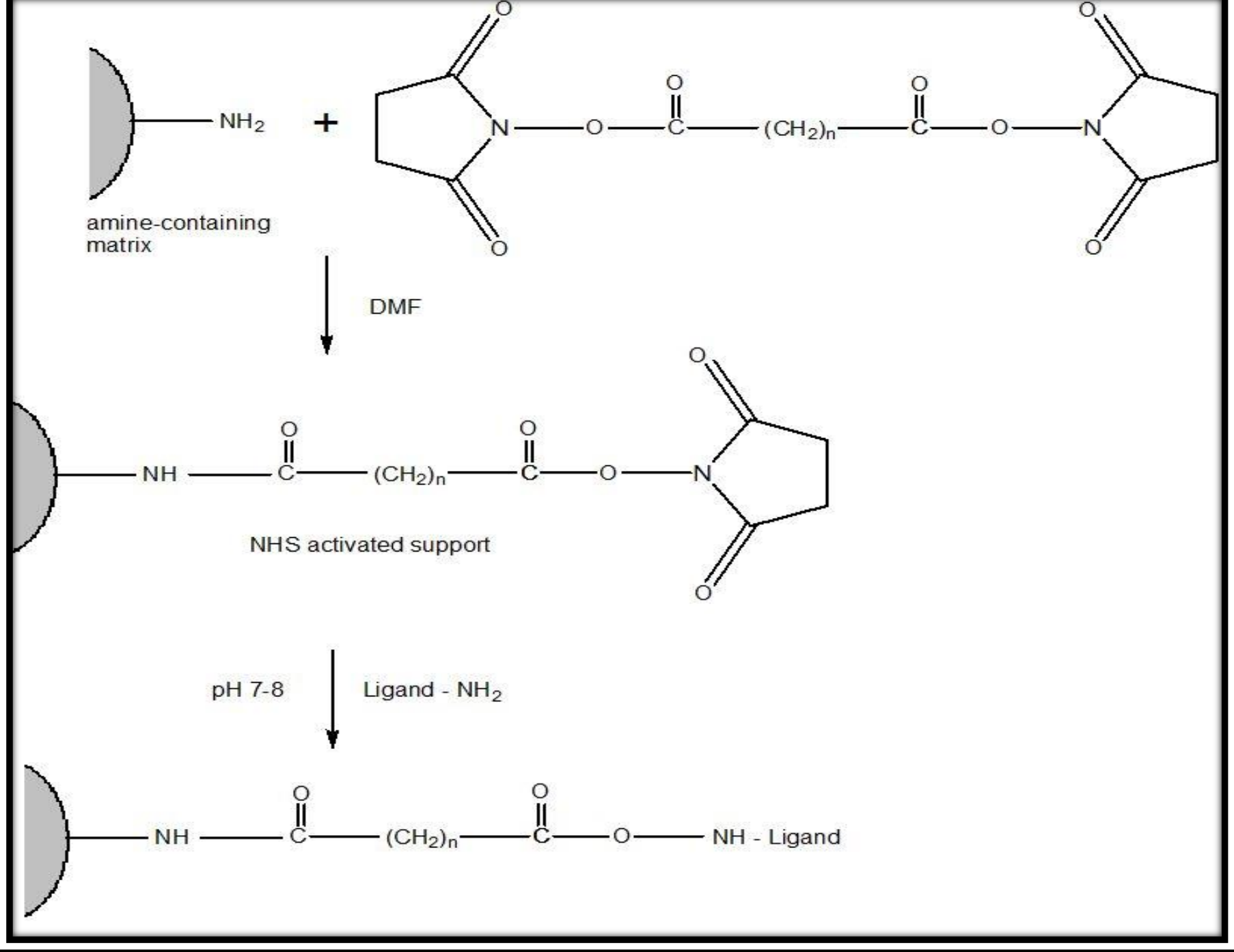
- يتم ارتباط الانزيم مع الرمل المنشط وفى وجود مادة الجلوتالرديهيد كمادة رابطة (لعمل قنطرة بين الدعامة والانزيم التى تسمى بالذراع) ويجب اضافة المادة المتفاعلة اثناء عملية التحميل وذلك لحماية المراكز الفعالة للانزيم .

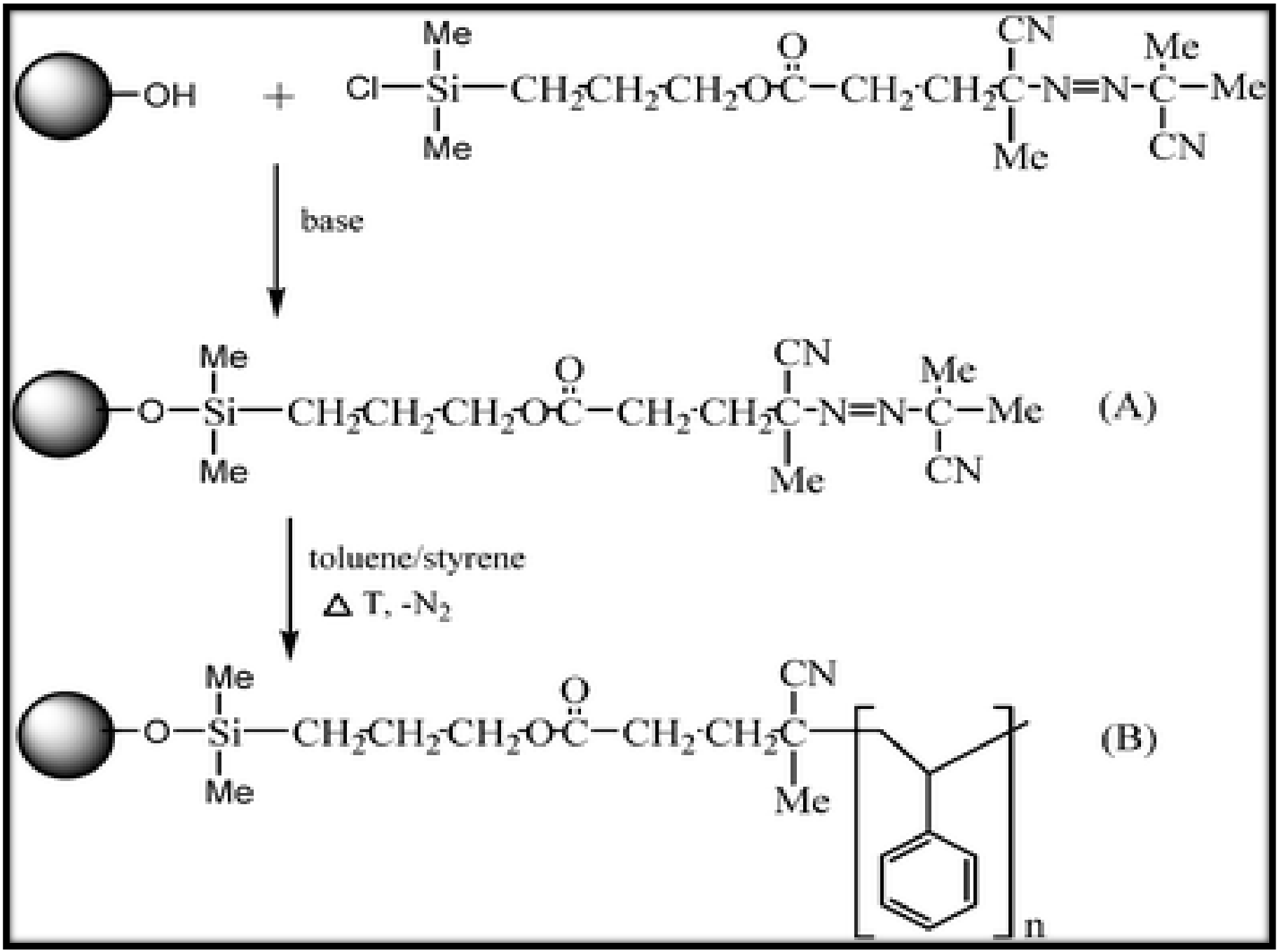

glass
3-aminopropyltrioxysilane
thiophosgene
S=CCl2
H2N enzyme

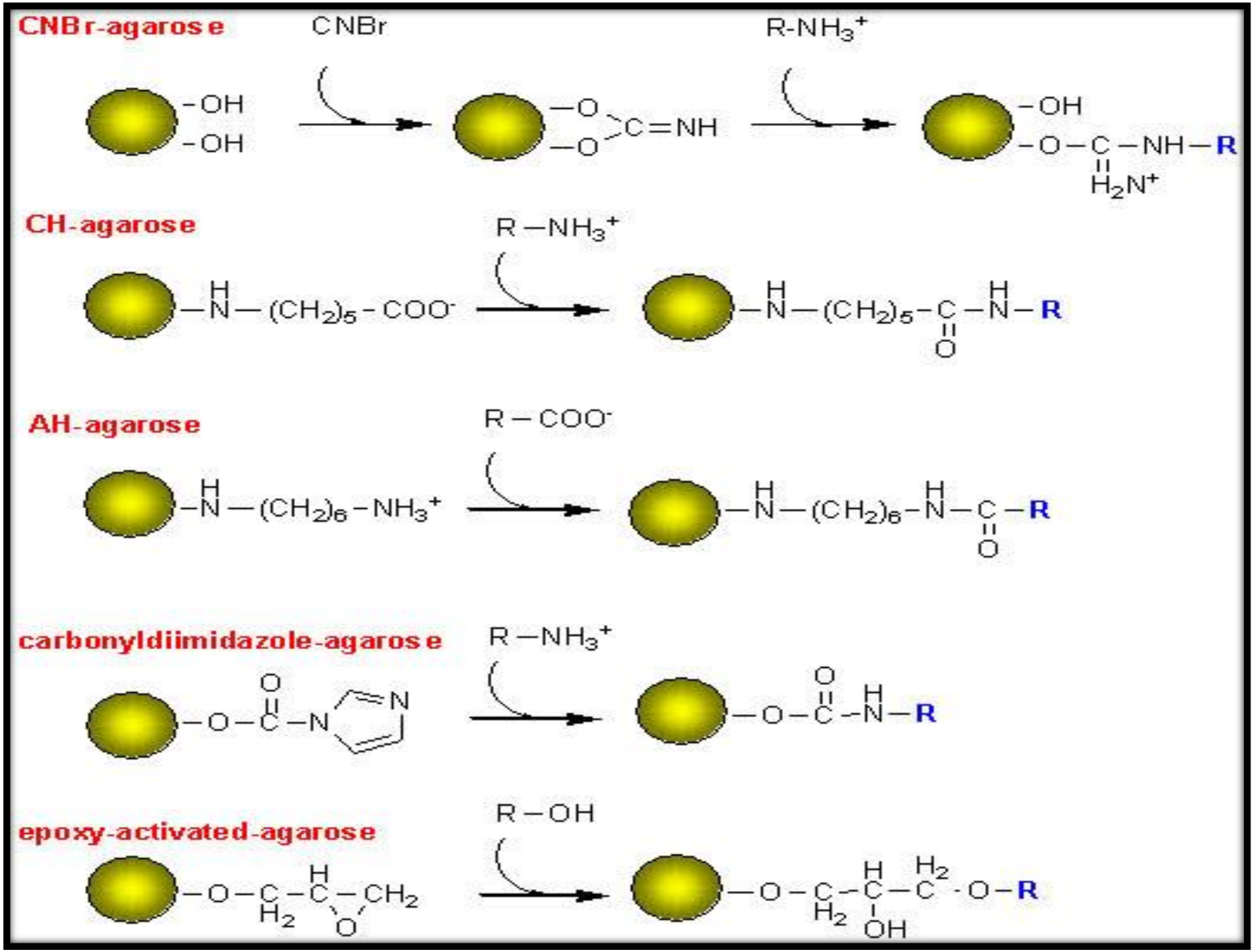

HO
HO
HO
OH
OH
OH
OH
SiO2
(Kieselgel, unmodifiziert)
CH3
(CH2)17
H3C—Si—CH3
Cl
[Base]
"Silanisierung"
H3C
(H2C)17
Si
O
HO
OH
OH
(ODS-Kieselgel)
"Endcapping"
[Base]
(ODS-Kieselgel, "endcapped")


Silica
Isocyanate
Carbamate
H_2O
Adsorbed on silica
CO_2
Carbamate
Urea
H_2O

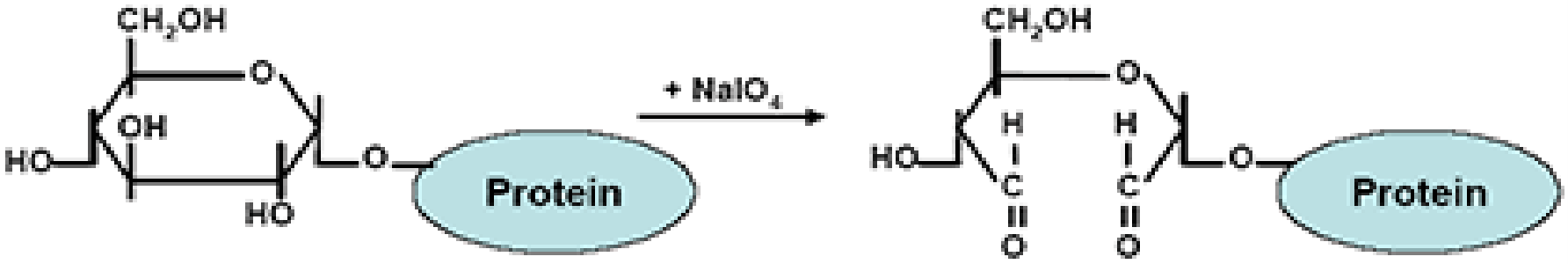

OH
OH
OH
+(H3CO)3
Si
O
O
Si
OH
O
O
OH
OH
O
Si
O
O
hν
N
DNA
O
O
O
Si
OH
O
O
N
DNA
OH
OH
O
Si
O
O
O
N
DNA


NH2
+
O
N
O
C
(CH2)n
C
O
N
O
amine-containing
matrix
DMF
NH
C
(CH2)n
C
O
N
NHS activated support
pH 7-8
Ligand - NH2
NH
C
(CH2)n
C
O
NH - Ligand

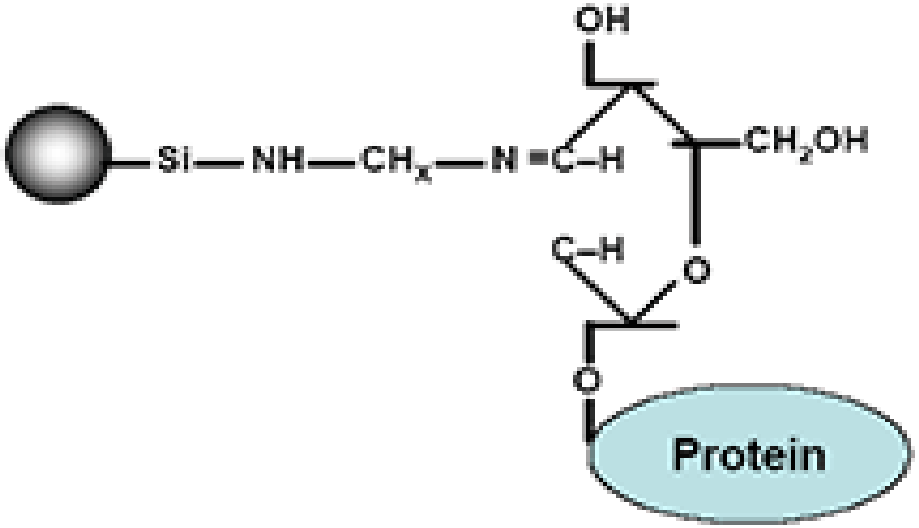

OH
Cl—Si(Me)(Me)—CH2CH2CH2O—C(=O)—CH2CH2—C(CN)(Me)—N=N—C(Me)(CN)—Me
base
O—Si(Me)(Me)—CH2CH2CH2O—C(=O)—CH2CH2—C(CN)(Me)—N=N—C(Me)(CN)—Me
(A)
toluene/styrene
Δ T, -N2
O—Si(Me)(Me)—CH2CH2CH2O—C(=O)—CH2CH2—C(CN)(Me)—
n
(B)


CNBr-agarose
CNBr
R-NH3+
CH-agarose
R—NH3+
AH-agarose
R—COO-
carbonyldiimidazole-agarose
R—NH3+
epoxy-activated-agarose
R—OH

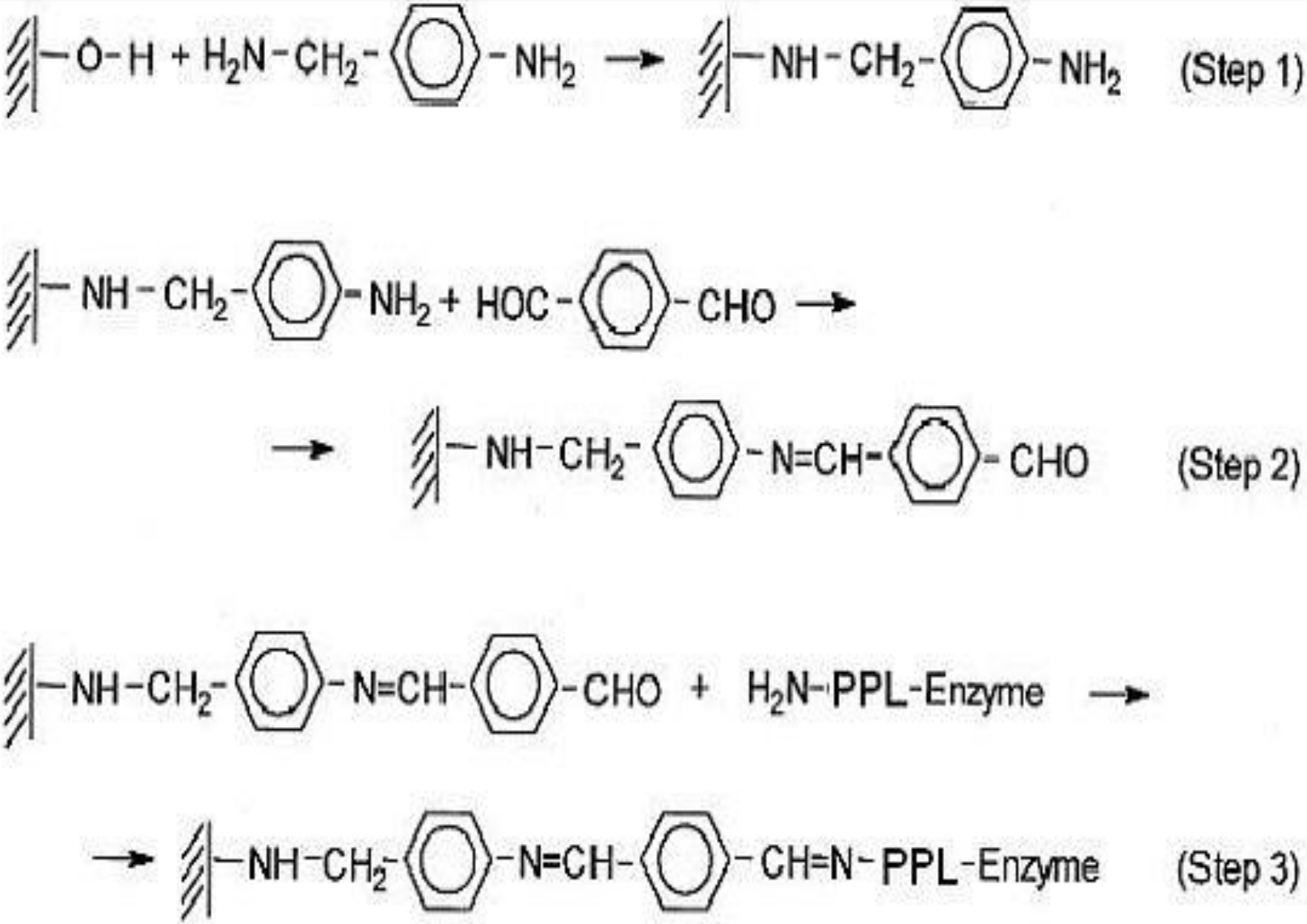
Oxidation of carbohydrate residues

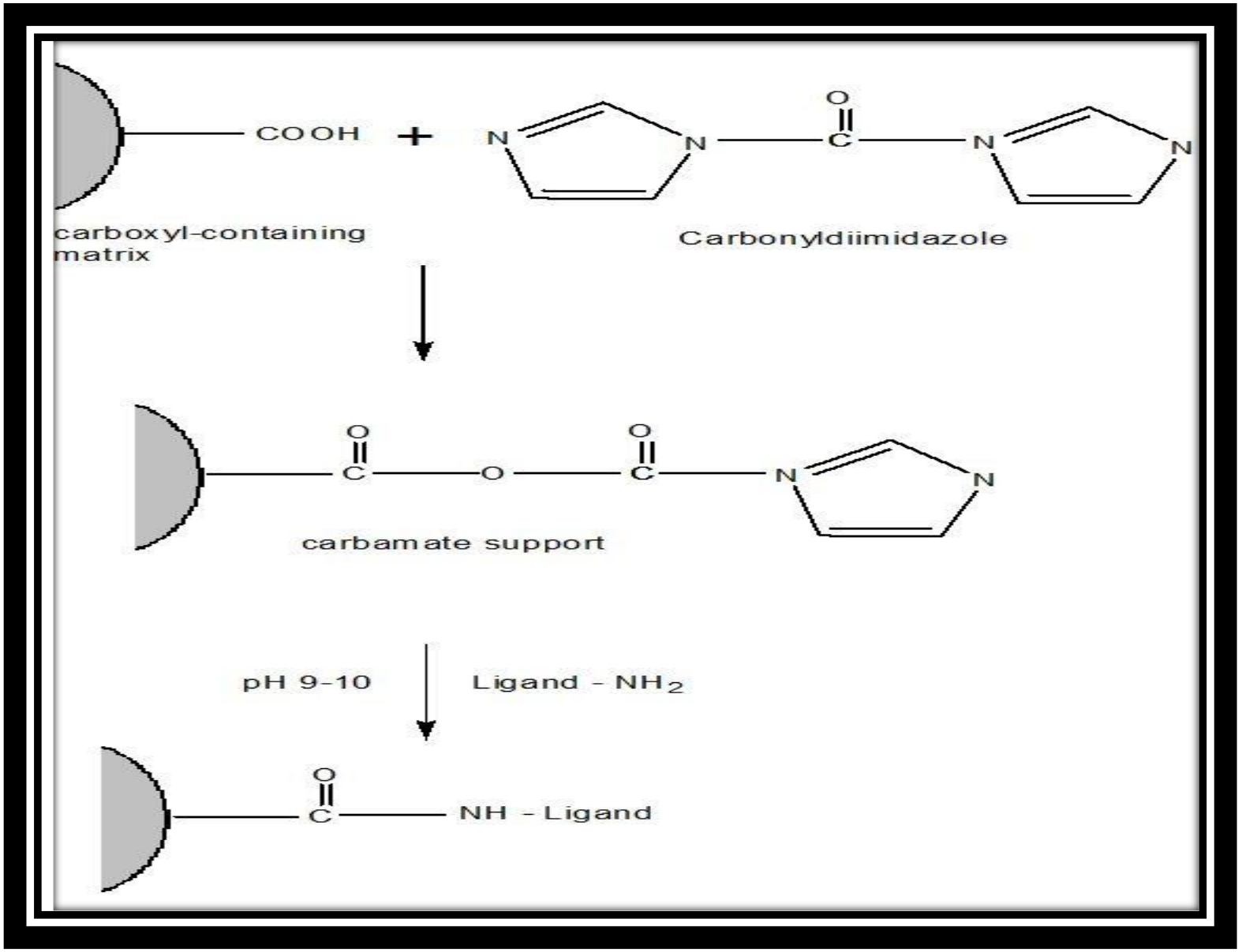


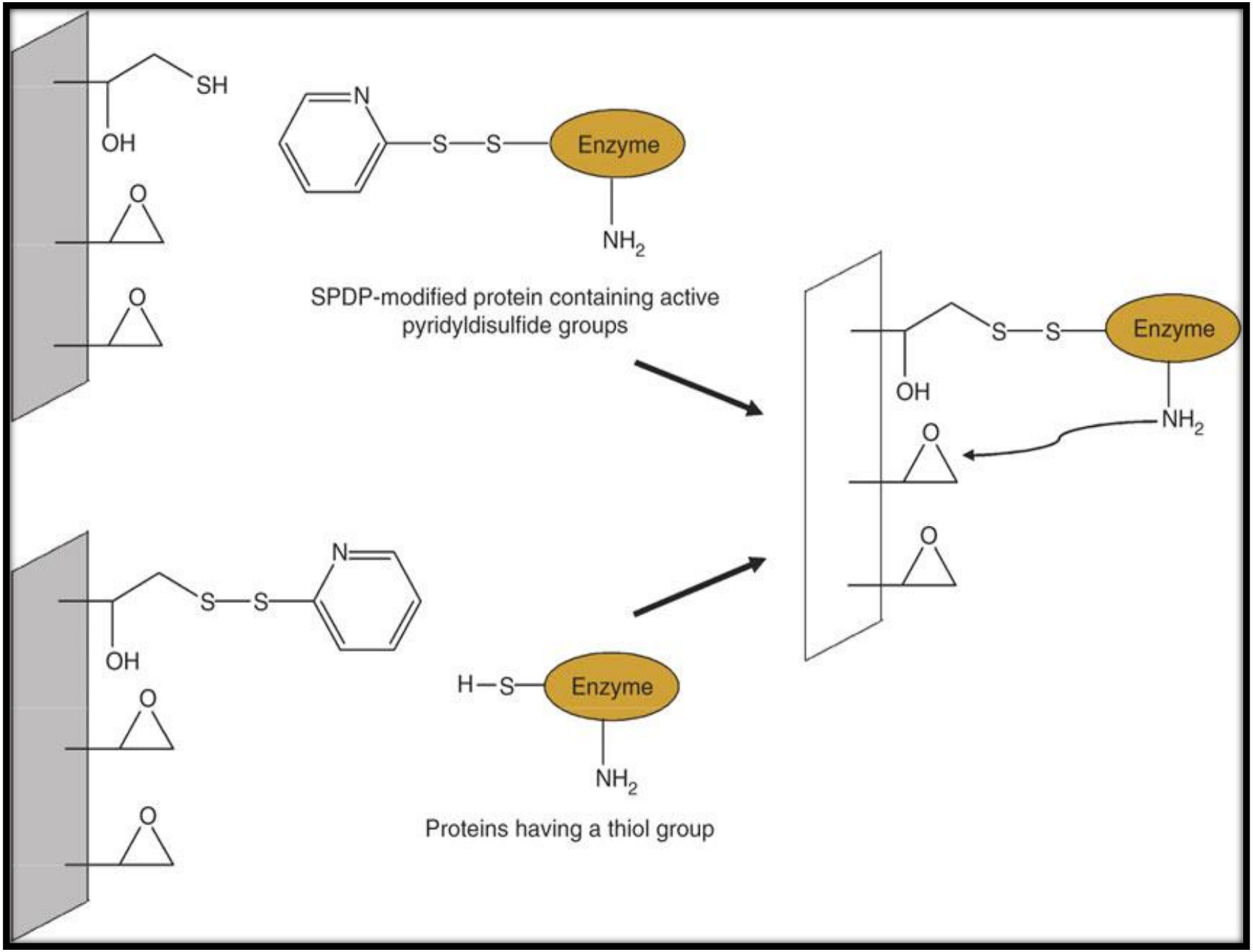
Forming of aldehyde-groups

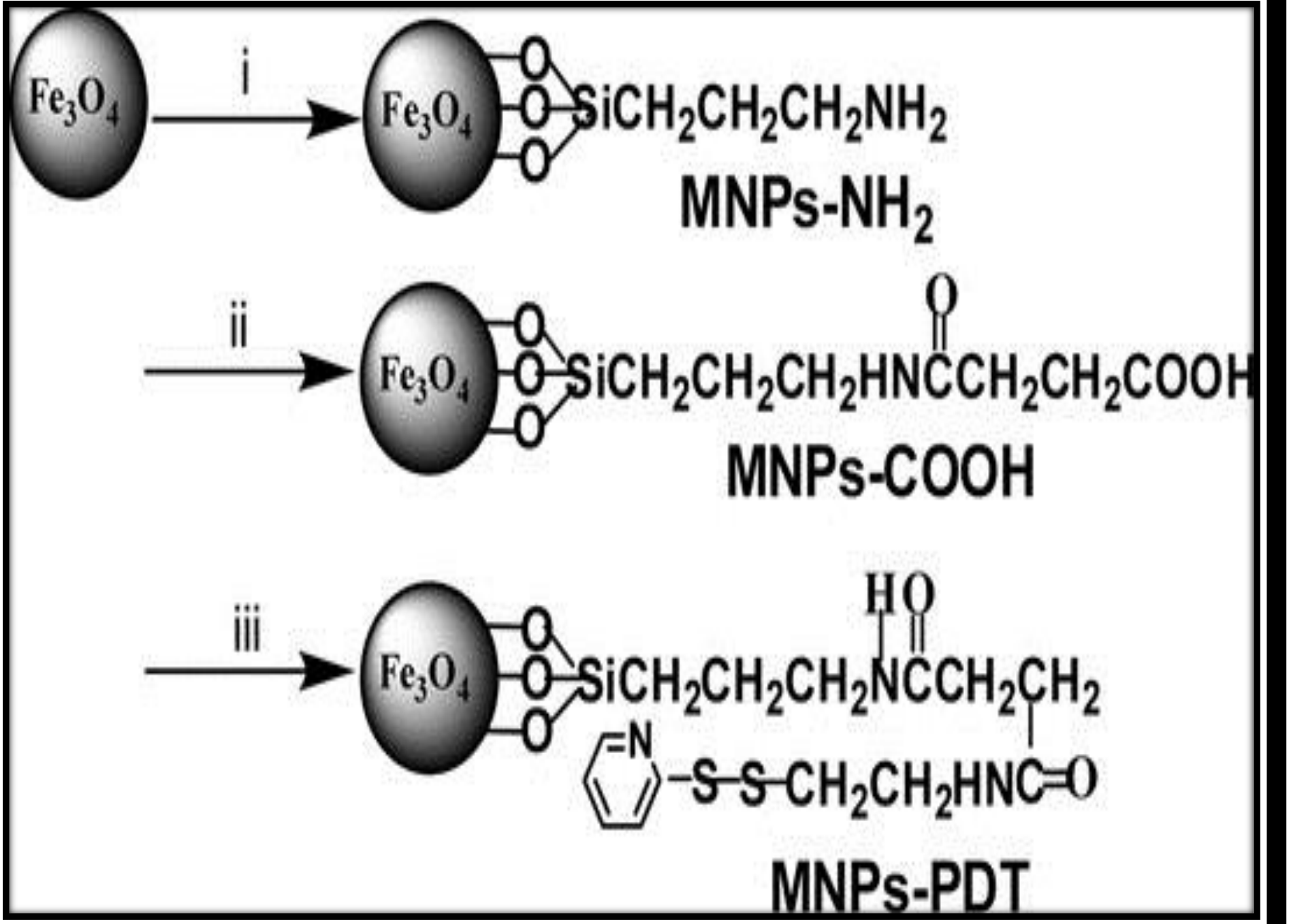


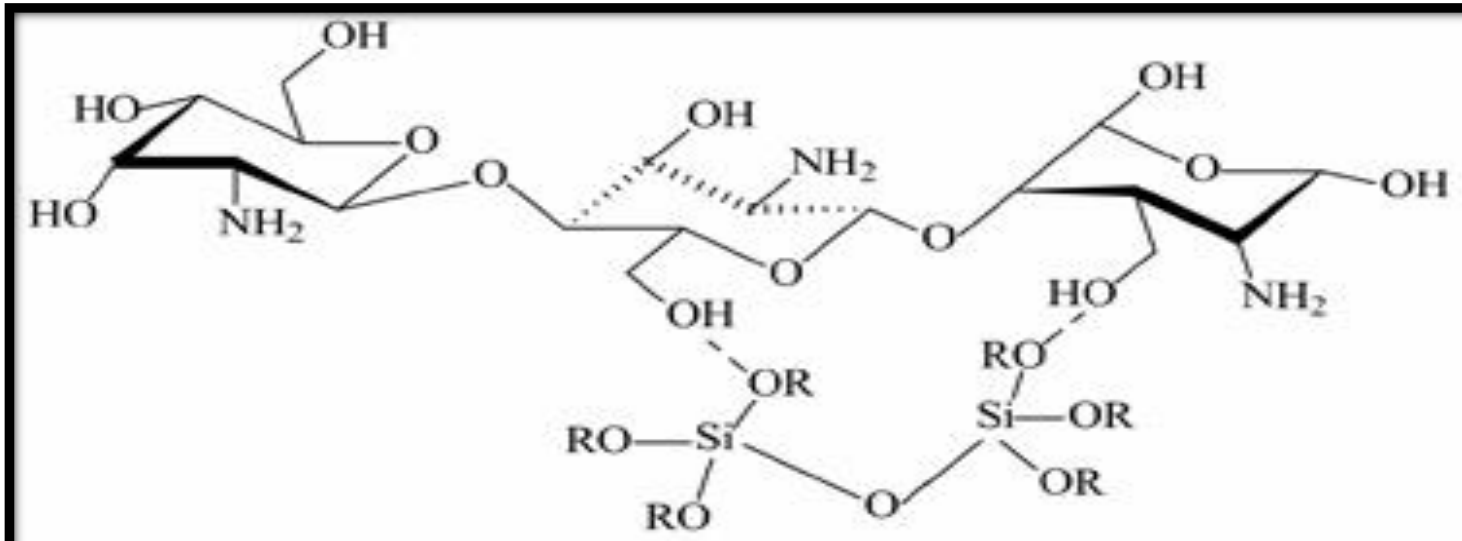
Site-directed immobilization
through carbohydrates


(Step 1)
(Step 2)
(Step 3)

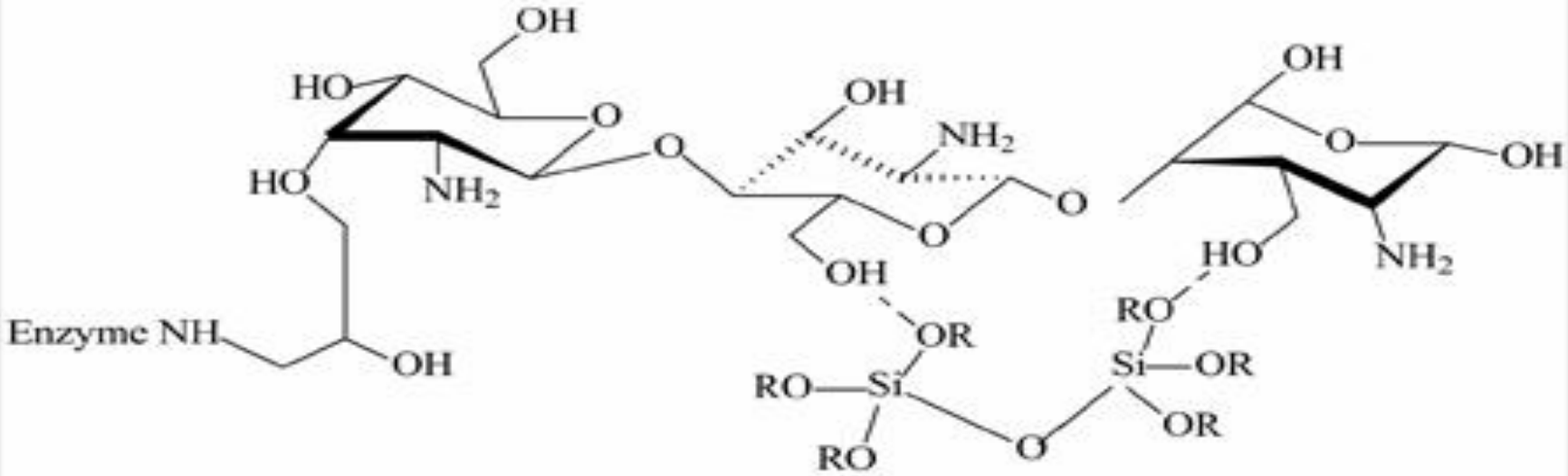

COOH
carboxyl-containing matrix
Carbonyldiimidazole
carbamate support
pH 9-10
Ligand - NH2
NH - Ligand


SH
OH
O
O
N
S
S
Enzyme
NH2
SPDP-modified protein containing active pyridyldisulfide groups
S
S
Enzyme
OH
NH2
O
O
N
S
S
OH
O
O
H
S
Enzyme
NH2
Proteins having a thiol group

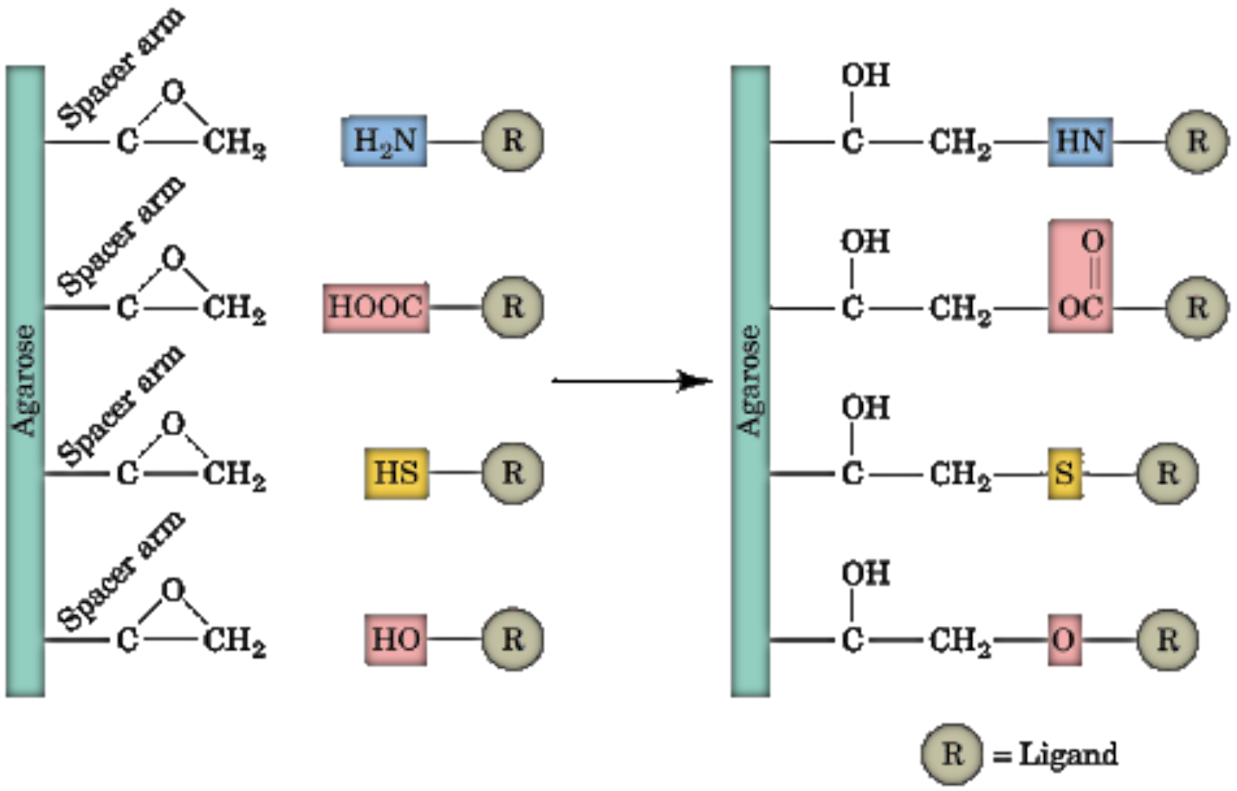

Fe3O4
i
Fe3O4
SiCH2CH2CH2NH2
MNPs-NH2
ii
Fe3O4
SiCH2CH2CH2HNCCH2CH2COOH
MNPs-COOH
iii
Fe3O4
HO
SiCH2CH2CH2NCCH2CH2
=N
S S CH2CH2HNC=O
MNPs-PDT



SiO_2-chitosan hybrid matrix



Enzyme immobilized onto epoxy SiO_2-chitosan



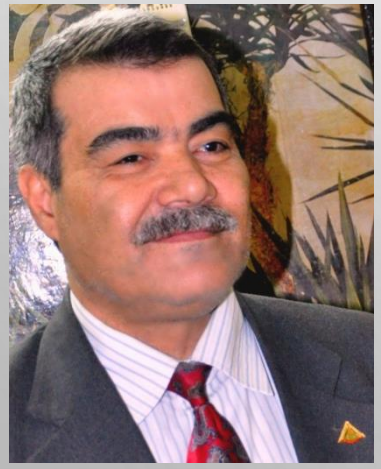
Derivatization of epoxy-activated agarose

محاضرات كيمياء الأنزيمات وتحميلها

المستوي الثالث (البيوتكنولوجي)

المحاضرة التاسعة

اعداد



أ.د/ فرحات فودة علي فودة

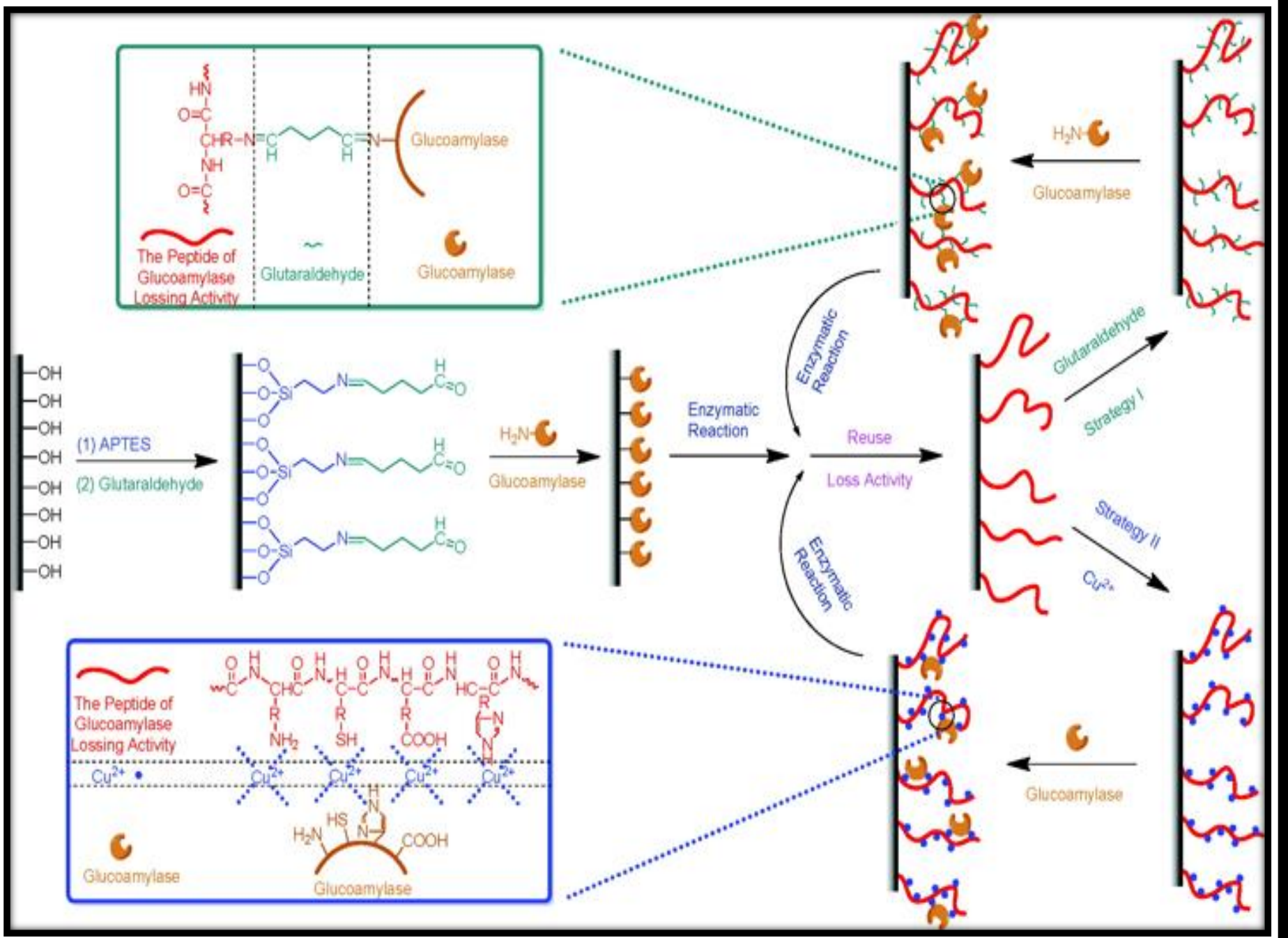
أستاذ الكيمياء الحيوية

٢- تنشيط (تعديل) سطح المواد الحاملة الصلبة

Modification of the Surface of the solid upports

ومن امثلة ذلك السيليكا جل والمونتومونوليت - ك ١٠ وذلك بالارتباط التساهمى مع مجاميع الامين . حيث يتم اولا معاملة **silica gel** بواسطة **3-aminopropyltriethoxy (silane APTS)** فى وجود الطولوين على درجة حرارة ٨٠ مئوى لمدة ٤٨ ساعة .

وتعرف هذة المعاملة من الناحية الكيميائية عملية السيللة Silanization ويتكون ٣- كلوروبروبيل تراى ايثوكسى سيلان الذى يتفاعل مع١-٦ داى امينو هكسان فى وجود الطولوين على درجة حرارة ٨٠ مئوى لمدة ٤٨ ساعة.


Glucoamylase
The Peptide of Glucoamylase Lossing Activity
Glutaraldehyde
Glucoamylase
(1) APTES
(2) Glutaraldehyde
Glucoamylase
Enzymatic Reaction
Reuse
Loss Activity
Enzymatic Reaction
Glutaraldehyde
Strategy I
Strategy II
Cu2+
Glucoamylase
The Peptide of Glucoamylase Lossing Activity
Cu2+
Glucoamylase
Glucoamylase

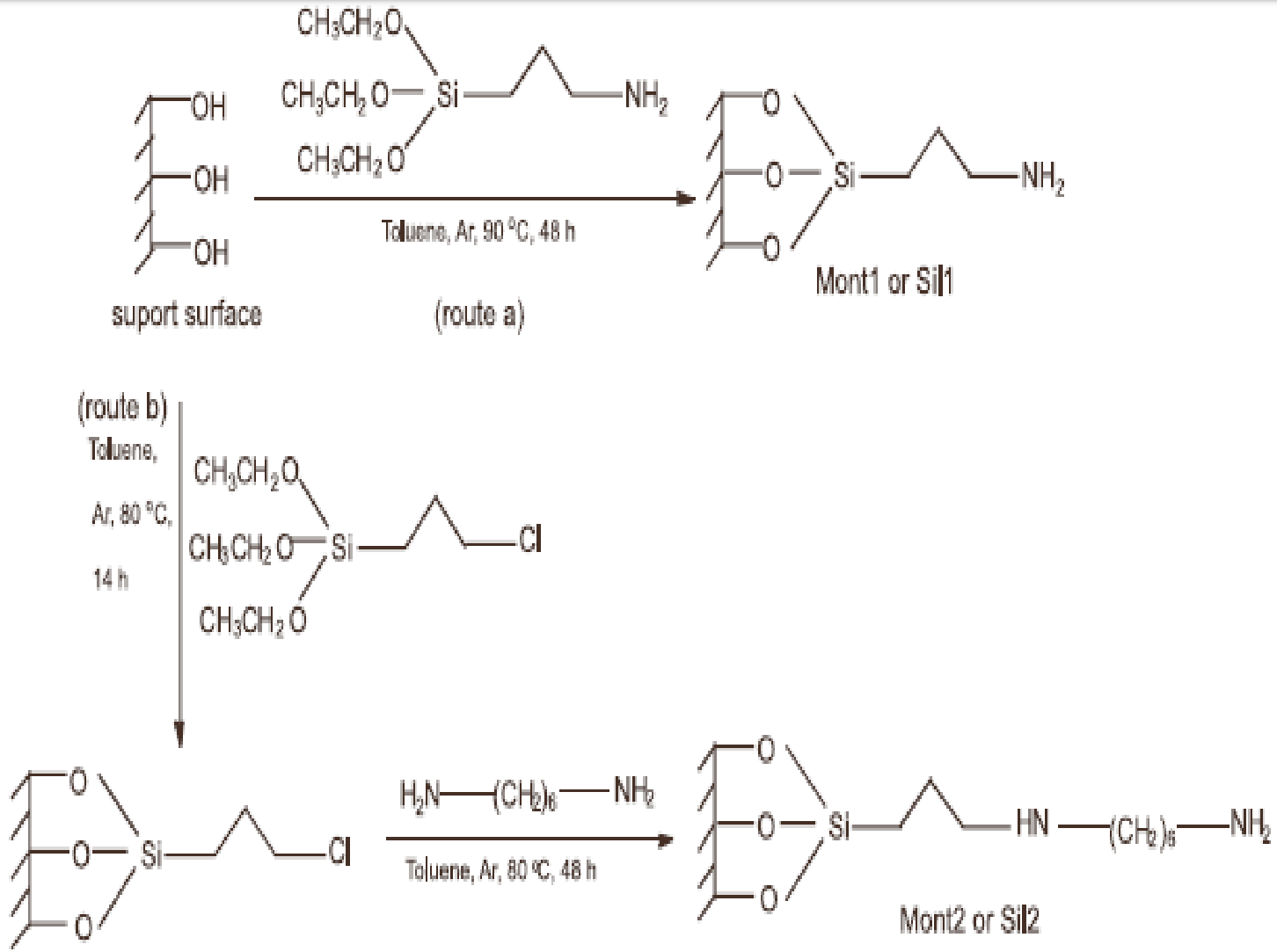
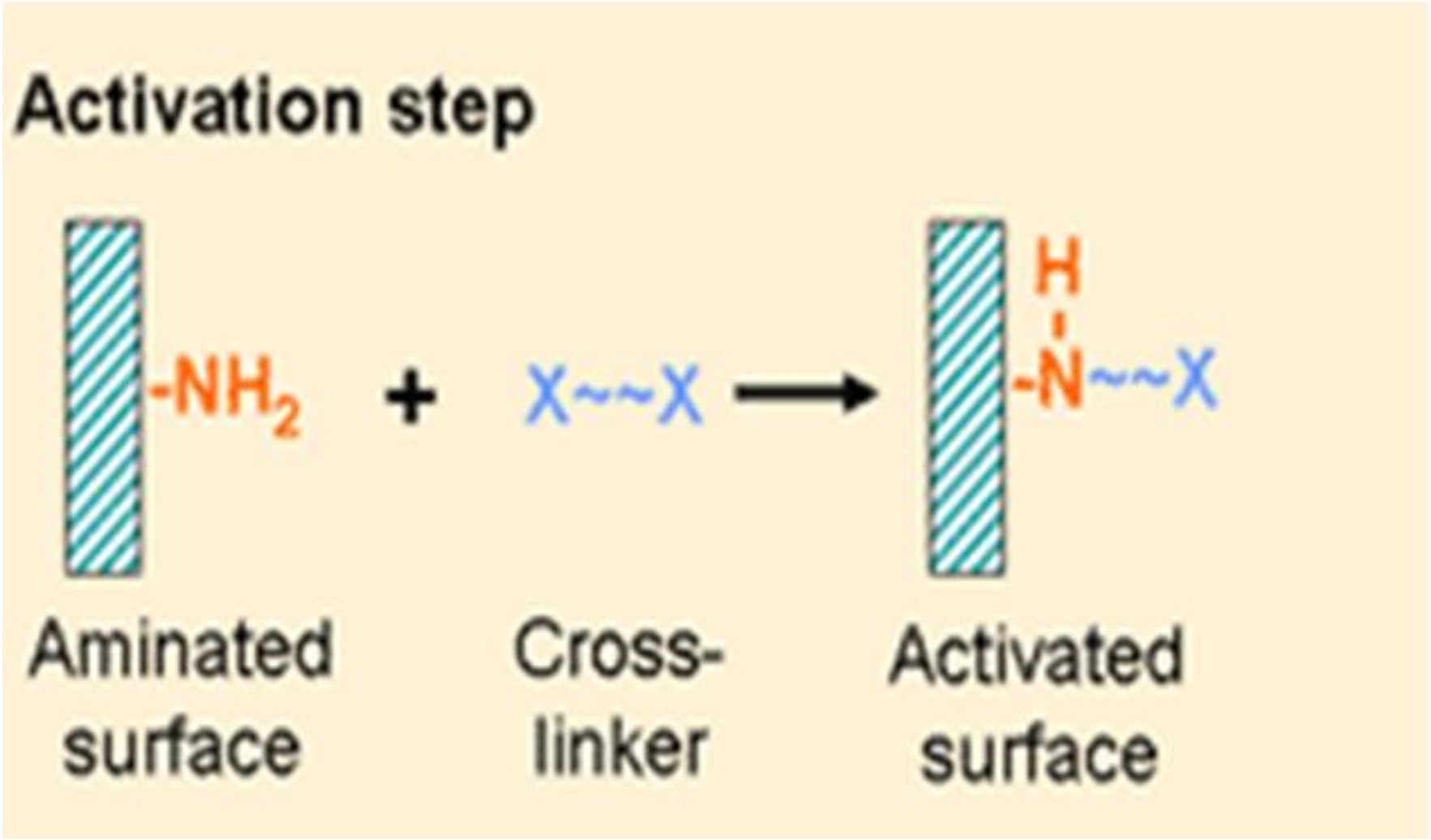
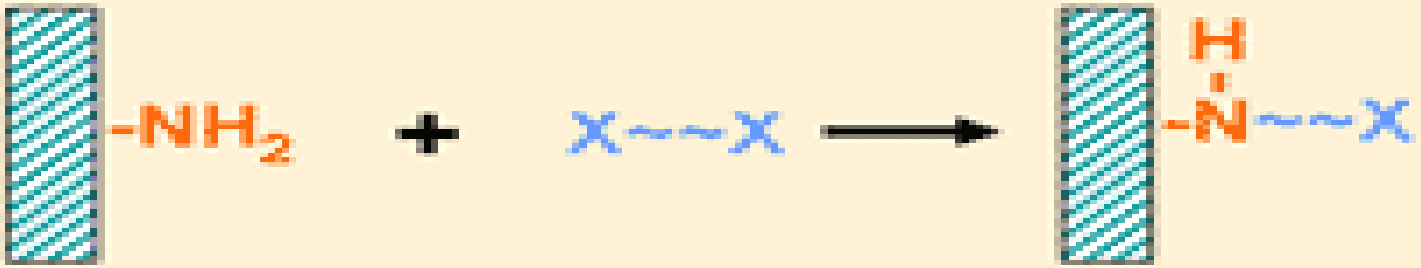


Figure 1. Modification of the surface of the solid supports, silica gel and montmorillonite-K10, by covalent binding of amino groups. Route a: modification with 3-aminopropyltriethoxysilane (Mont1 and Sil1). Route b: modification with 3-chloropropyltriethoxysilane, followed by reaction with 1,6-diaminohexane (Mont2 and Sil2).

٣- امثلة متعددة لعمليات التنشيط للمواد التى تستخدم فى تحميل الانزيمات



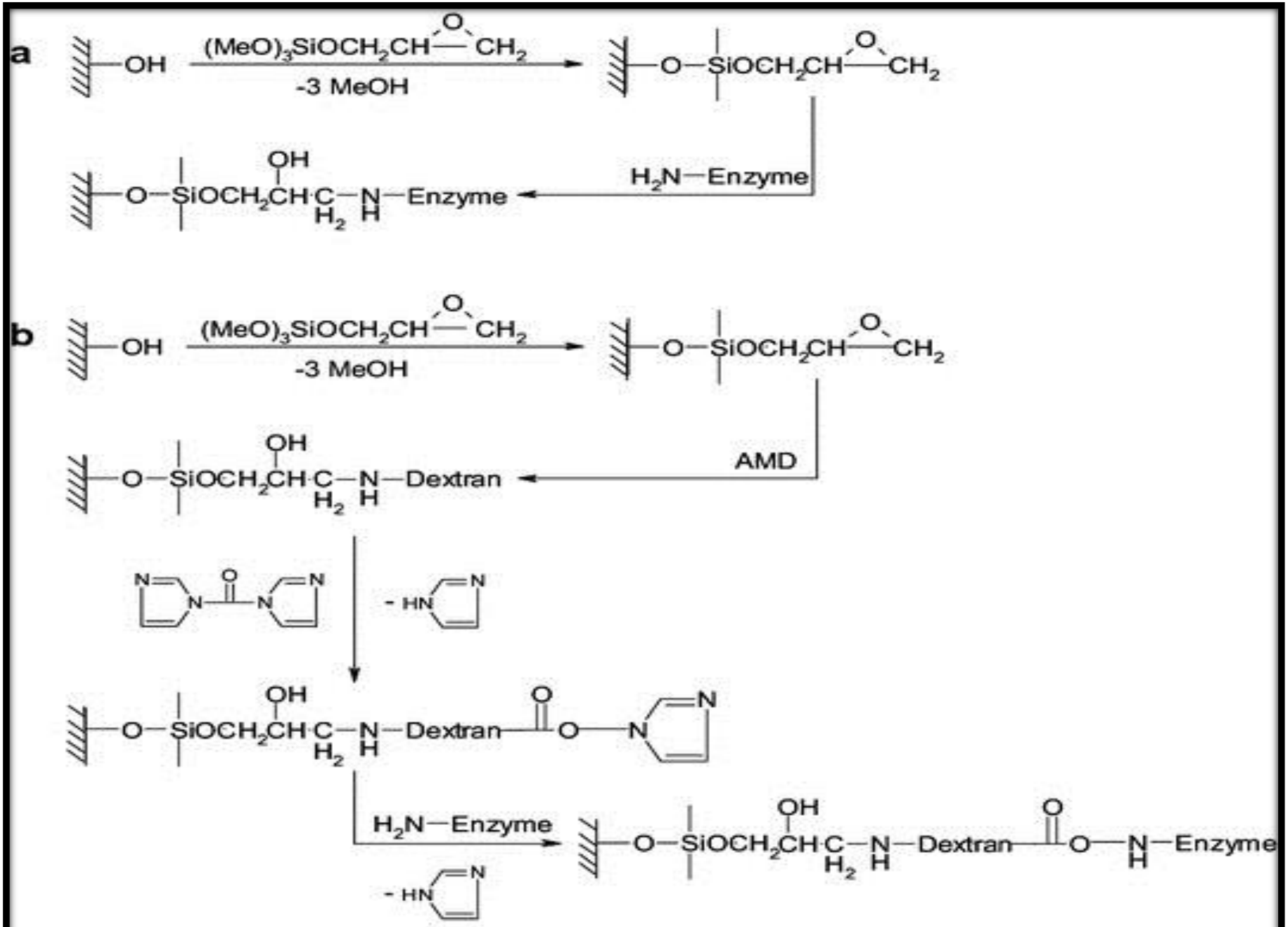
Activation step

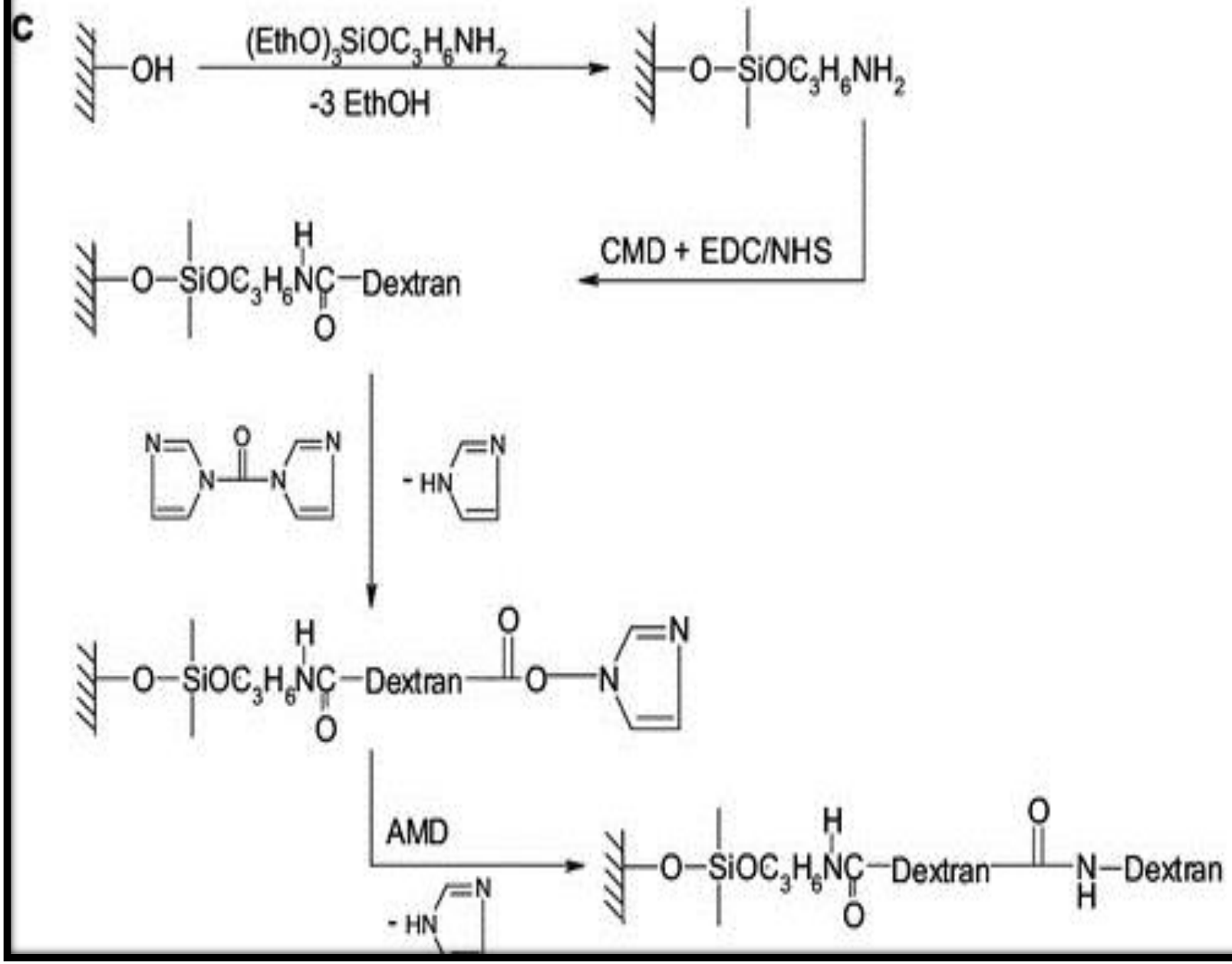


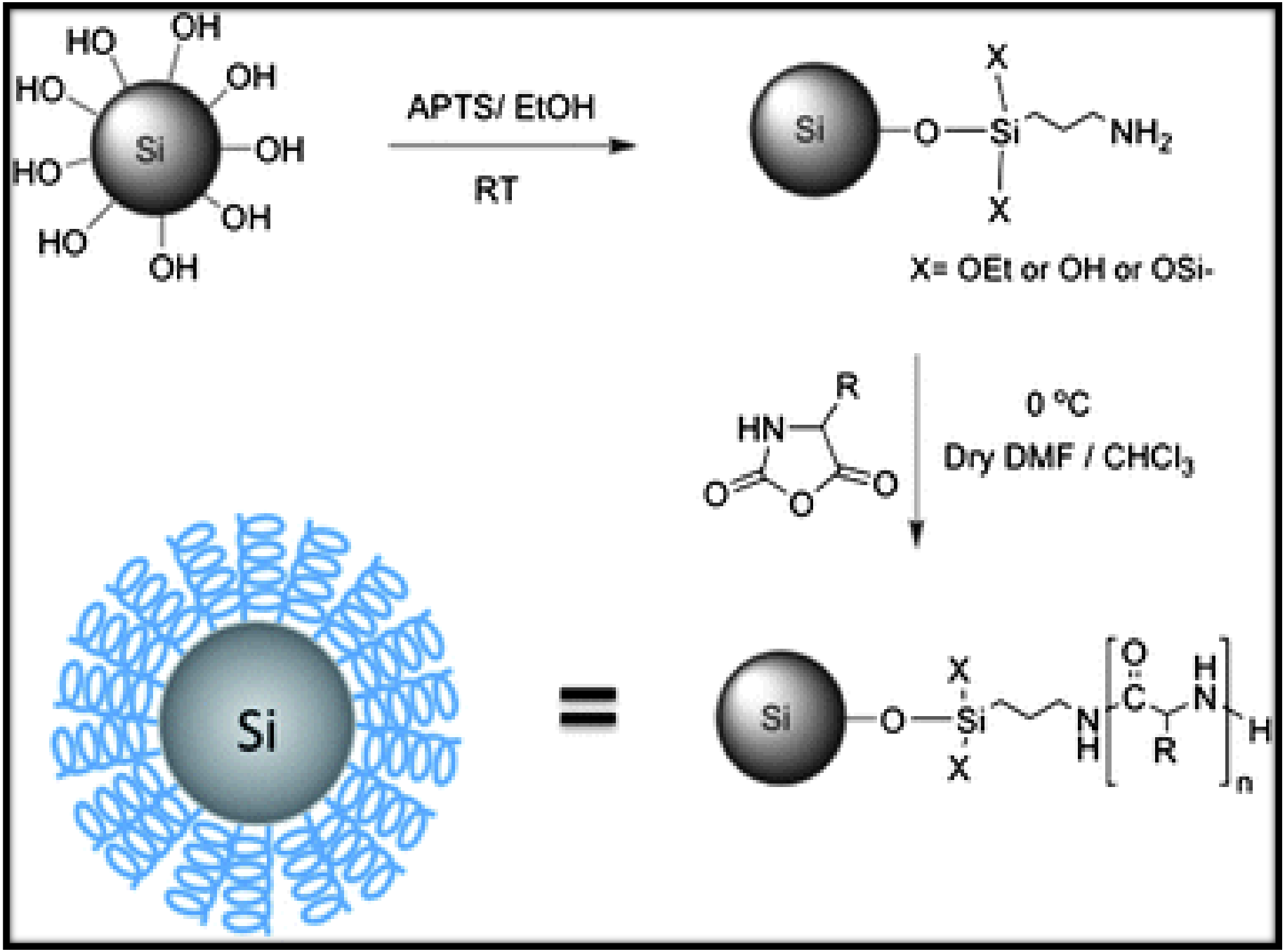
Aminated surface | Cross-linker | Activated surface

Immobilization step

Activated surface | Aminated biomolecule | Immobilization


a
OH
(MeO)3SiOCH2CH—CH2
-3 MeOH
O—SiOCH2CH—CH2
H2N—Enzyme
O—SiOCH2CH(OH)CH2—NH—Enzyme
b
OH
(MeO)3SiOCH2CH—CH2
-3 MeOH
O—SiOCH2CH—CH2
AMD
O—SiOCH2CH(OH)CH2—NH—Dextran
- HN
O—SiOCH2CH(OH)CH2—NH—Dextran—O—N
H2N—Enzyme
- HN
O—SiOCH2CH(OH)CH2—NH—Dextran—O—NH—Enzyme


C
OH
(EthO)3SiOC3H6NH2
-3 EthOH
O–SiOC3H6NH2
CMD + EDC/NHS
O–SiOC3H6NC–Dextran
H
O
- HN
AMD
N–Dextran


HO
OH
HO
OH
Si
OH
HO
OH
HO
OH
APTS/ EtOH
RT
X
Si
O
Si
NH2
X
X= OEt or OH or OSi-
R
HN
O
O
O
0 °C
Dry DMF / CHCl3
Si
=
Si
O
X
Si
X
N
H
O
C
R
H
N
H
n

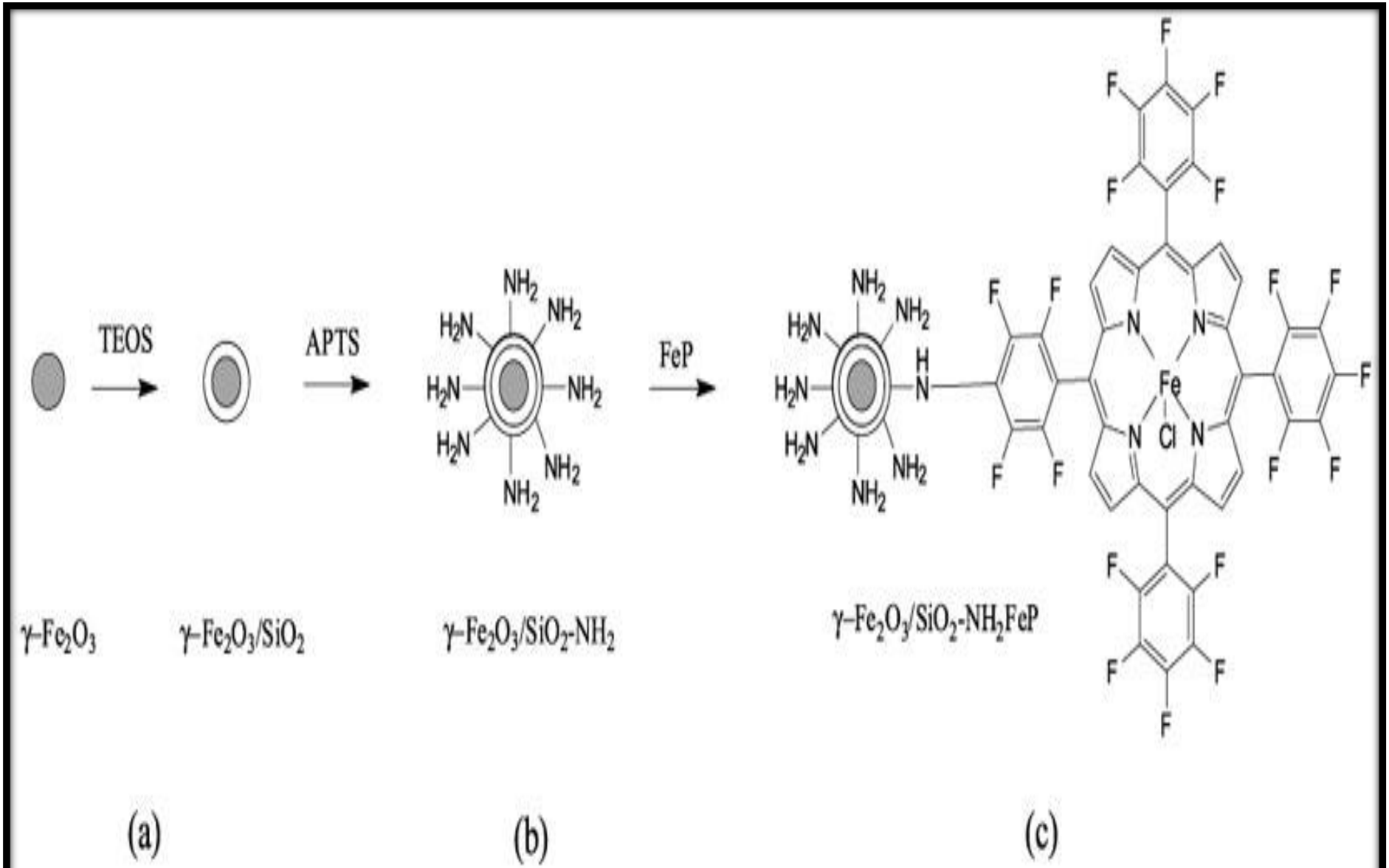
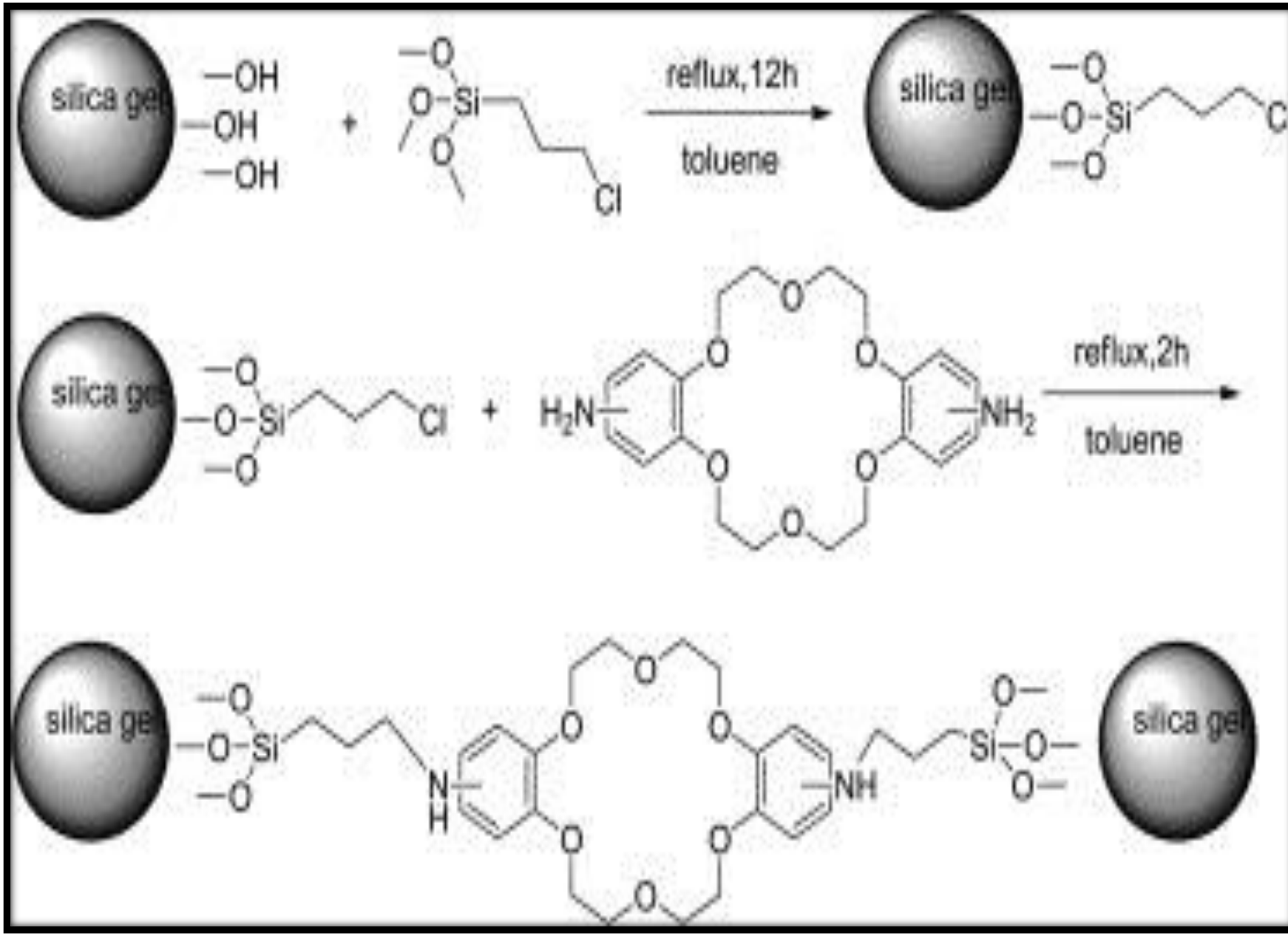
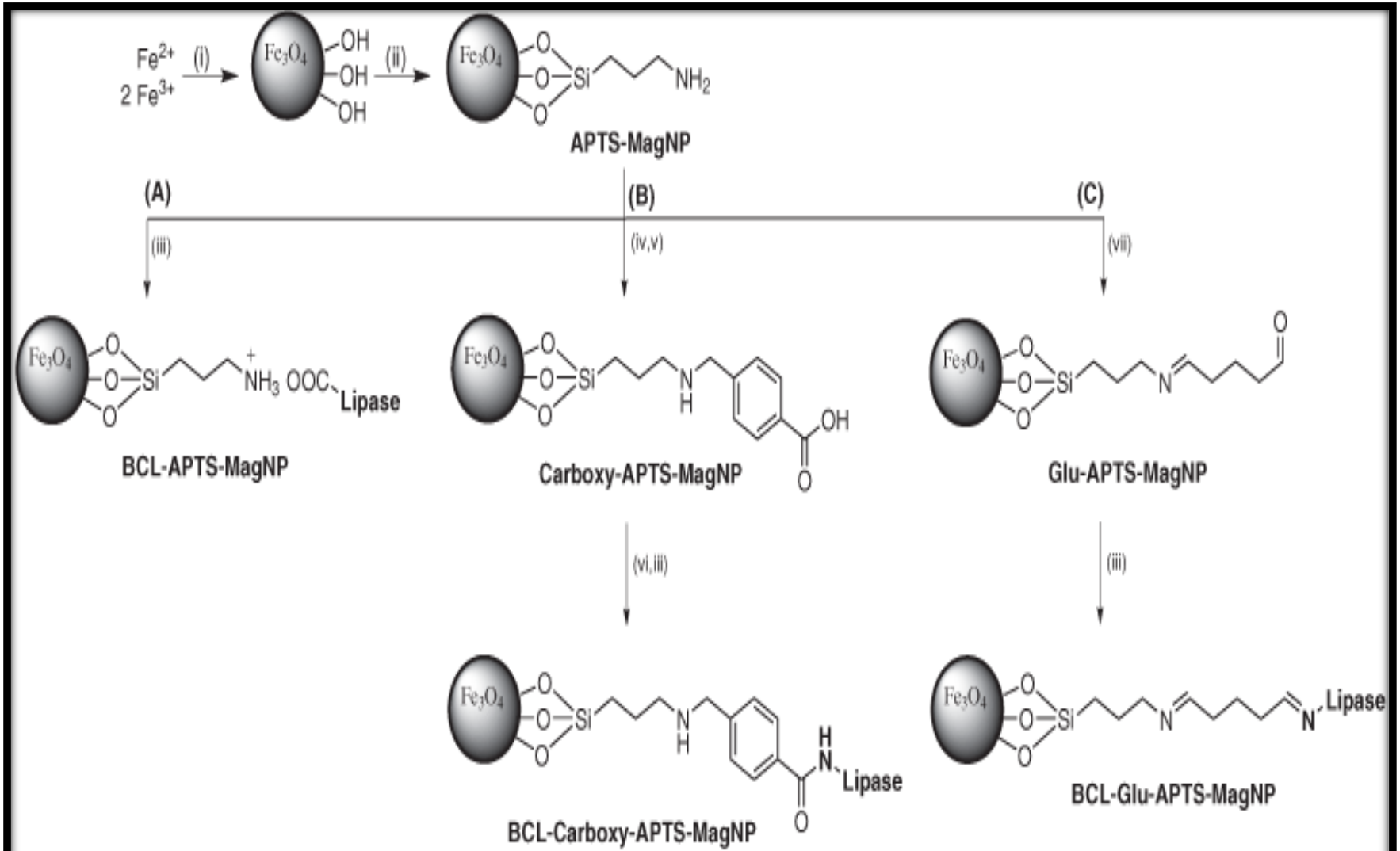
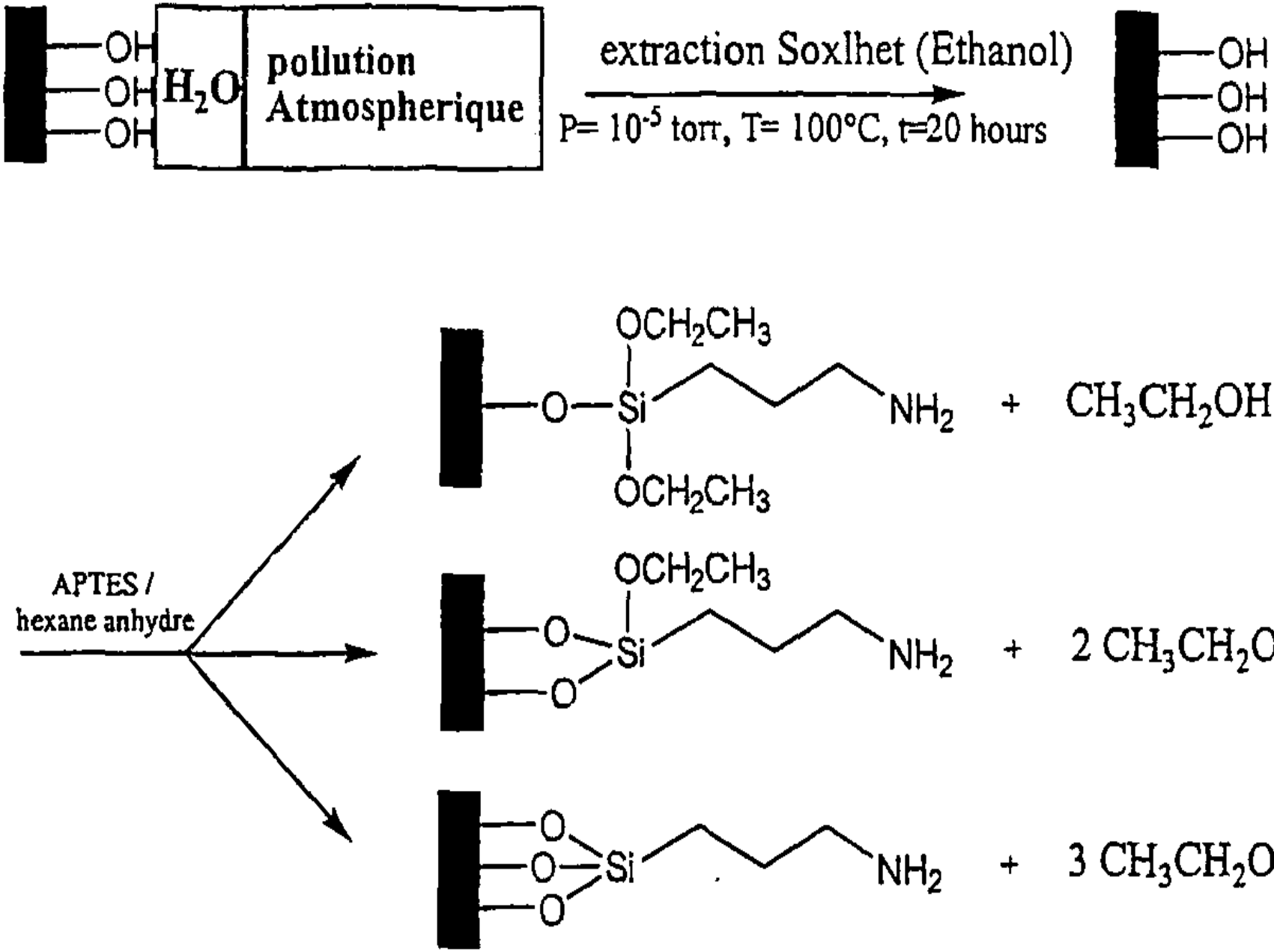


Figure 2. Preparation of the γ-Fe_2O_3/SiO_2-NHFeP catalyst.


silica gel
—OH
—OH
—OH
+
—O
O—Si
O
Cl
reflux,12h
toluene
silica gel
—O
O—Si
—O
Cl
silica gel
—O
—O—Si
—O
Cl
+
H2N
NH2
O
reflux,2h
toluene
silica gel
—O
—O—Si
—O
N
H
NH
O—
Si—O—
O—
silica gel



Scheme 1. Immobilization of *B. cepacia* lipase on superparamagnetic nanoparticles (A = Adsorption method; B = Carboxybenzaldehyde method; C = Glutaraldehyde method); (i) Fe^{2+}/Fe^{3+} oxides, NaOH (0.5 mol L^{-1}), 0.5 h; (ii) (3-aminopropyl)trimethoxysilane, 12 h; (iii) *B. cepacia* lipase (550 µg lipase/mL), 1 h; (iv) 4-carboxybenzaldehyde, 4 h; (v) $NaBH_4$, 1 h; (vi) 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride, 20 min.; (vii) glutaraldehyde, 2 h.


OH
OH
OH
H2O
pollution
Atmospherique
extraction Soxlhet (Ethanol)
P= 10-5 torr, T= 100°C, t=20 hours
OH
OH
OH
APTES /
hexane anhydre
OCH2CH3
O
Si
NH2
OCH2CH3
+
CH3CH2OH
OCH2CH3
O
Si
NH2
O
+
2 CH3CH2OH
O
O
Si
NH2
O
O
+
3 CH3CH2OH

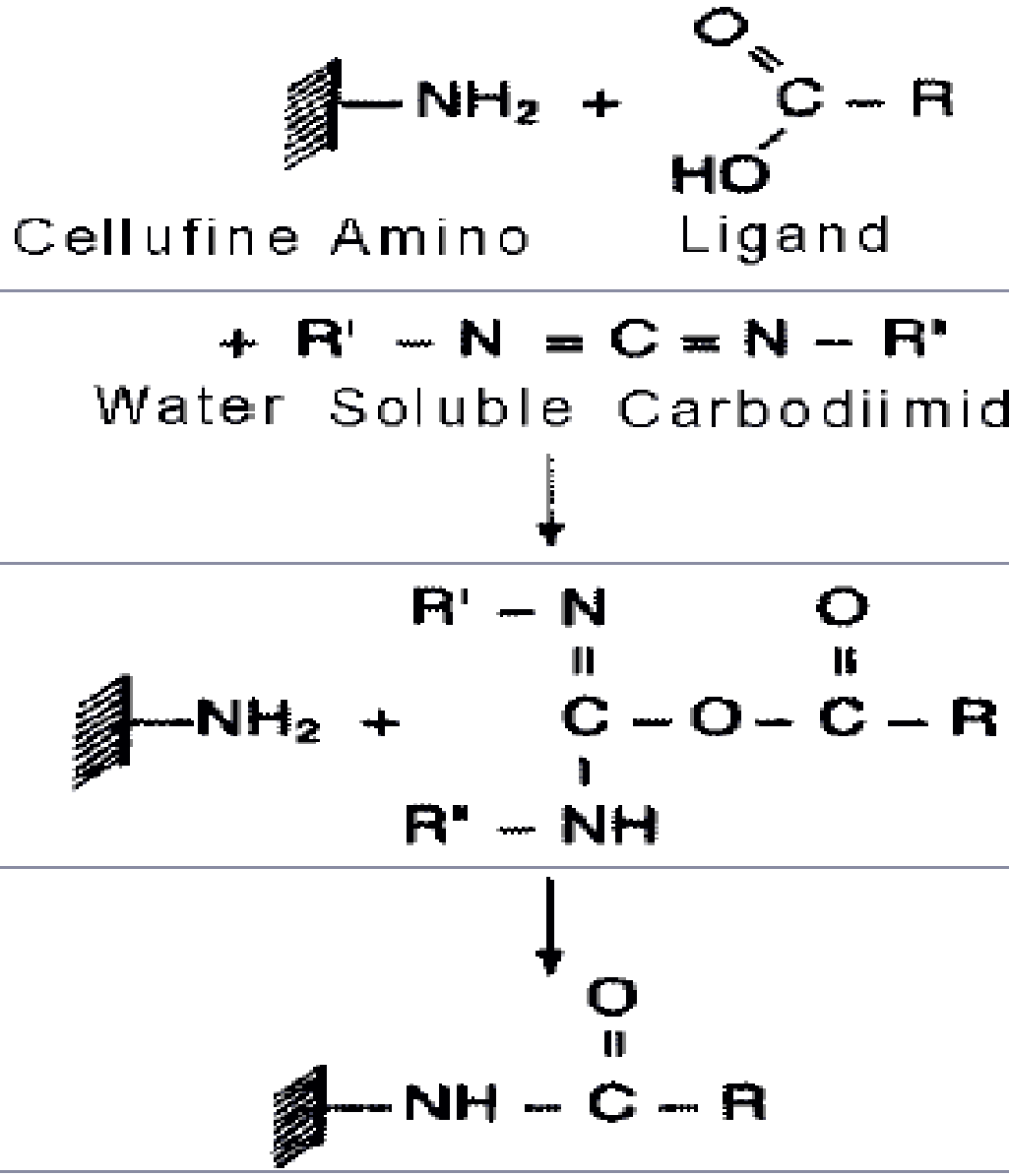
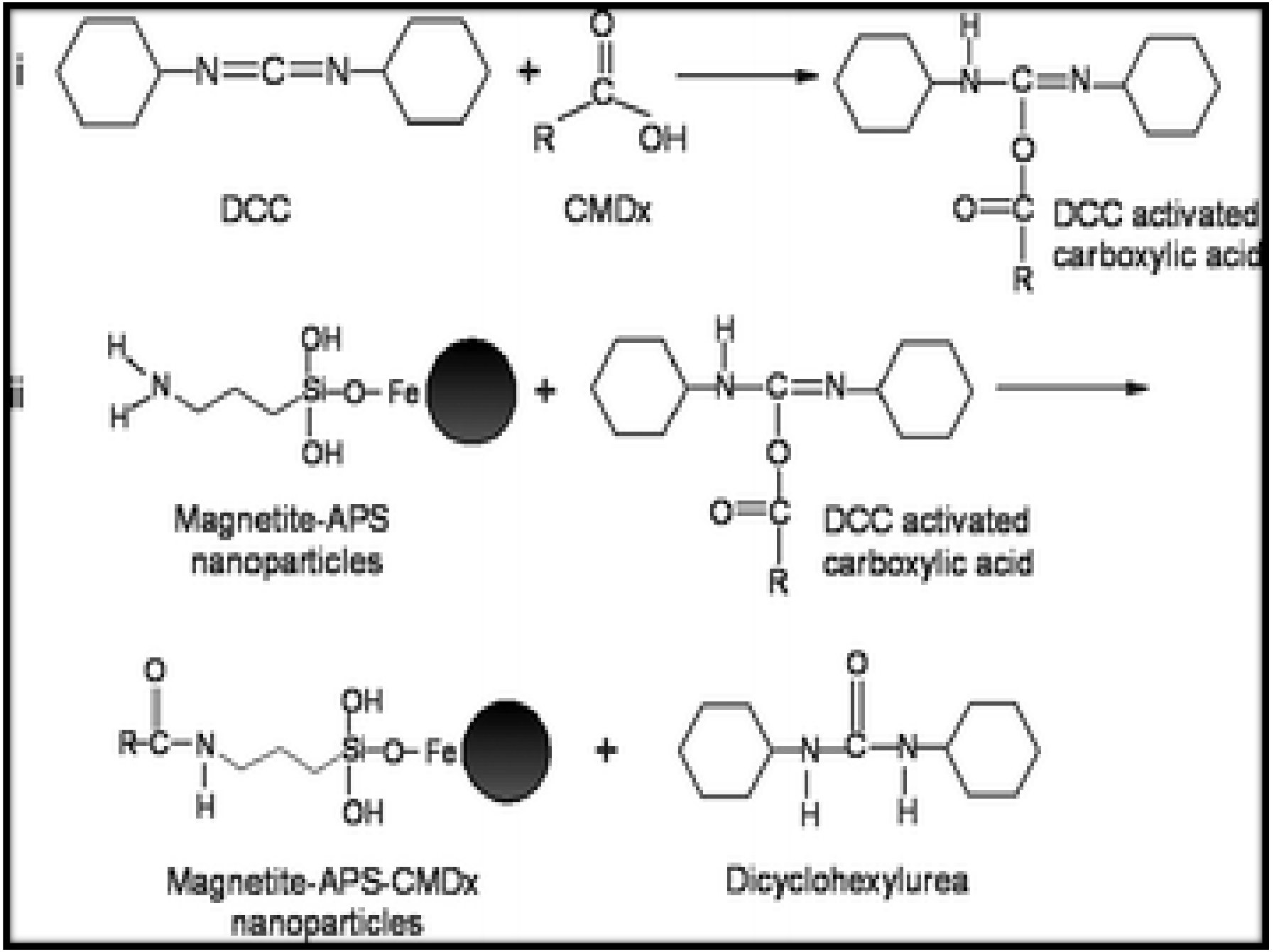
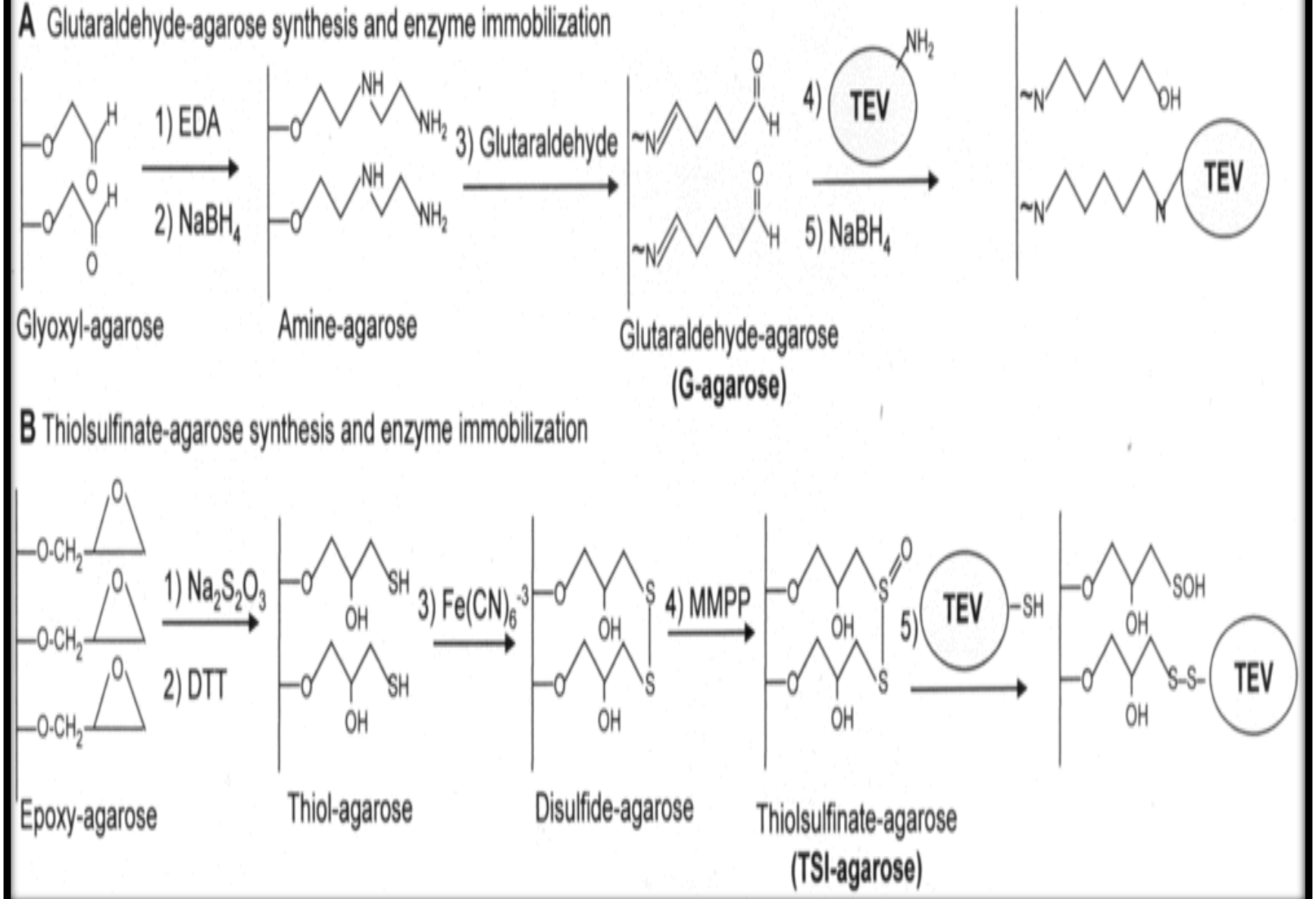


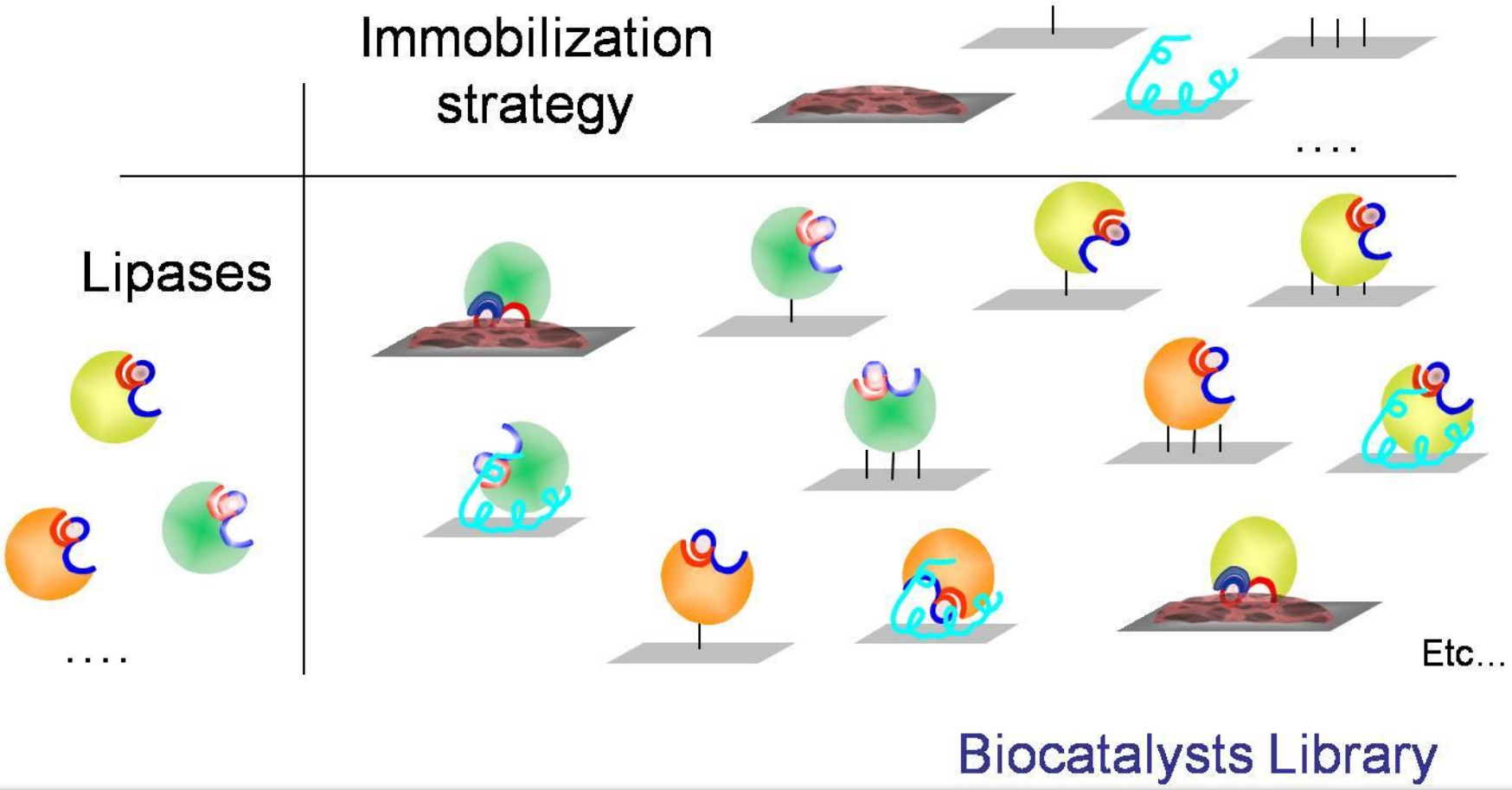
Figure 6
Activation Mechanism of Cellufine Amino with Carbodiimides

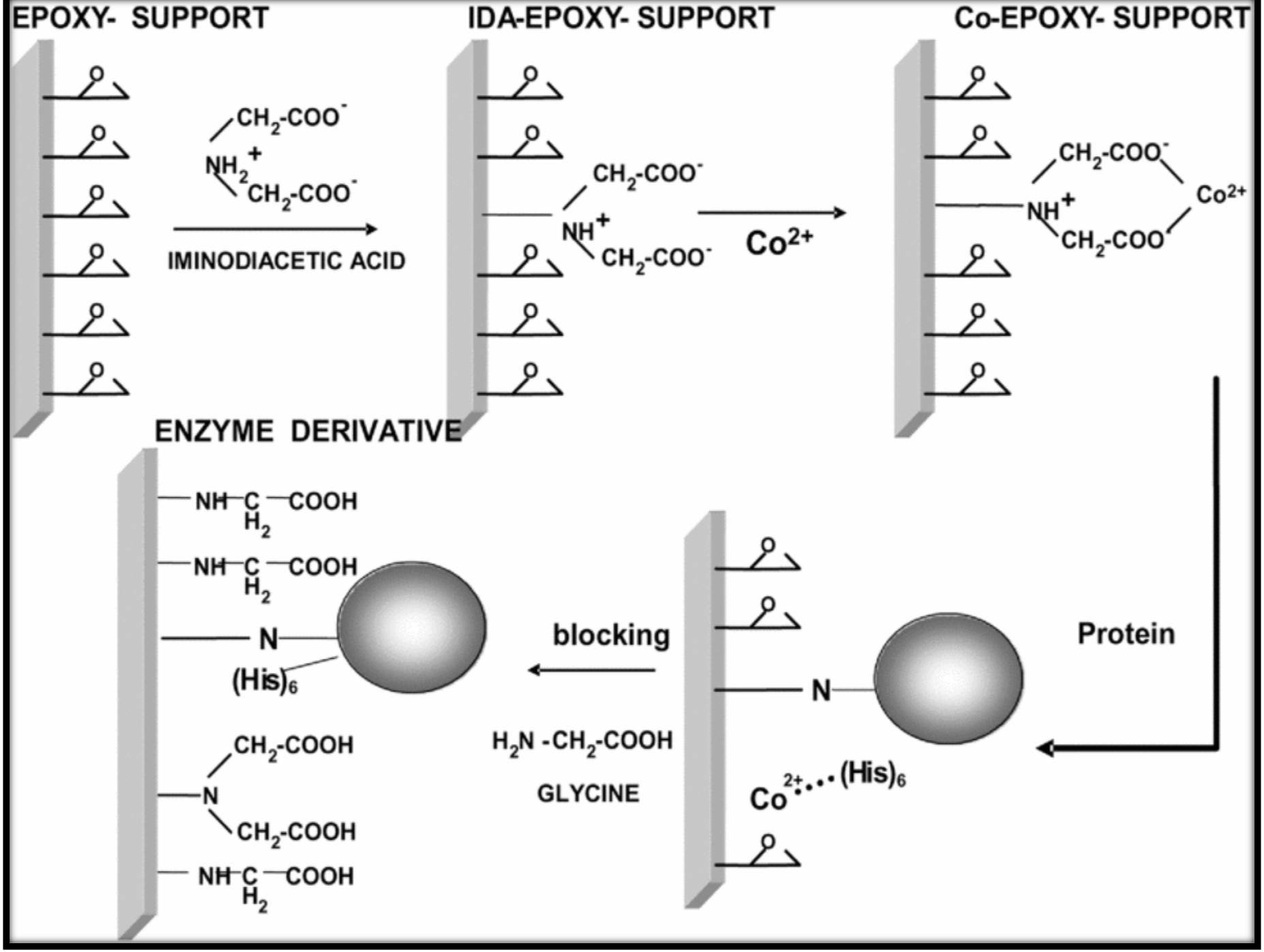

i
DCC
CMDx
DCC activated carboxylic acid
ii
Magnetite-APS nanoparticles
DCC activated carboxylic acid
Magnetite-APS-CMDx nanoparticles
Dicyclohexylurea

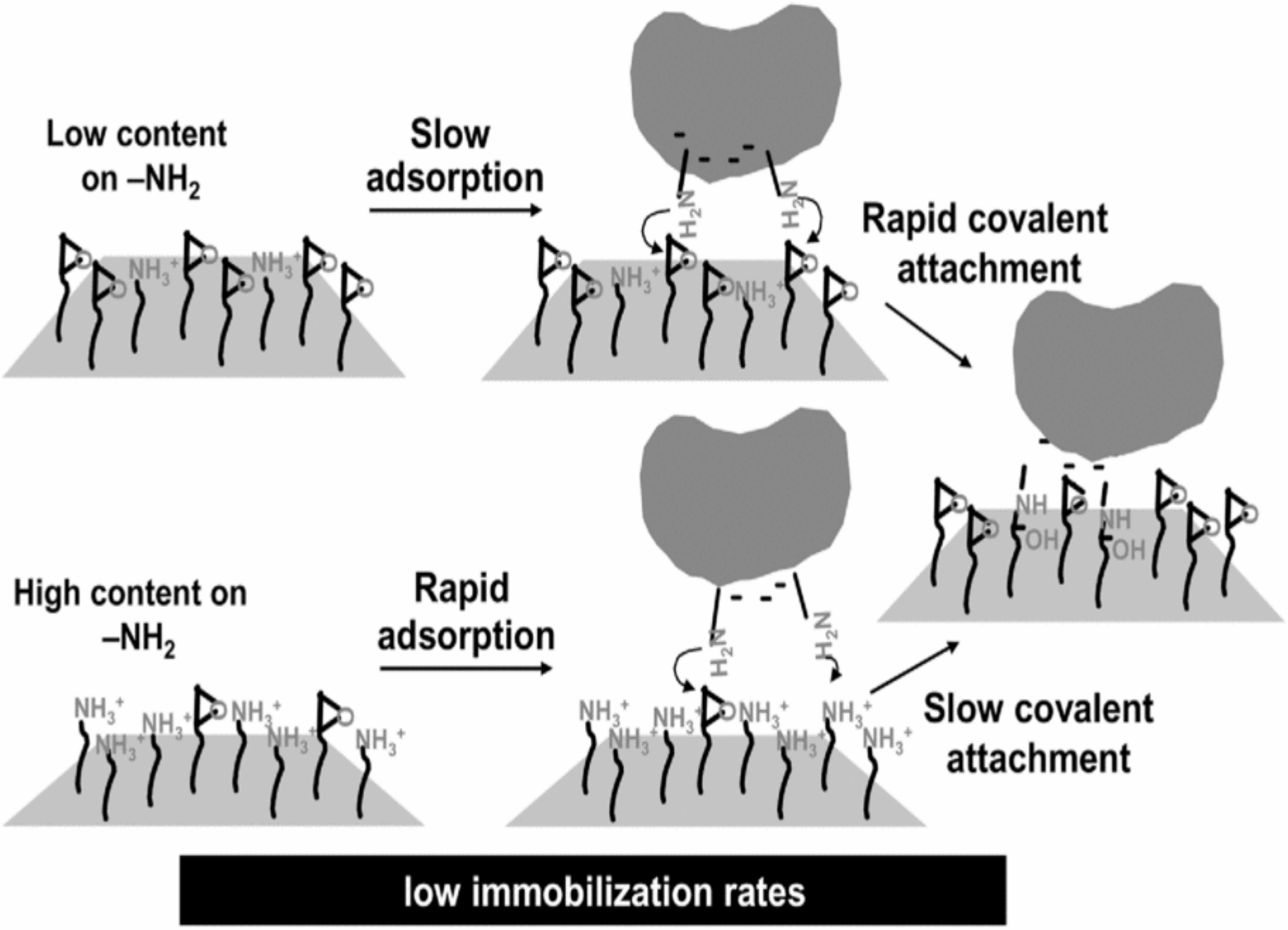

A Glutaraldehyde-agarose synthesis and enzyme immobilization
1) EDA
2) NaBH4
3) Glutaraldehyde
4) TEV
5) NaBH4
Glyoxyl-agarose
Amine-agarose
Glutaraldehyde-agarose
(G-agarose)
B Thiolsulfinate-agarose synthesis and enzyme immobilization
1) Na2S2O3
2) DTT
3) Fe(CN)6-3
4) MMPP
5) TEV
Epoxy-agarose
Thiol-agarose
Disulfide-agarose
Thiolsulfinate-agarose
(TSI-agarose)

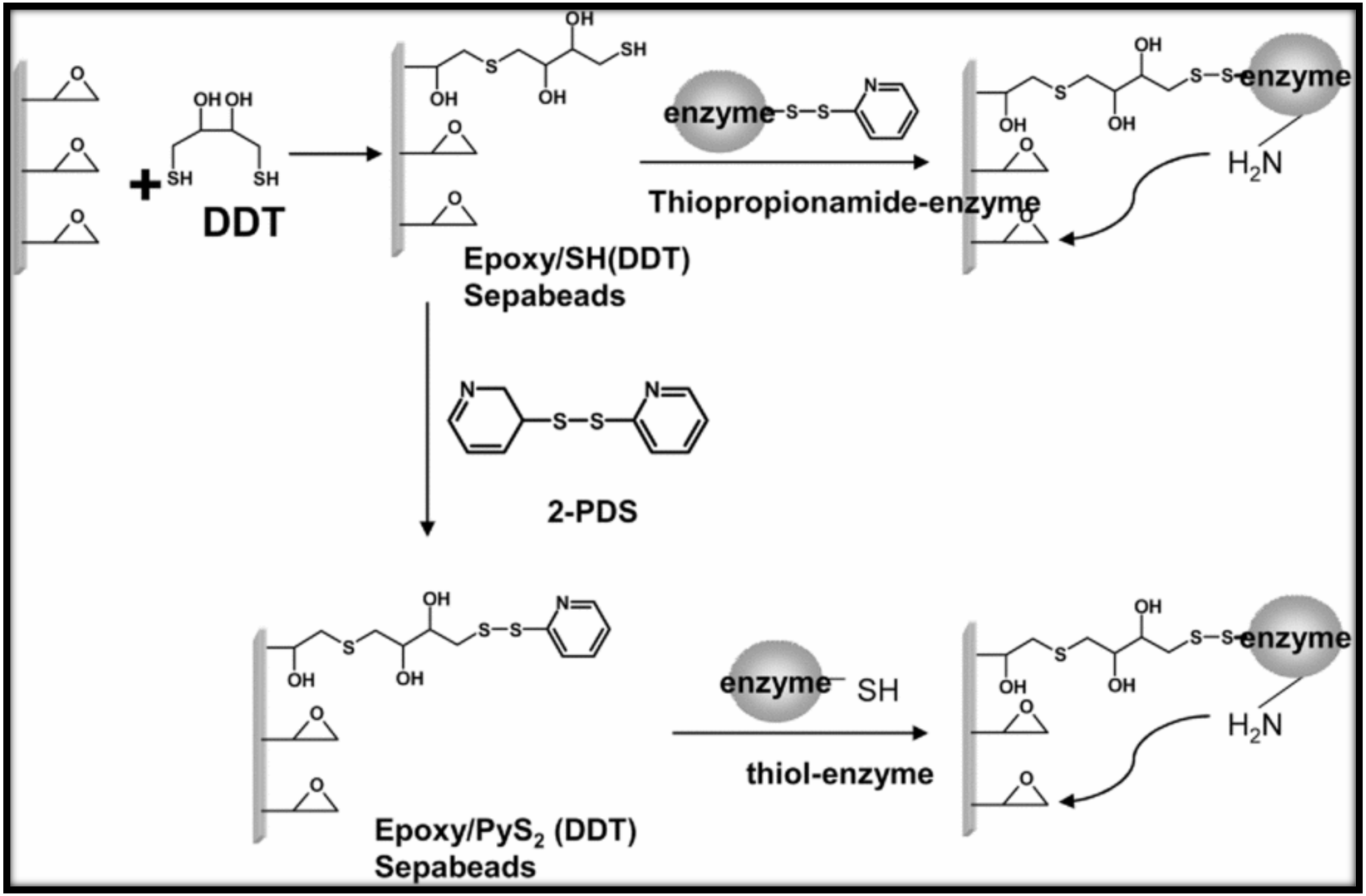
Preparation of Biocatalysts

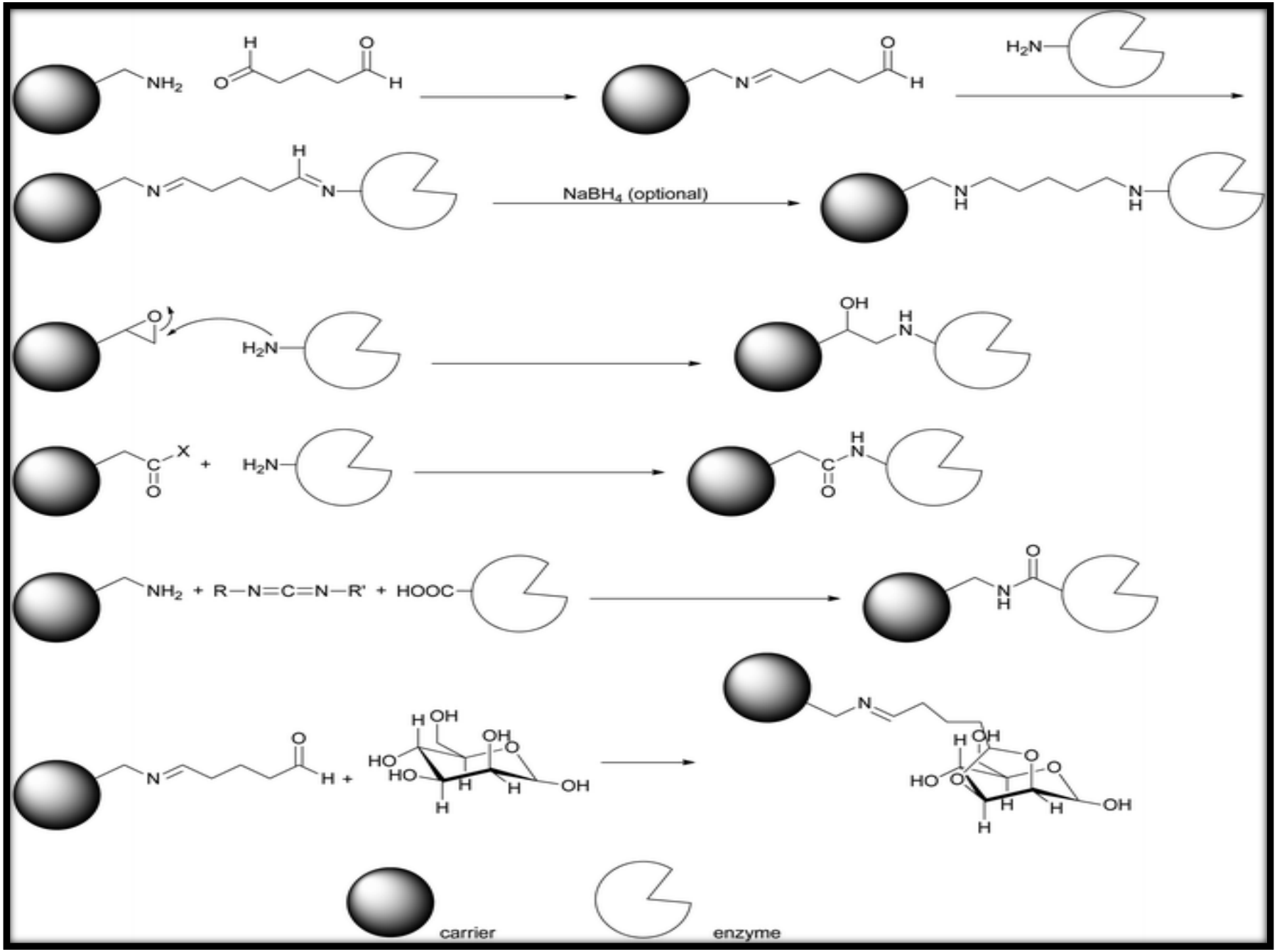
Conformational Engineering of lipases on solid phase

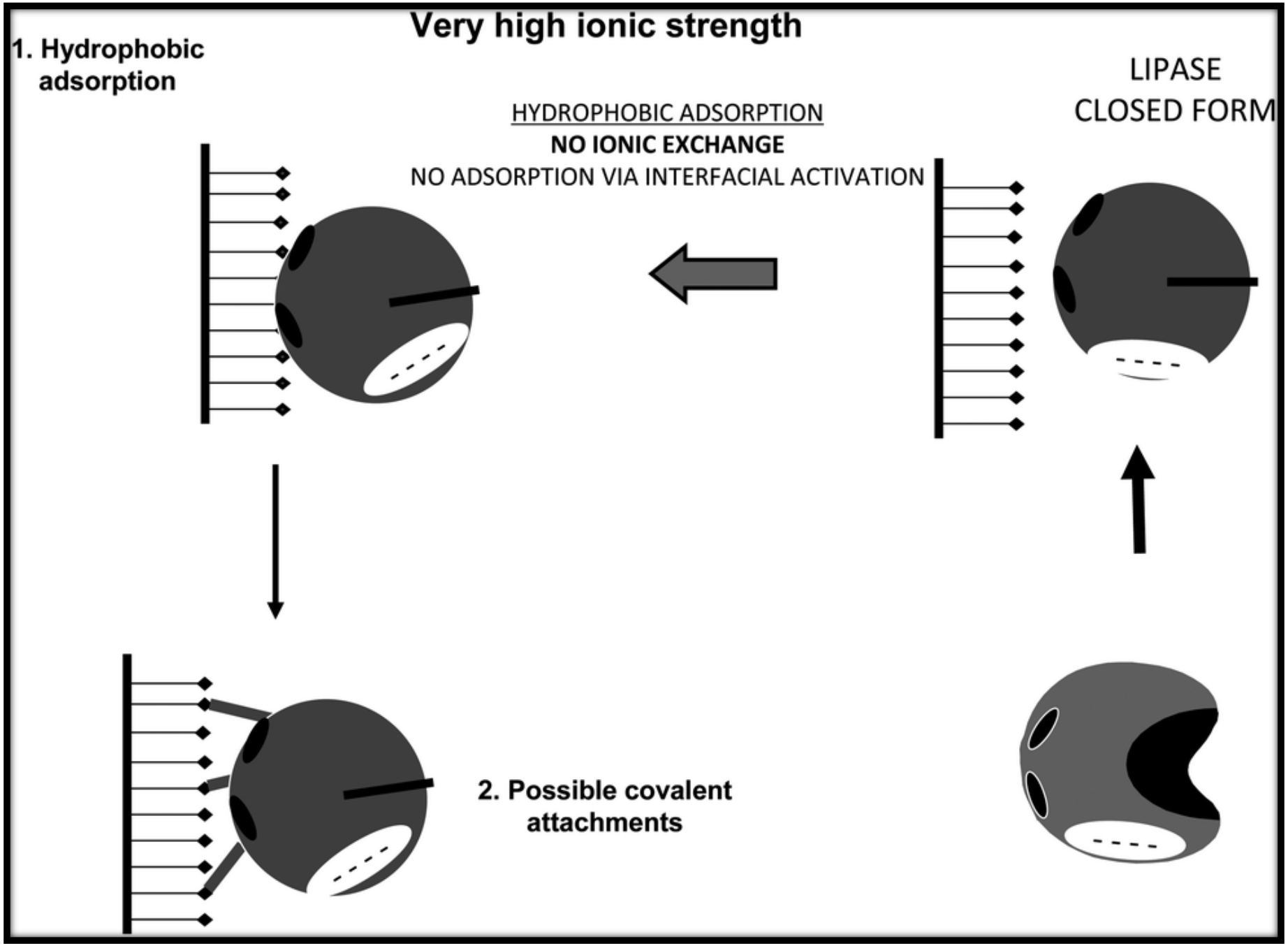



EPOXY- SUPPORT
IDA-EPOXY- SUPPORT
Co-EPOXY- SUPPORT
IMINODIACETIC ACID
Co2+
ENZYME DERIVATIVE
blocking
H2N -CH2-COOH
GLYCINE
Protein
(His)6
Co2+···(His)6

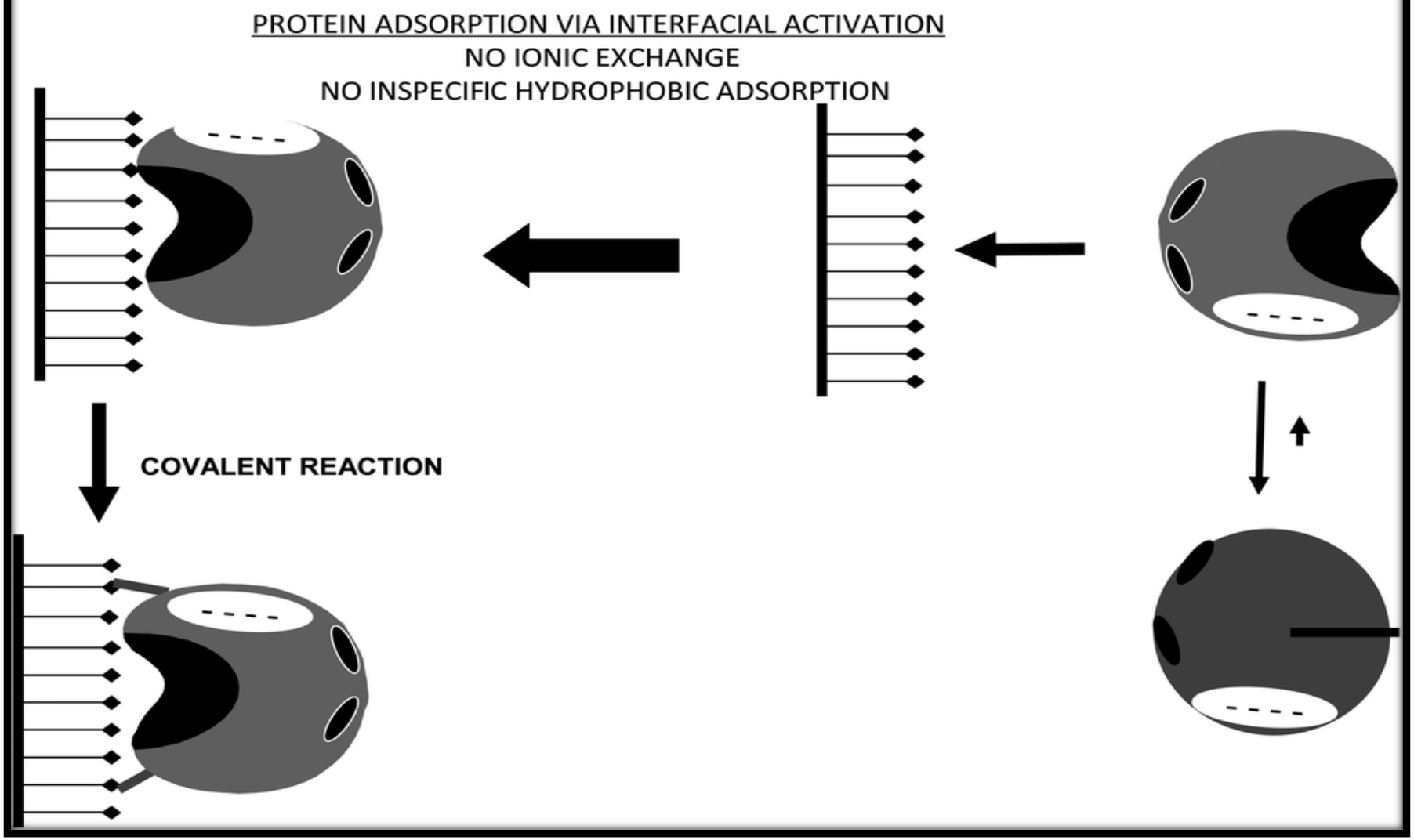

Low content on –NH2
Slow adsorption
Rapid covalent attachment
High content on –NH2
Rapid adsorption
Slow covalent attachment
low immobilization rates

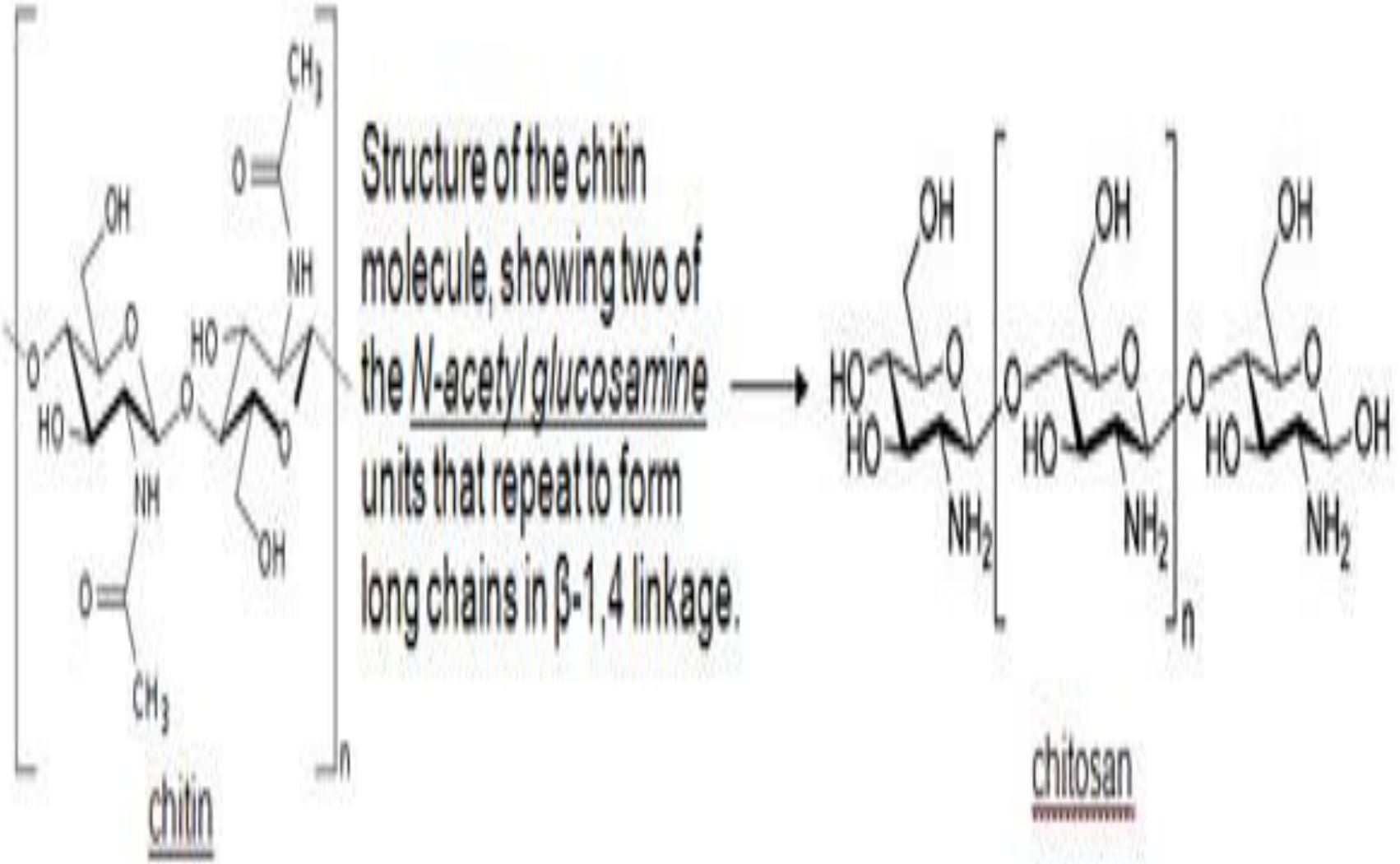

DDT
Epoxy/SH(DDT)
Sepabeads
enzyme
Thiopropionamide-enzyme
2-PDS
Epoxy/PyS2 (DDT)
Sepabeads
thiol-enzyme

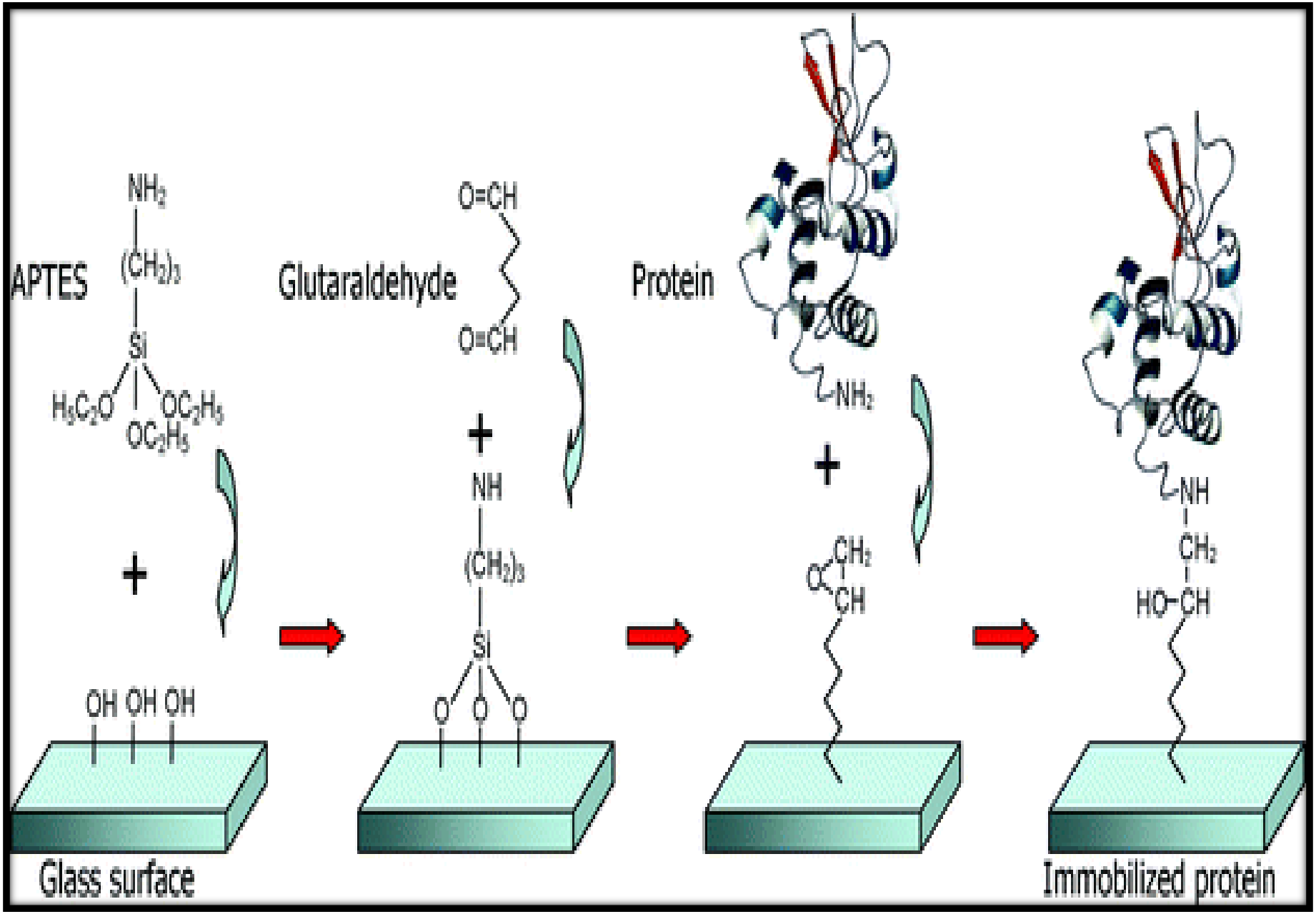

NaBH4 (optional)
carrier
enzyme


Very high ionic strength
1. Hydrophobic adsorption
LIPASE CLOSED FORM
HYDROPHOBIC ADSORPTION
NO IONIC EXCHANGE
NO ADSORPTION VIA INTERFACIAL ACTIVATION
2. Possible covalent attachments

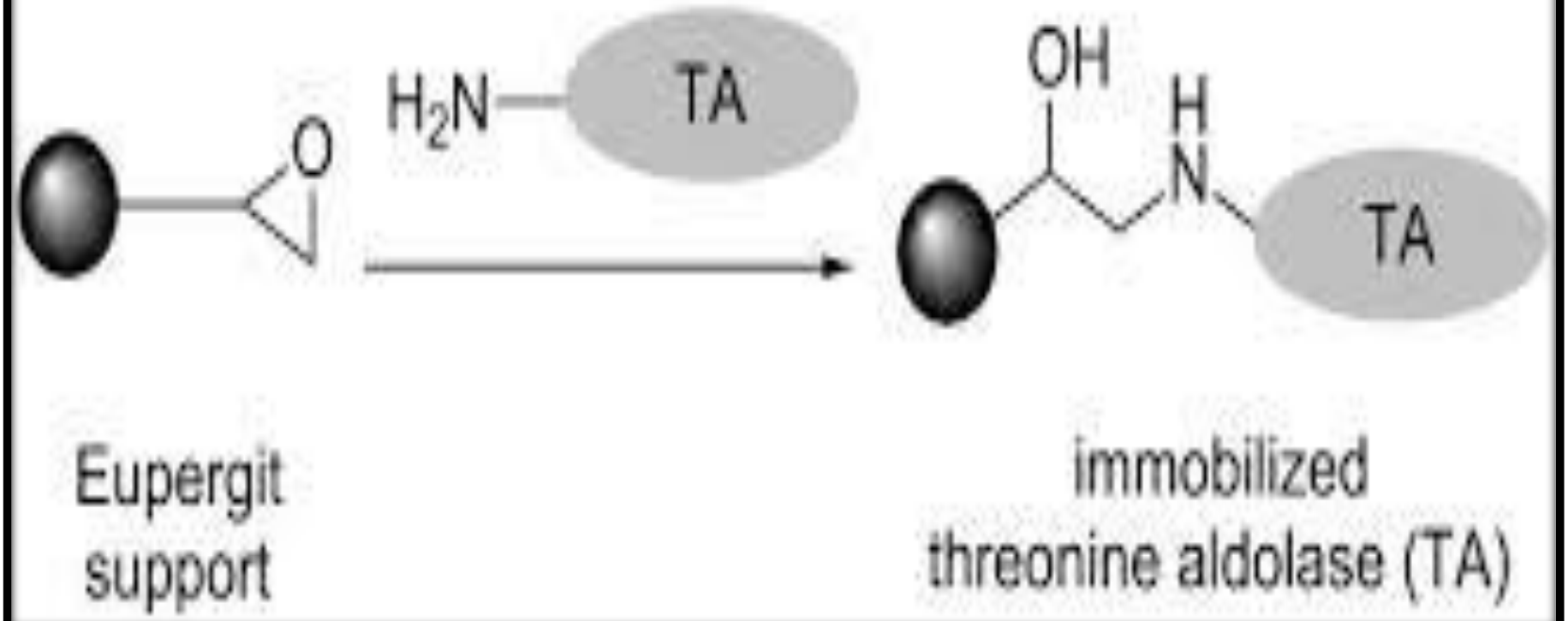
IONIC STRENGTH HIGH ENOUGH TO PREVENT IONIC EXCHANGE

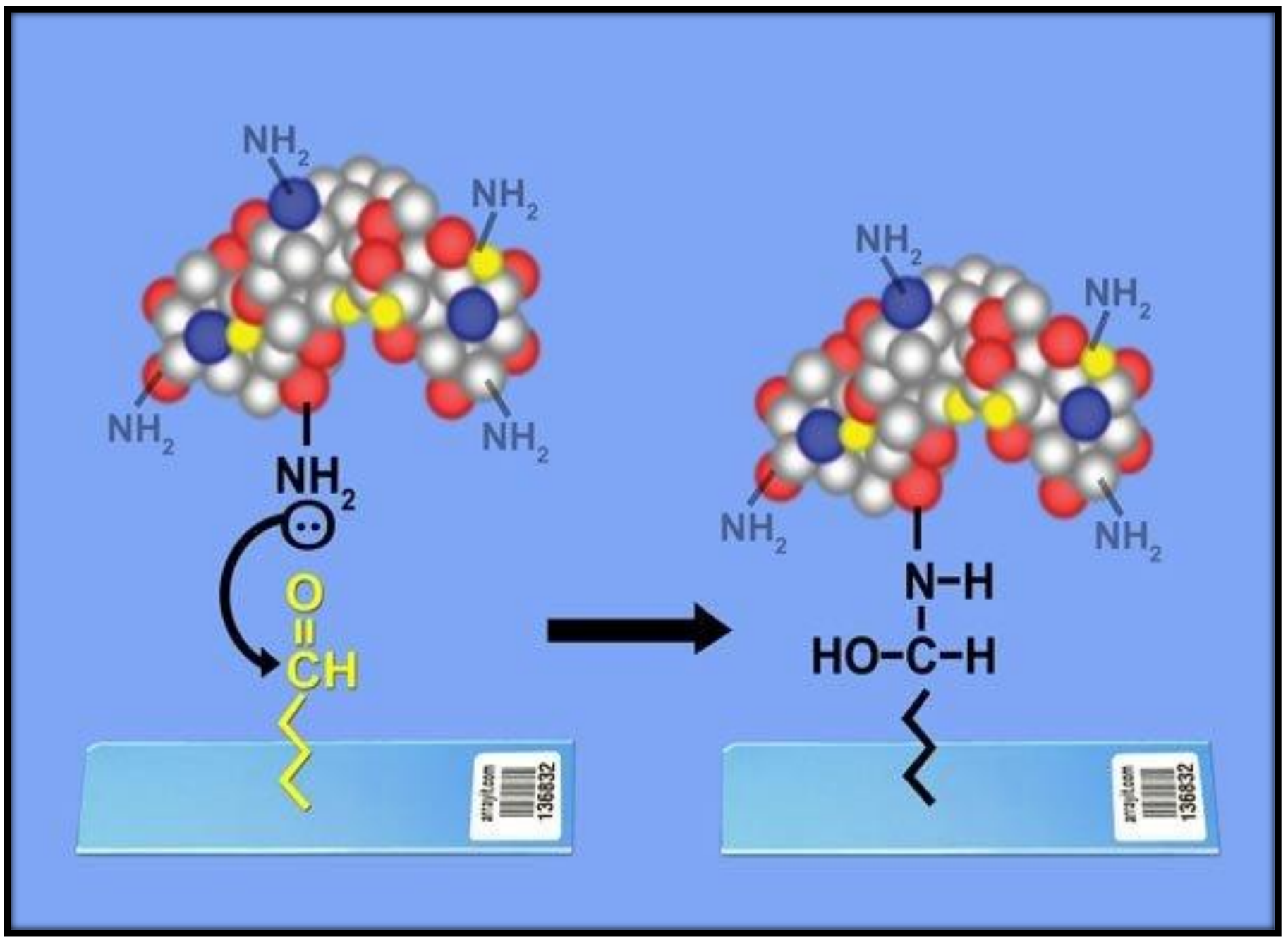


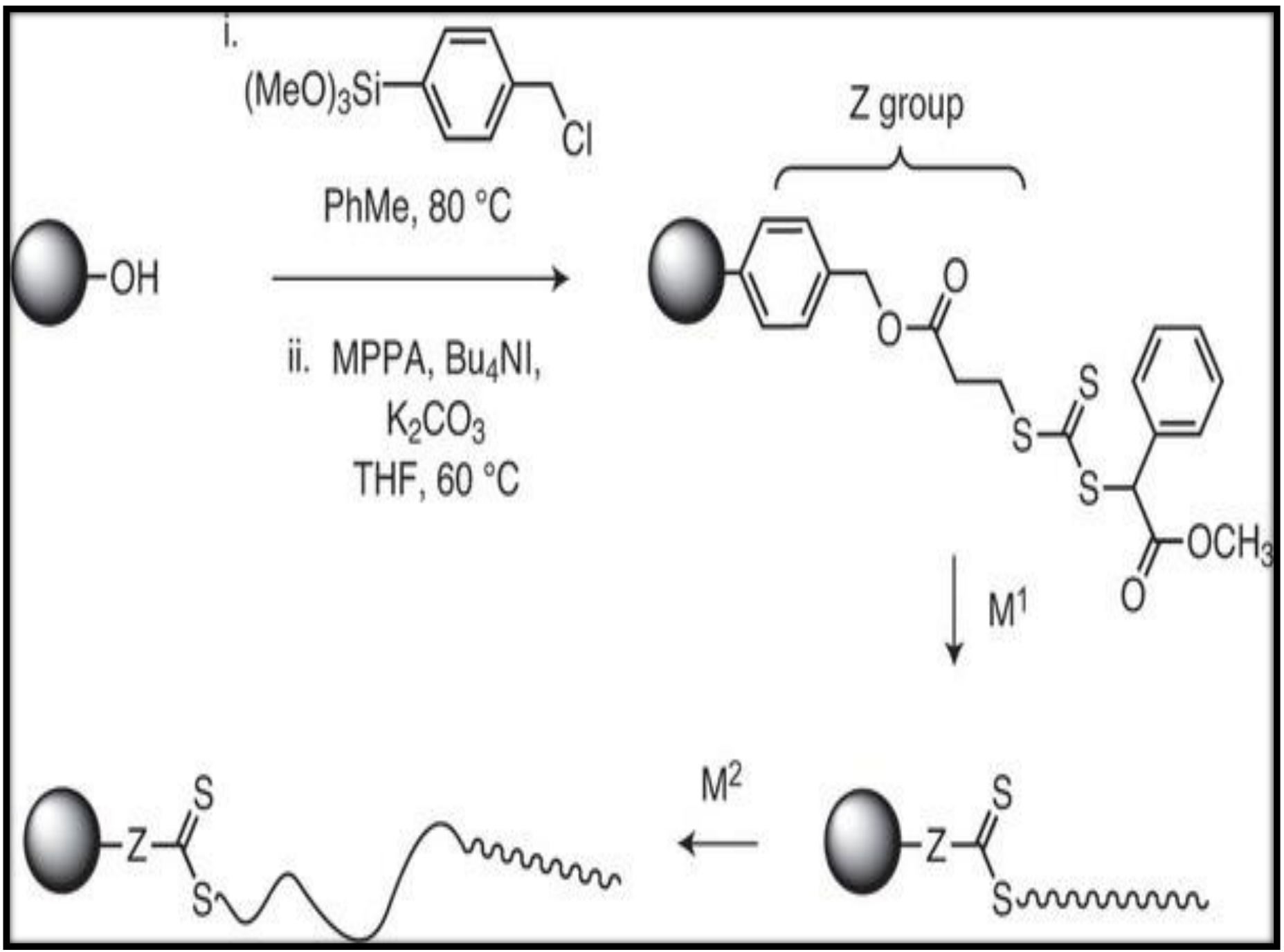

Structure of the chitin molecule, showing two of the N-acetylglucosamine units that repeat to form long chains in β-1,4 linkage.
chitin
chitosan

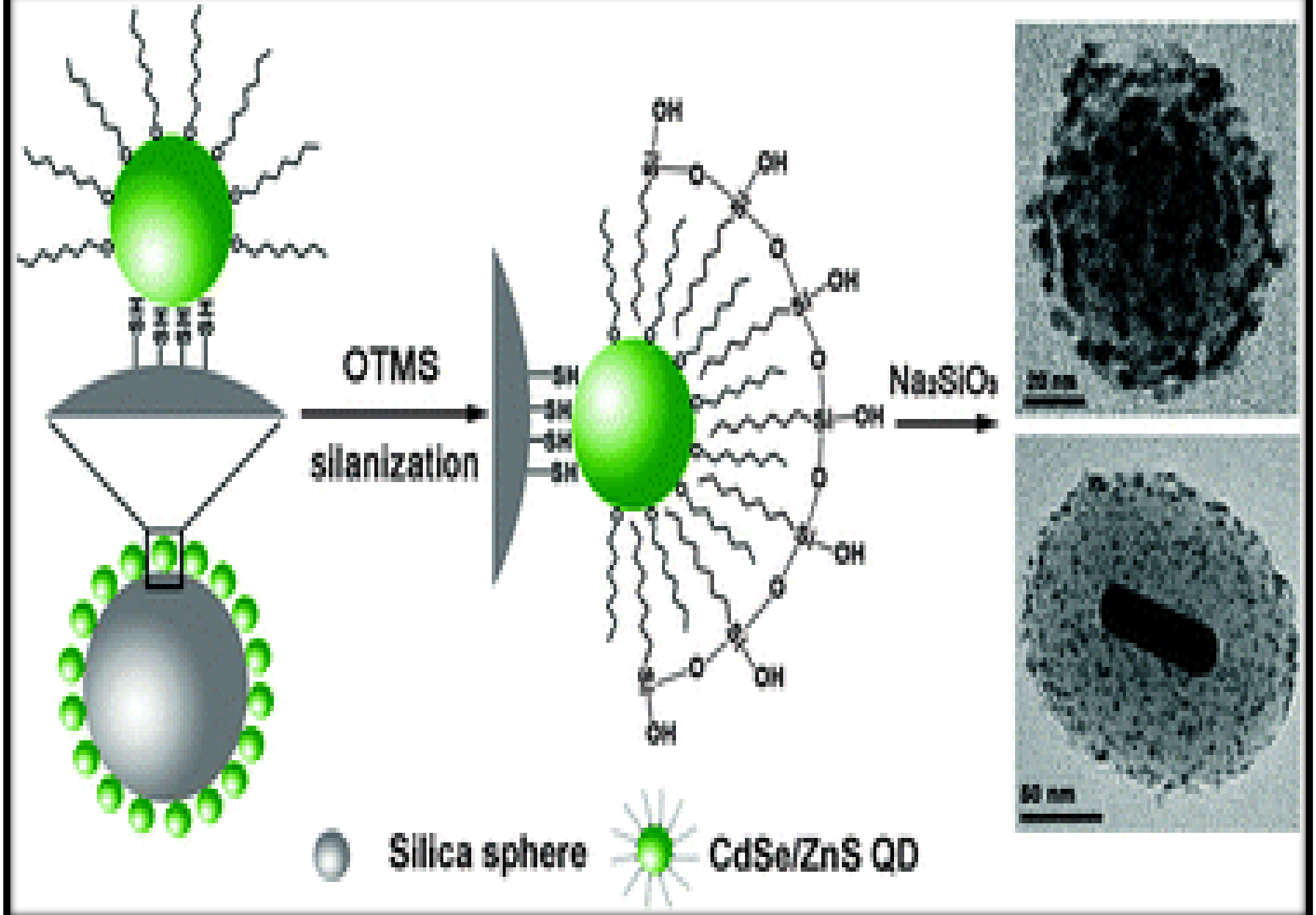

APTES
Glutaraldehyde
Protein
Glass surface
Immobilized protein

Direct immobilization




NH2
NH2
NH2
NH2
NH2
O=CH
N-H
HO-C-H
NH2
NH2
NH2
NH2
136832
136832


i.
(MeO)3Si
Cl
PhMe, 80 °C
OH
ii. MPPA, Bu4NI,
K2CO3
THF, 60 °C
Z group
O
O
S
S
S
OCH3
O
M1
M2
Z
S
S


OTMS
silanization
Na2SiO3
Silica sphere
CdSe/ZnS QD

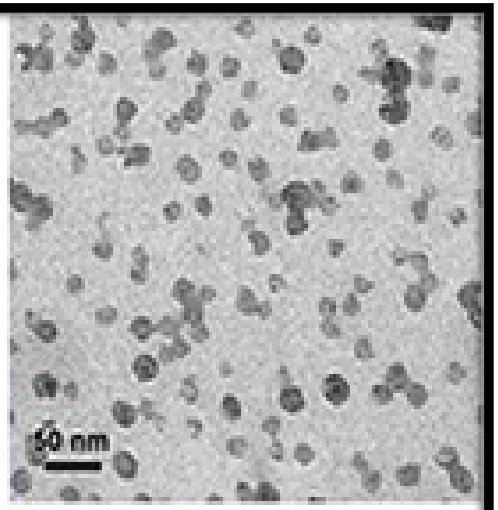
$CuInS_2/ZnS$ in oil phase

Ultrasonication

Silanization

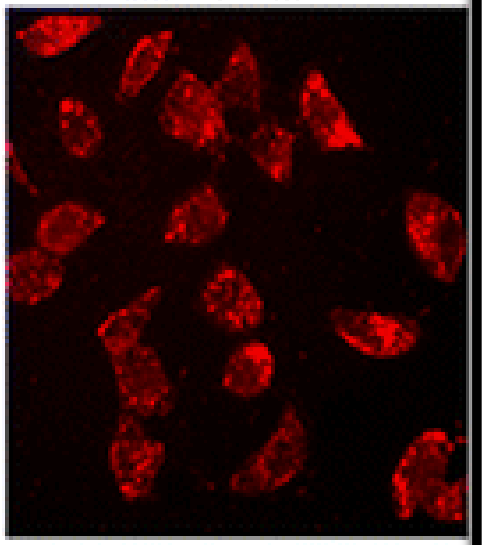
$CuInS_2/ZnS$ in water phase

Na_2SiO_3



$CuInS_2/ZnS@SiO_2$

Transferrin Conjugation



Cell imaging

محاضرات
كيمياء الأنزيمات وتحميلها
المستوي الثالث (البيوتكنولوجي)
المحاضرة العاشرة

اعداد
أ.د/ فرحات فودة علي فودة
أستاذ الكيمياء الحيوية

٢- طريقة الارتباط بالمشاركة

Covalent Attachment

تعتبر هذة الطريقة من افضل طرق التحميل حيث لا ينتج عنها نقص فى نشاط الانزيم نتيجة الارتباط الكيميائى بواسطة الروابط الاشتراكية (الارتباط التساهمى) بين الانزيم ومادة التحميل التى سبق تنشيطها او المعاد تنشيطها او بين جزيئين من الانزيم مرتبطين معا بواسطة مادة الجلوترالدهيد التى تسمى **Bifunctional cross linking**.

- ويتم الارتباط التساهمى بين الانزيم ومادة التحميل عند وجود amio group مجموعة الامين للحامض الامينى ليسين ، Secondary group للحامض الامينى البرولين ، ومجاميع الهيدروكسيل للحامض الامينى سيرين او وجود مجاميع الهيدروكسيل النشطة للاحماض الامينية العطرية مثل التيروزين او وجود حلقة الاميدازول للاحماض الامينية الهستدين والتربتوفان او عند وجود مجاميع السلفوهيدريل للحامض الامينى السستين .

- ويجب ان يراعى عند اختيار مواد التحميل ان تكون هيدروفيلية ولا يوجد **Opposing electrical charges**

(الشحنات الكهربية المتضادة) بينها وبين مادة التفاعل حتث تؤثر مواد التحميل على درجة الحموضة (**PH**) المثلى للانزيم المحمل .

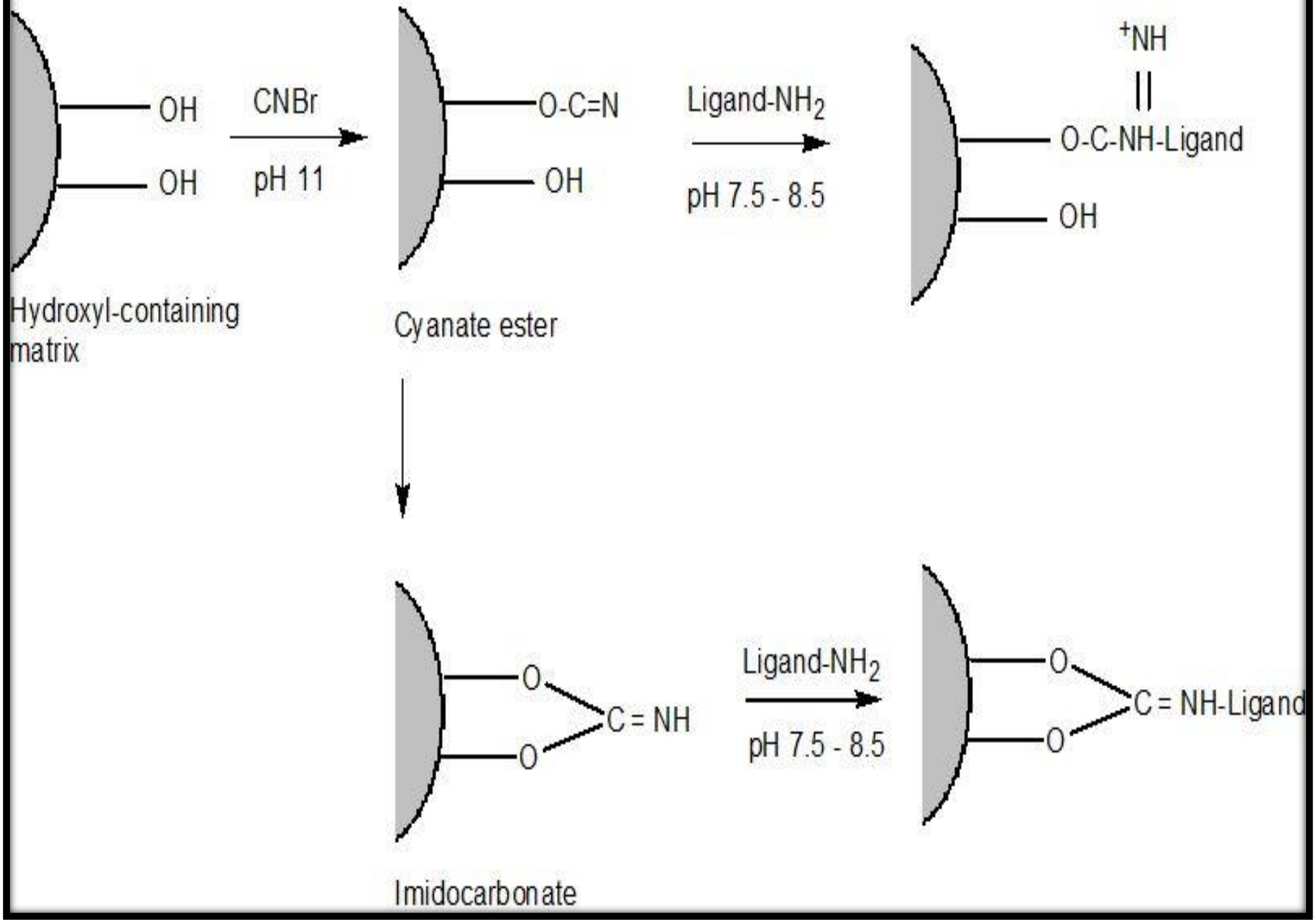
- ويوجد مجموعة من التفاعلات والتى يتم من خلالها اتمام تحميل الانزيمات ومنها :-

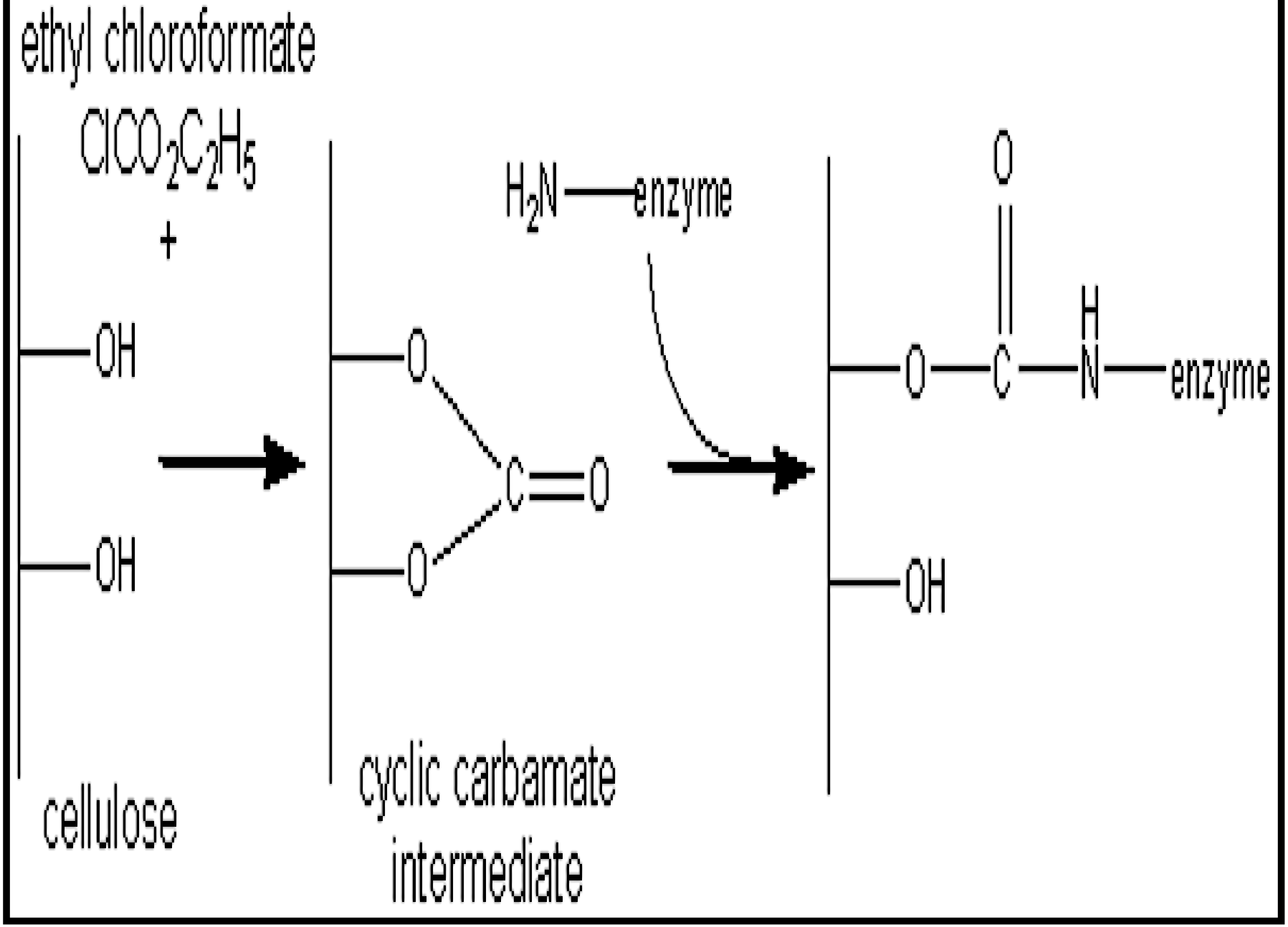
١- تنشيط مجموعة البارا أمينوبنزويك بواسطة حمض النيتروز .

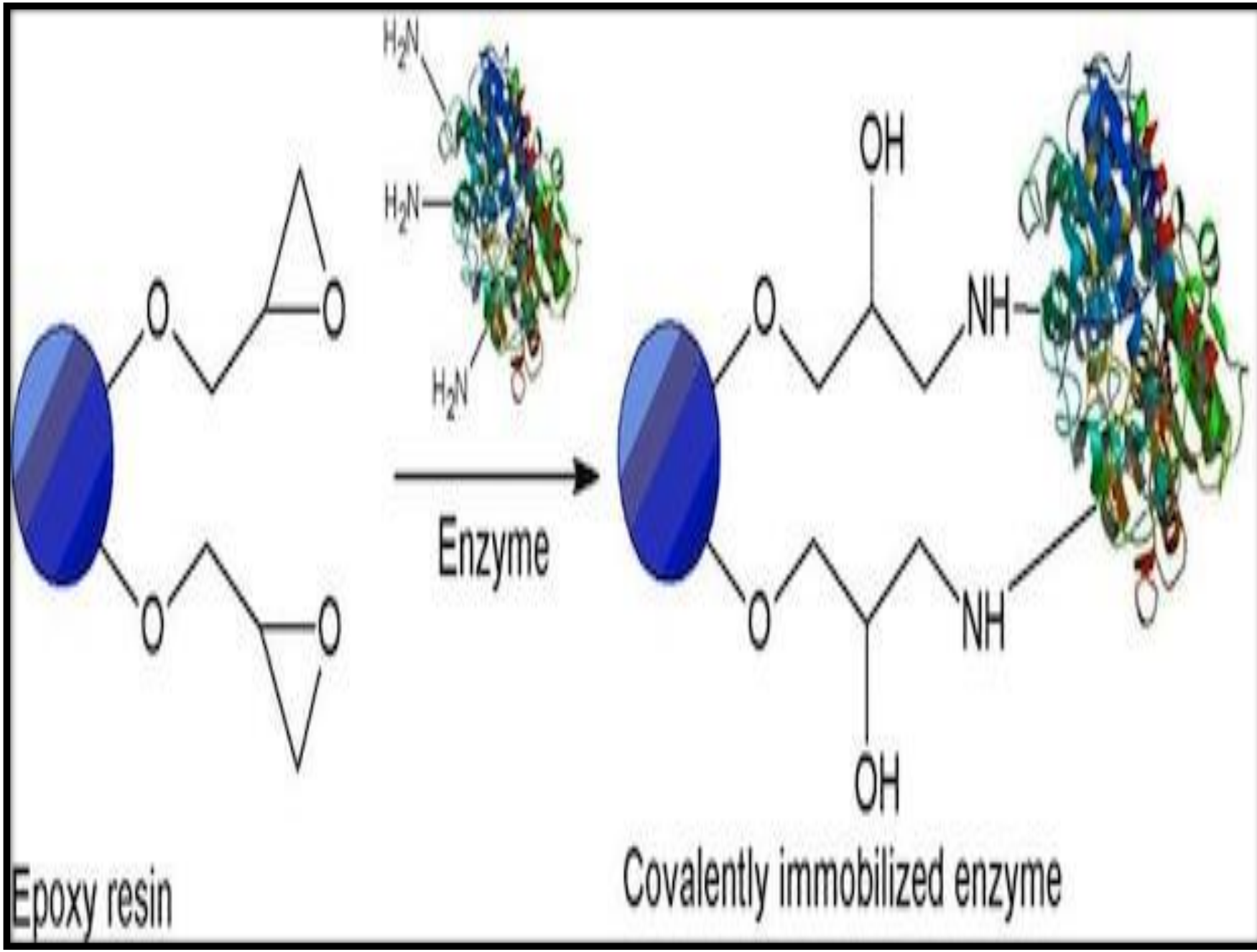
٢ - تنشيط مشتقات الكربوكسى (بمعنى كل الدعامات التى تحتوى على مجموعة كربوكسيل) بواسطة الكربوداميد **Carbodiimide** .

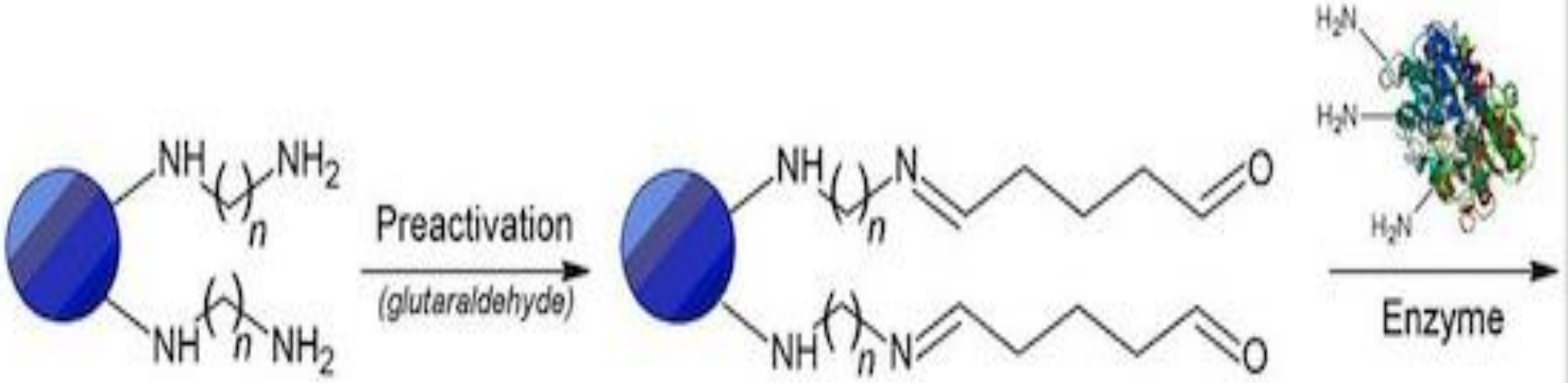
٣- تنشيط البوليمرات الكربوهيدراتية بواسطة سيانوجين بروميد **Cyanogen bromide** لتفاعلة مع الانزيم . أحد الامثلة على ذلك تنشيط السيفاروز وكذلك البوليمرات (**Hydroxyl contanig Matrix**) التى تحتوى على مجاميع الهيدروكسيل للمادة الحاملة للانزيم مثل السليلوز ، الكربوكسى ميثيل سليلوز

والدكستيران **Dextran** كما هو واضح بالامثلة التالية .


OH
OH
CNBr
pH 11
O-C=N
OH
Ligand-NH2
pH 7.5 - 8.5
+NH
O-C-NH-Ligand
OH
Hydroxyl-containing matrix
Cyanate ester
O
O
C = NH
Ligand-NH2
pH 7.5 - 8.5
O
O
C = NH-Ligand
Imidocarbonate


ethyl chloroformate
ClCO2C2H5
+
OH
OH
cellulose
O
C=O
O
cyclic carbamate
intermediate
H2N—enzyme
O
O—C—H—N—enzyme
OH


H_2N
H_2N
H_2N
O
O
O
O
Enzyme
OH
O
NH
O
NH
OH
Epoxy resin
Covalently immobilized enzyme

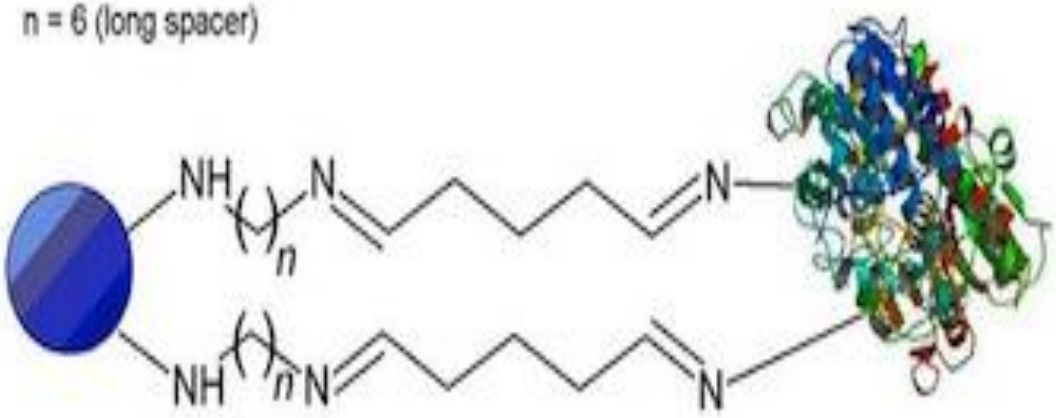


Amino resin

Activated resin

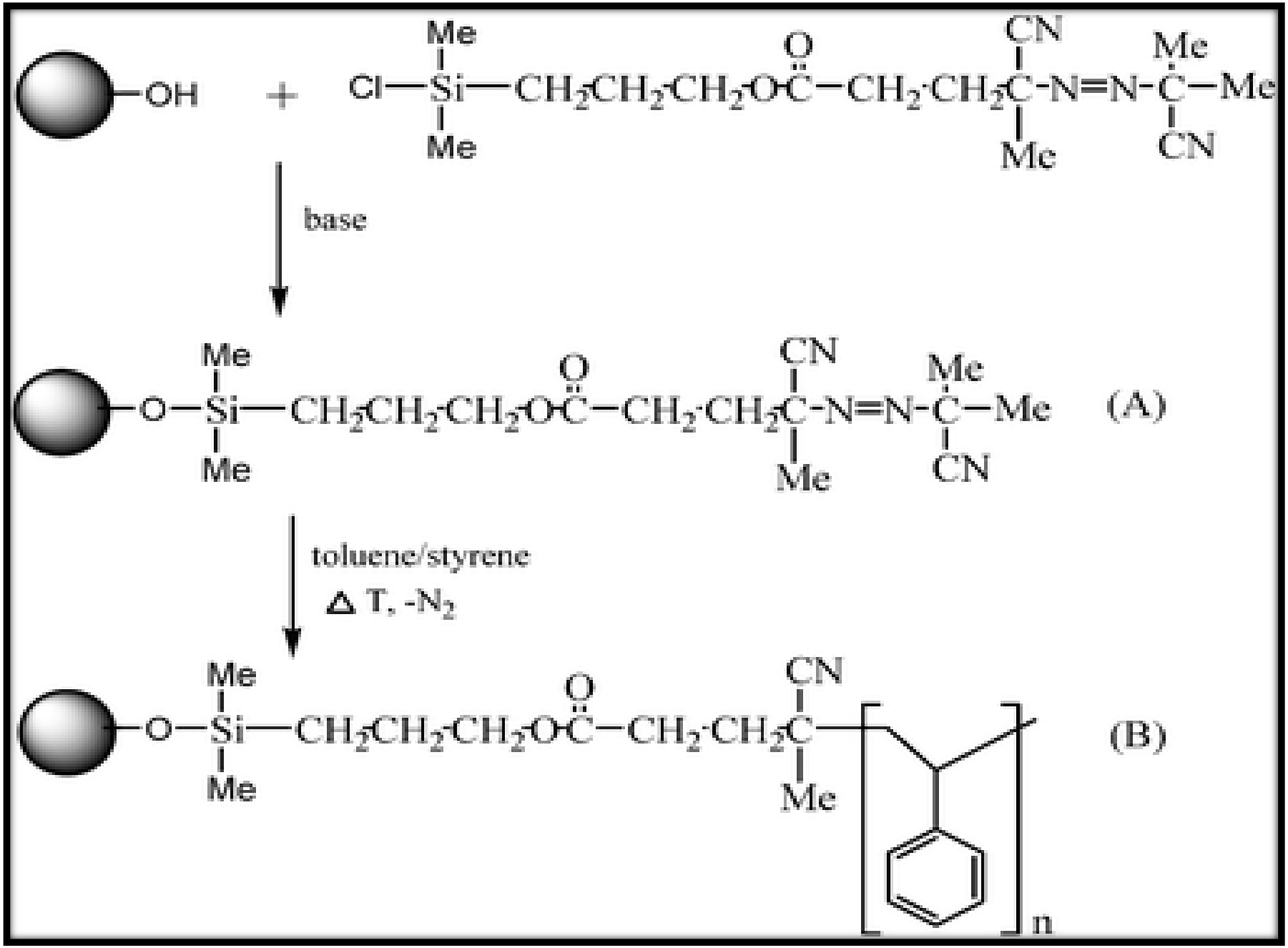
n = 2 (short spacer)

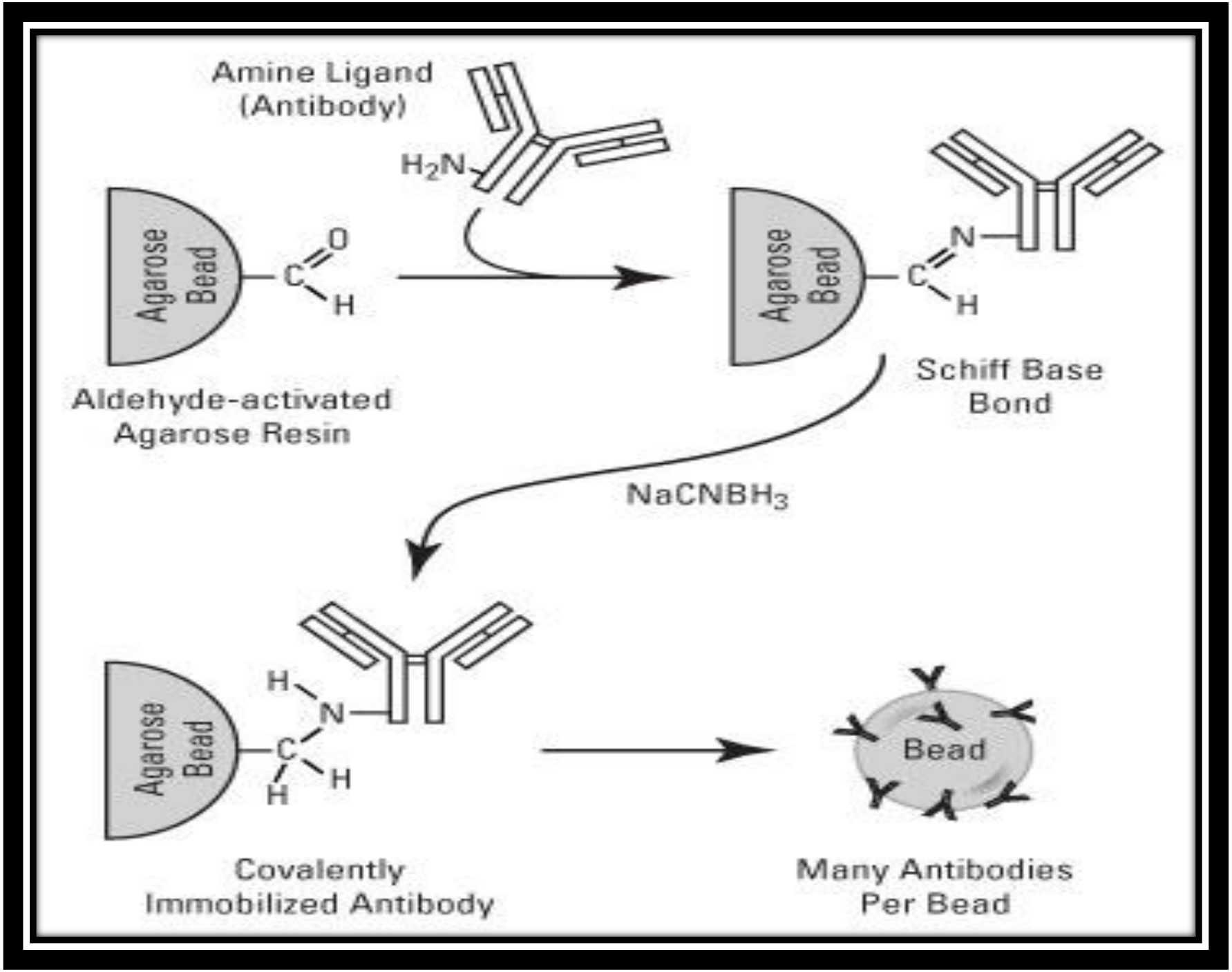
n = 6 (long spacer)

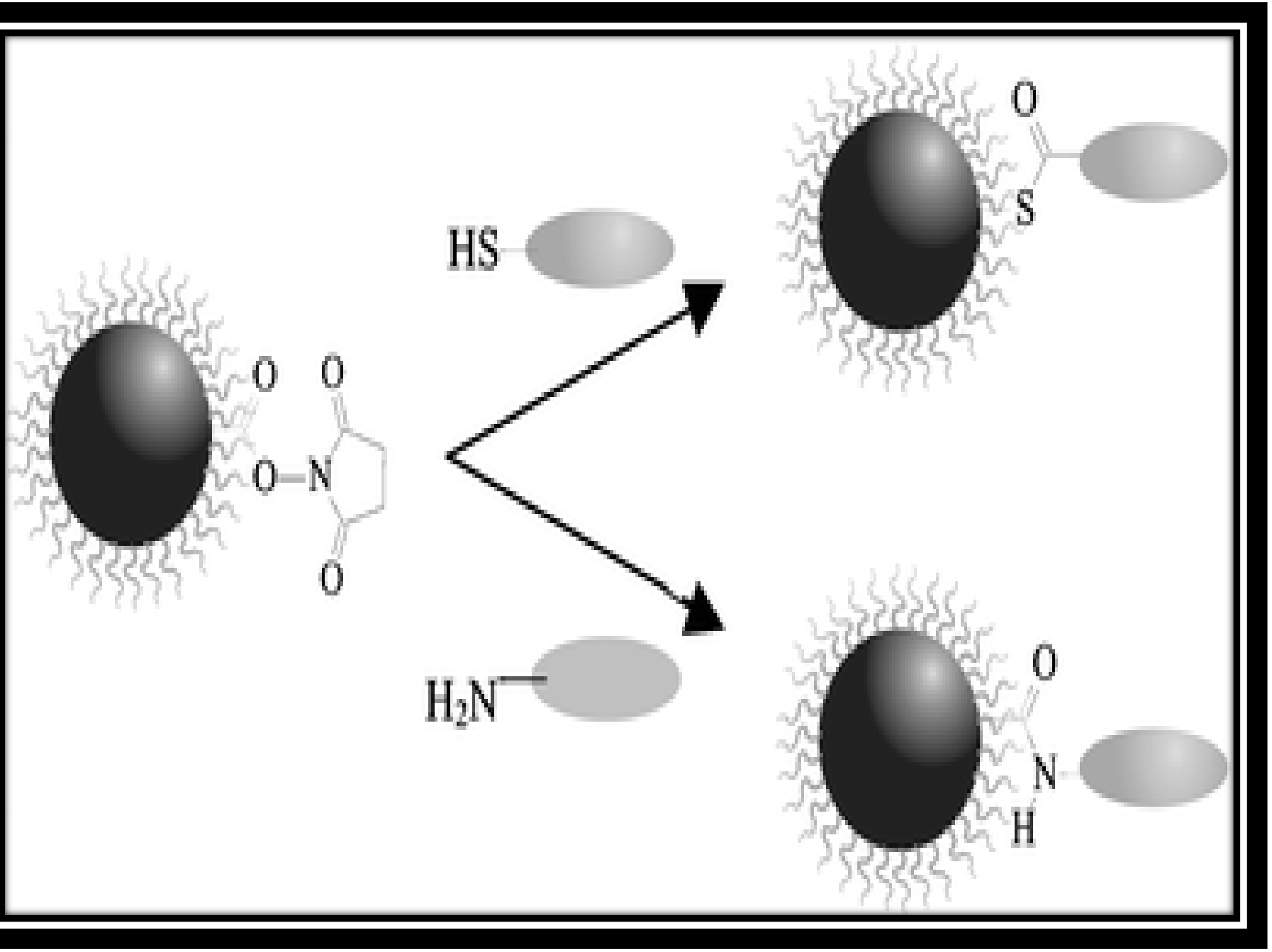


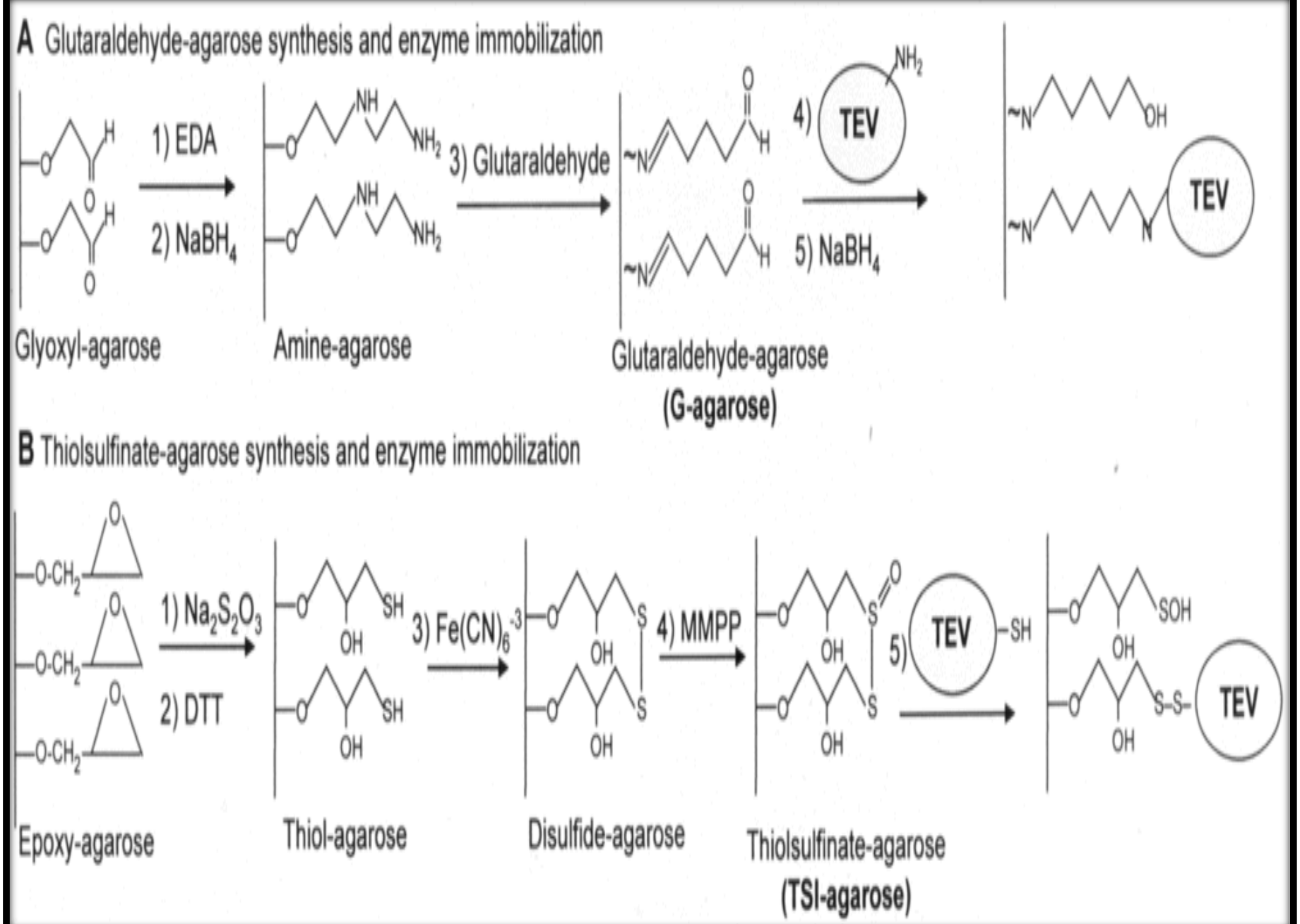
Covalently immobilized enzyme

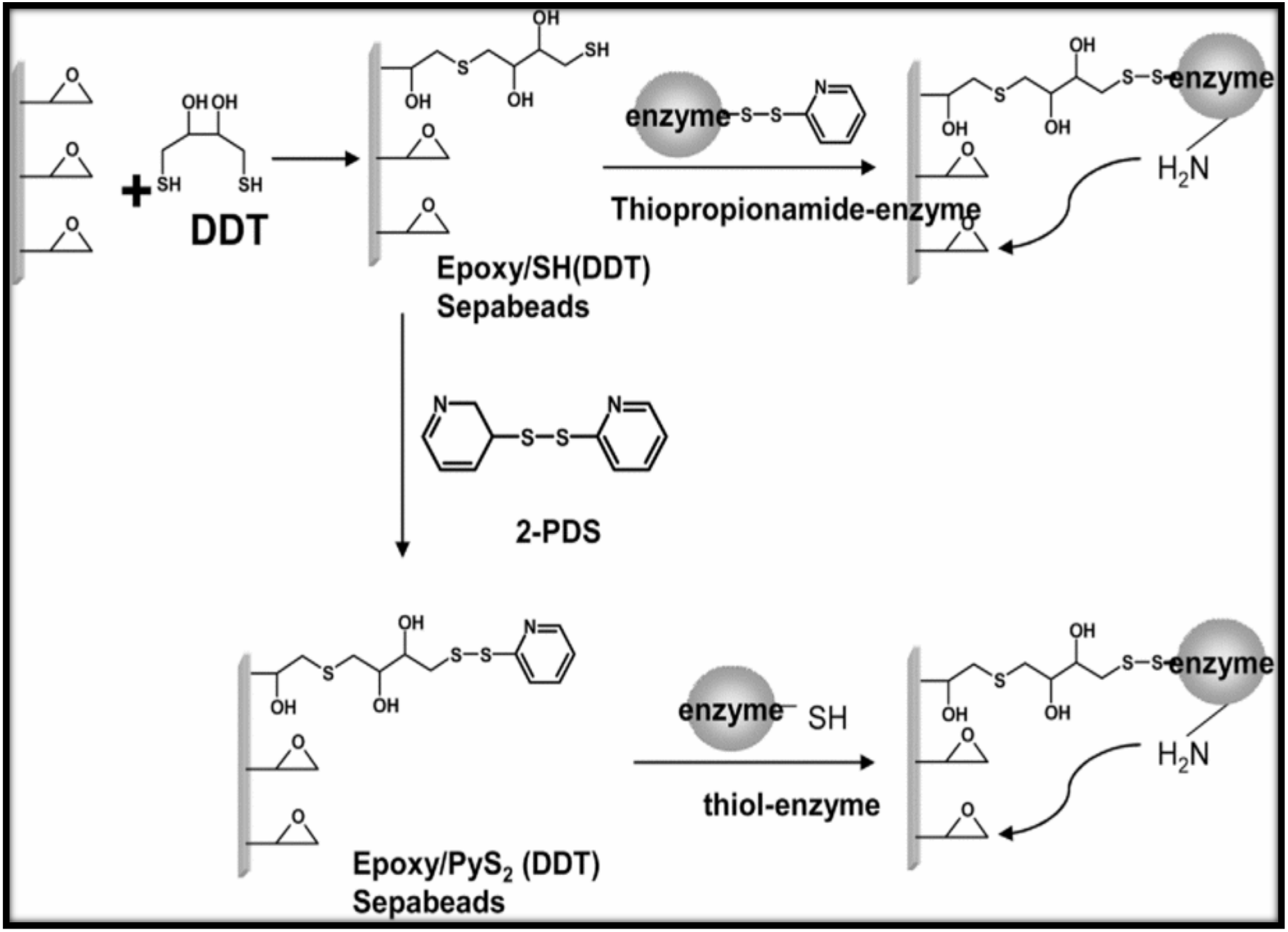
(imino bond formation)

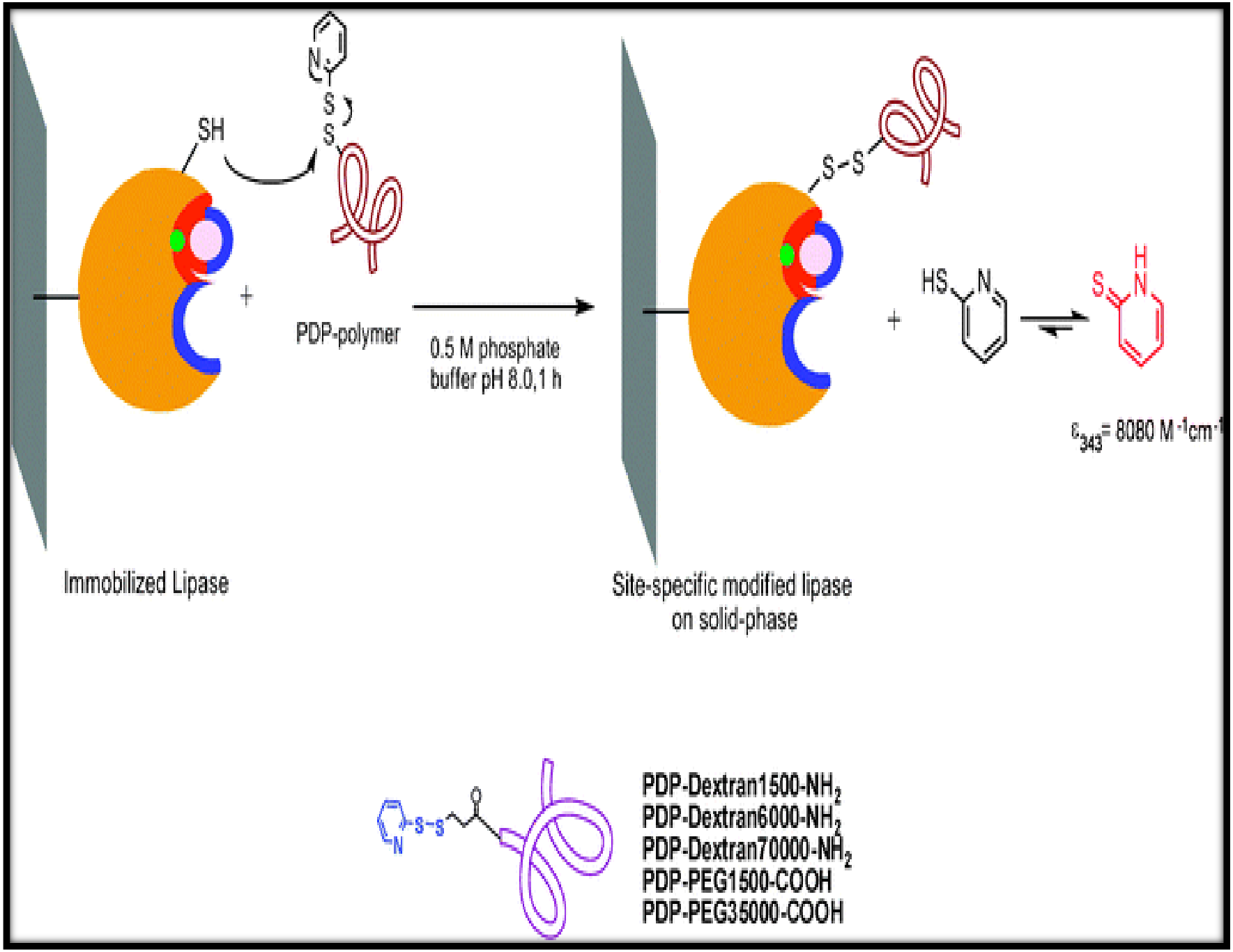

OH
Me
Cl—Si—Me
Me
CH2CH2CH2O
O
C
CH2CH2
CN
C
Me
N=N
C
Me
CN
base
(A)
toluene/styrene
Δ T, -N2
(B)
n

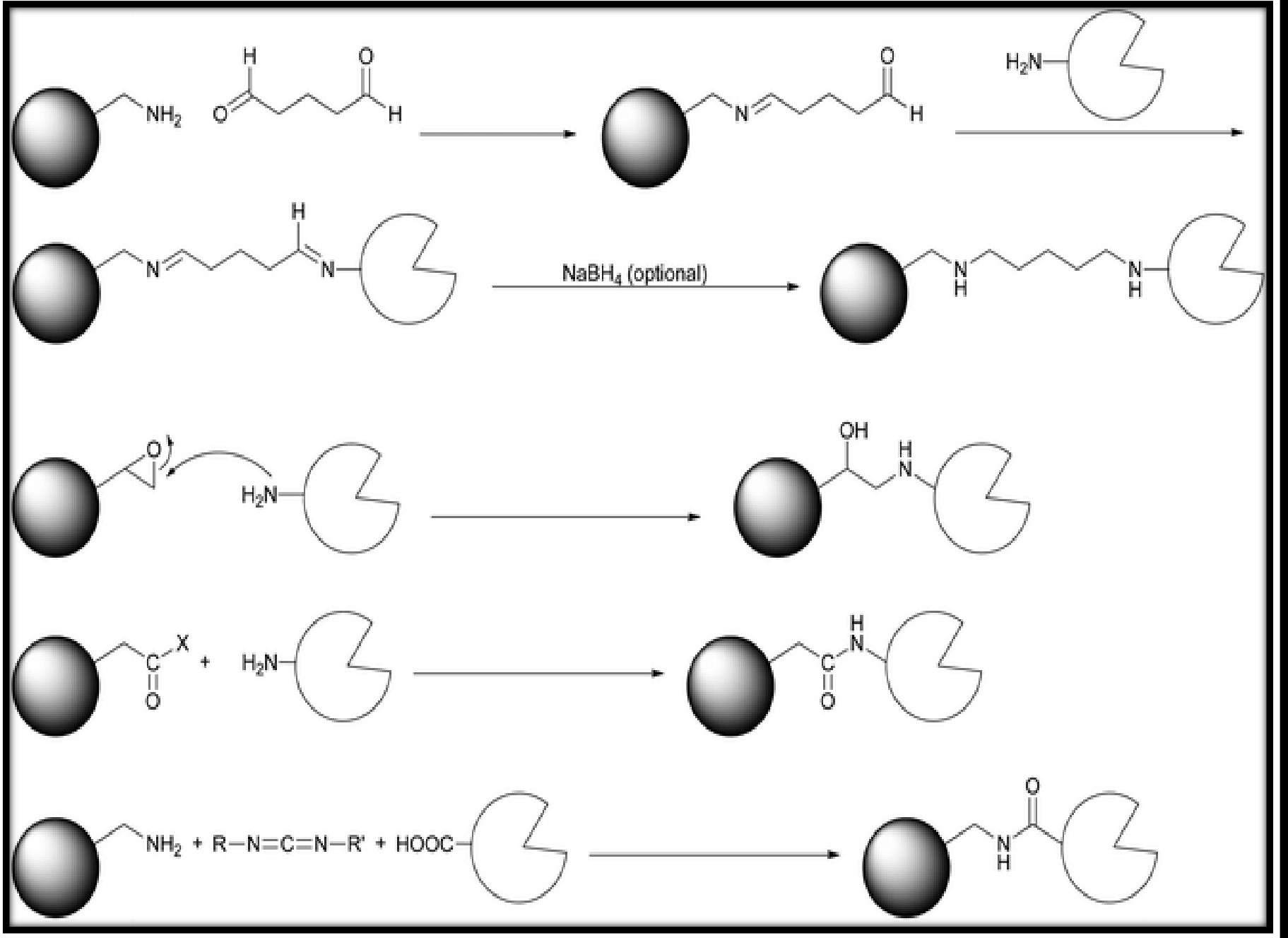

Amine Ligand
(Antibody)
H_2N
Agarose Bead
O
C
H
Aldehyde-activated
Agarose Resin
N
Schiff Base
Bond
$NaCNBH_3$
H
N
C
H
H
Covalently
Immobilized Antibody
Bead
Many Antibodies
Per Bead

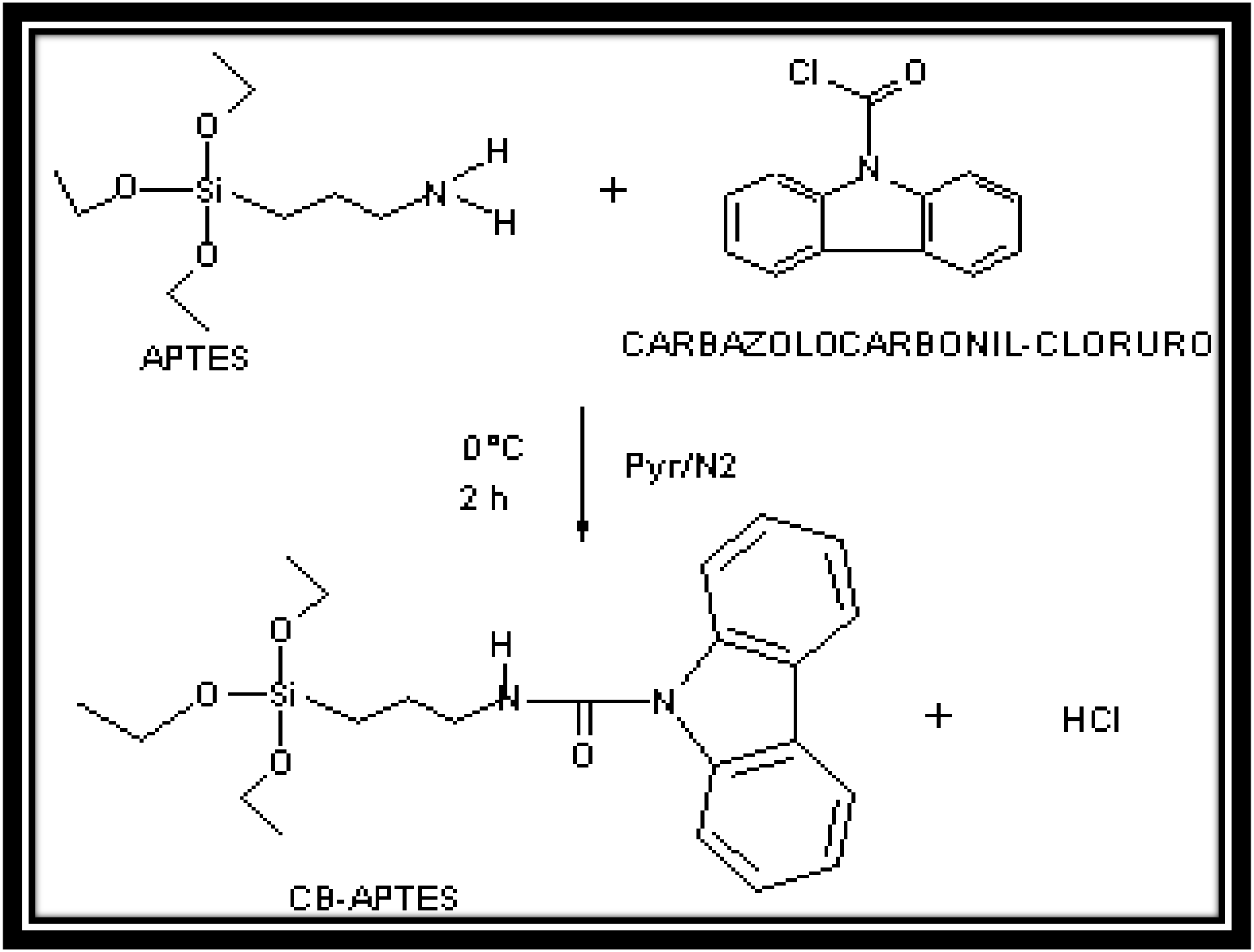

HS
H2N
O
O
O
N
O
O
S
O
N
H

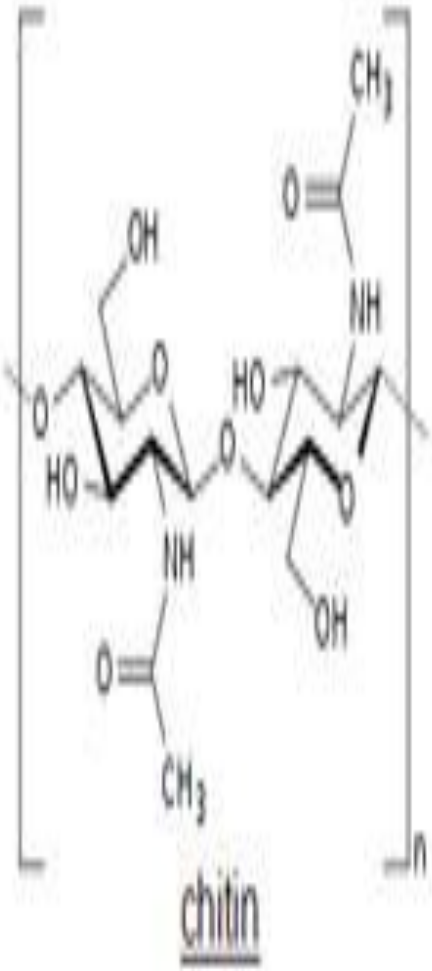

A Glutaraldehyde-agarose synthesis and enzyme immobilization
1) EDA
2) NaBH4
3) Glutaraldehyde
4) TEV
5) NaBH4
Glyoxyl-agarose
Amine-agarose
Glutaraldehyde-agarose
(G-agarose)
B Thiolsulfinate-agarose synthesis and enzyme immobilization
1) Na2S2O3
2) DTT
3) Fe(CN)6-3
4) MMPP
5) TEV
Epoxy-agarose
Thiol-agarose
Disulfide-agarose
Thiolsulfinate-agarose
(TSI-agarose)


DDT
Epoxy/SH(DDT)
Sepabeads
enzyme
Thiopropionamide-enzyme
2-PDS
Epoxy/PyS2 (DDT)
Sepabeads
thiol-enzyme


SH
PDP-polymer
0.5 M phosphate
buffer pH 8.0,1 h
Immobilized Lipase
Site-specific modified lipase
on solid-phase
HS
N
H
N
S
ε_{343}= 8080 $M^{-1}cm^{-1}$
PDP-Dextran1500-NH_2
PDP-Dextran6000-NH_2
PDP-Dextran70000-NH_2
PDP-PEG1500-COOH
PDP-PEG35000-COOH

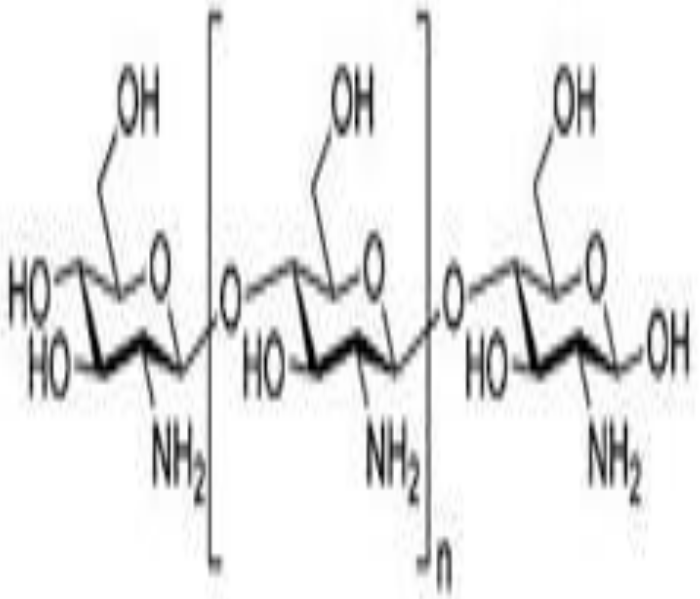

NaBH4 (optional)


APTES
CARBAZOLOCARBONIL-CLORURO
0°C
2 h
Pyr/N2
CB-APTES
HCl

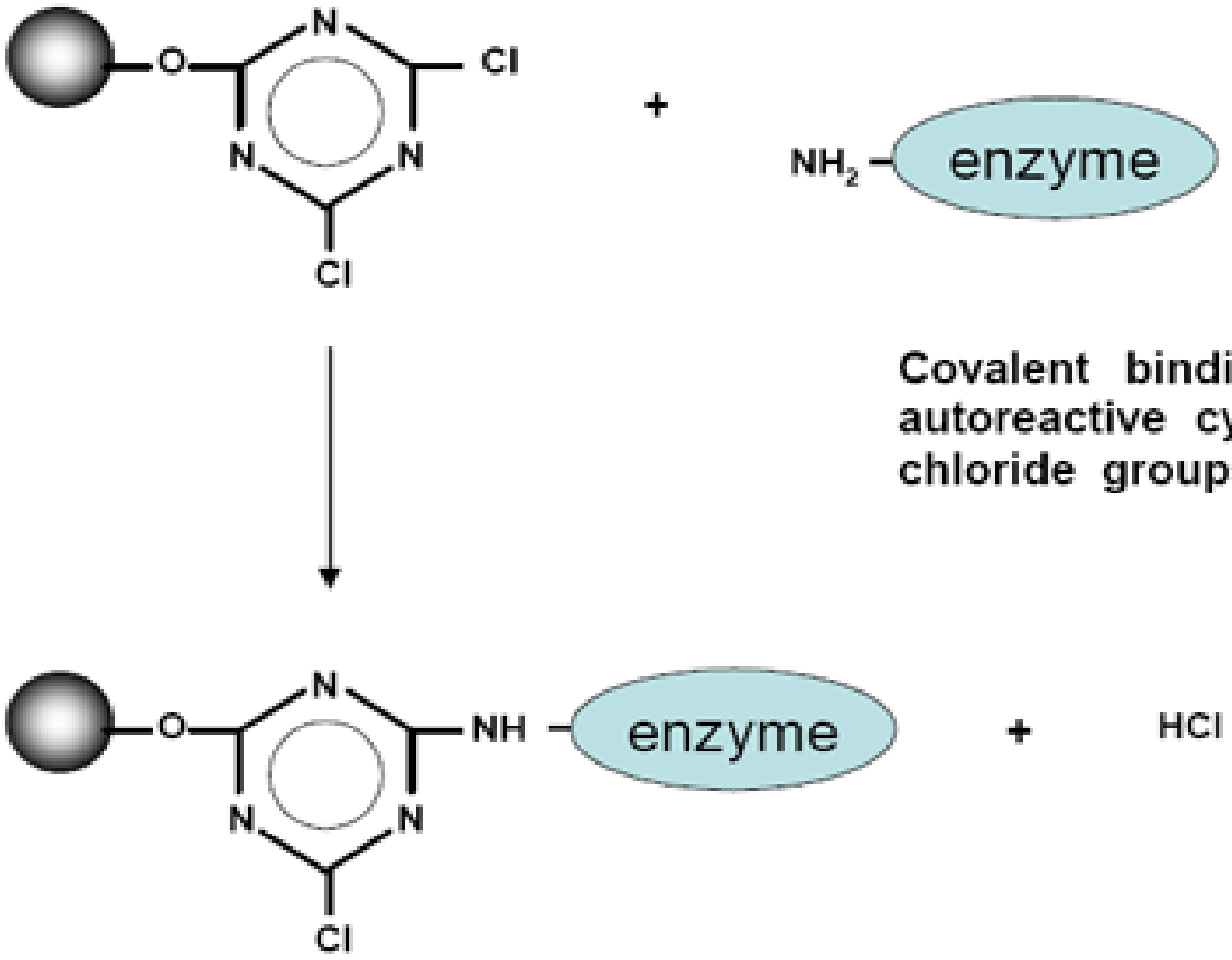


chitin

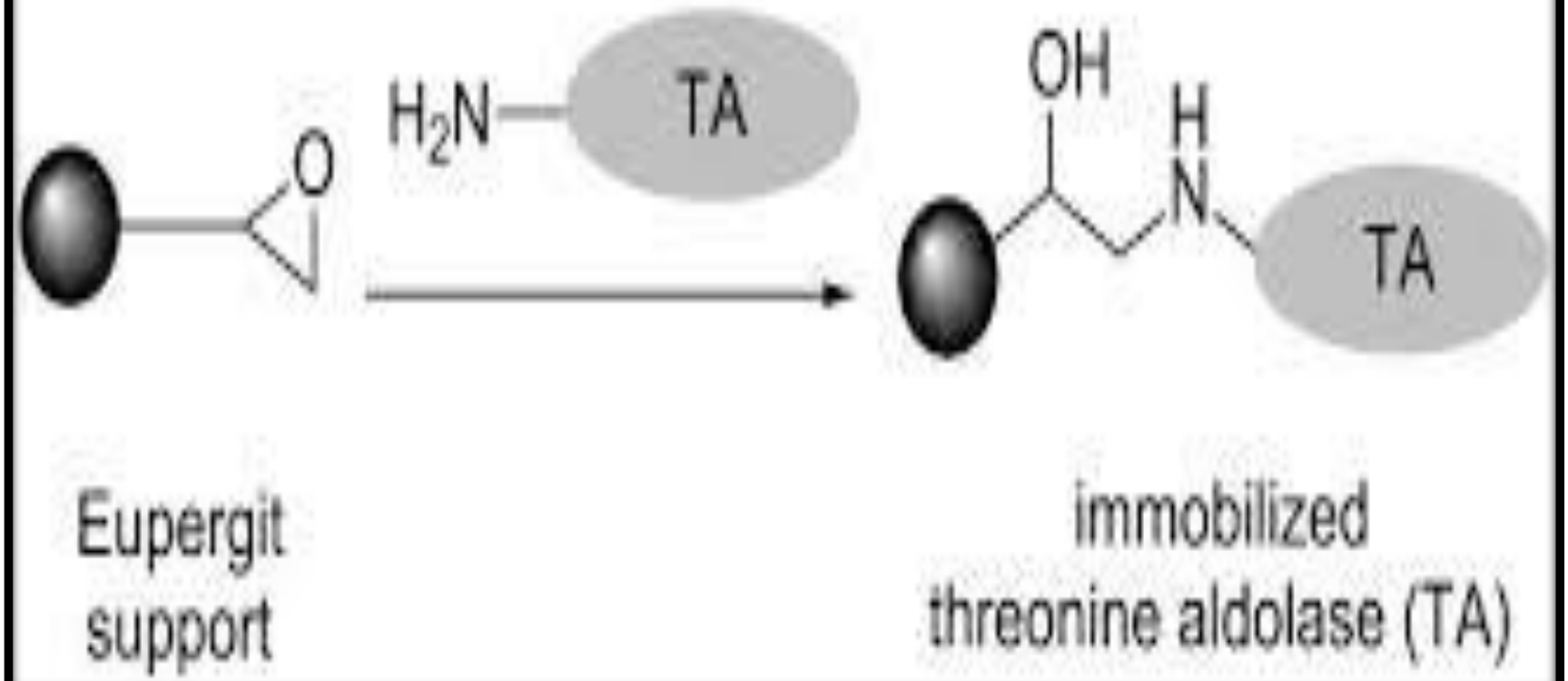
Structure of the chitin molecule, showing two of the *N-acetyl glucosamine* units that repeat to form long chains in β-1,4 linkage.

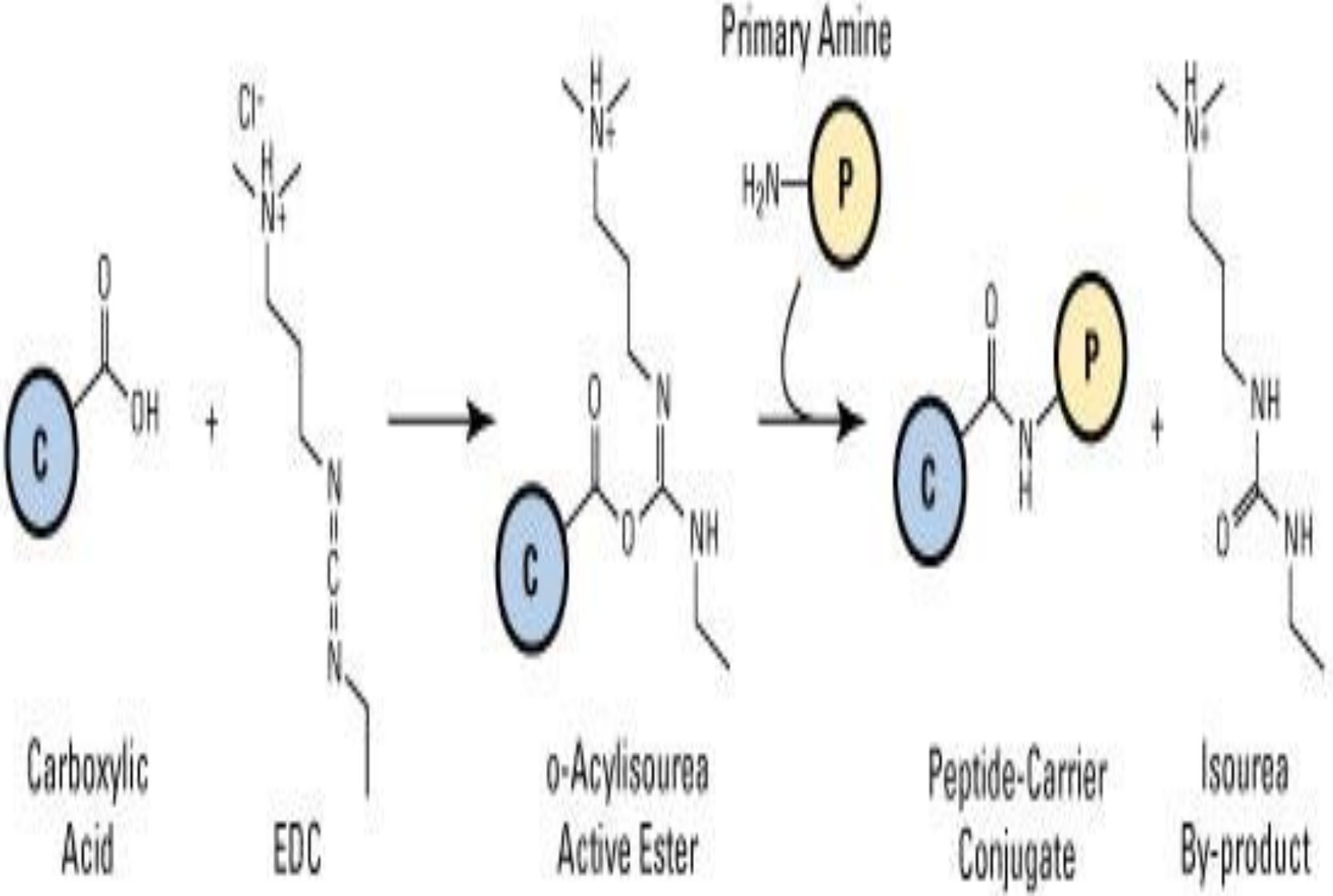


chitosan


N
O
Cl
N
N
Cl
+
NH2
enzyme
Covalent binding on autoreactive cyanuric chloride groups
N
O
NH
enzyme
+
HCl
N
N
Cl

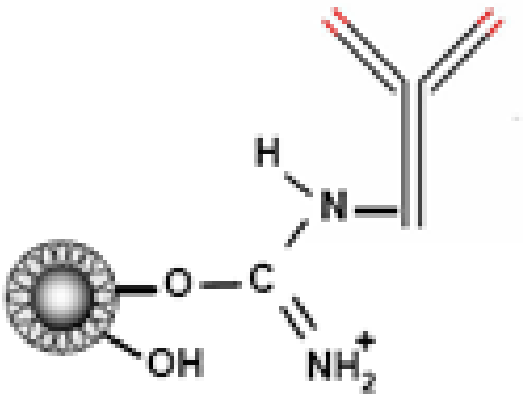
Direct immobilization



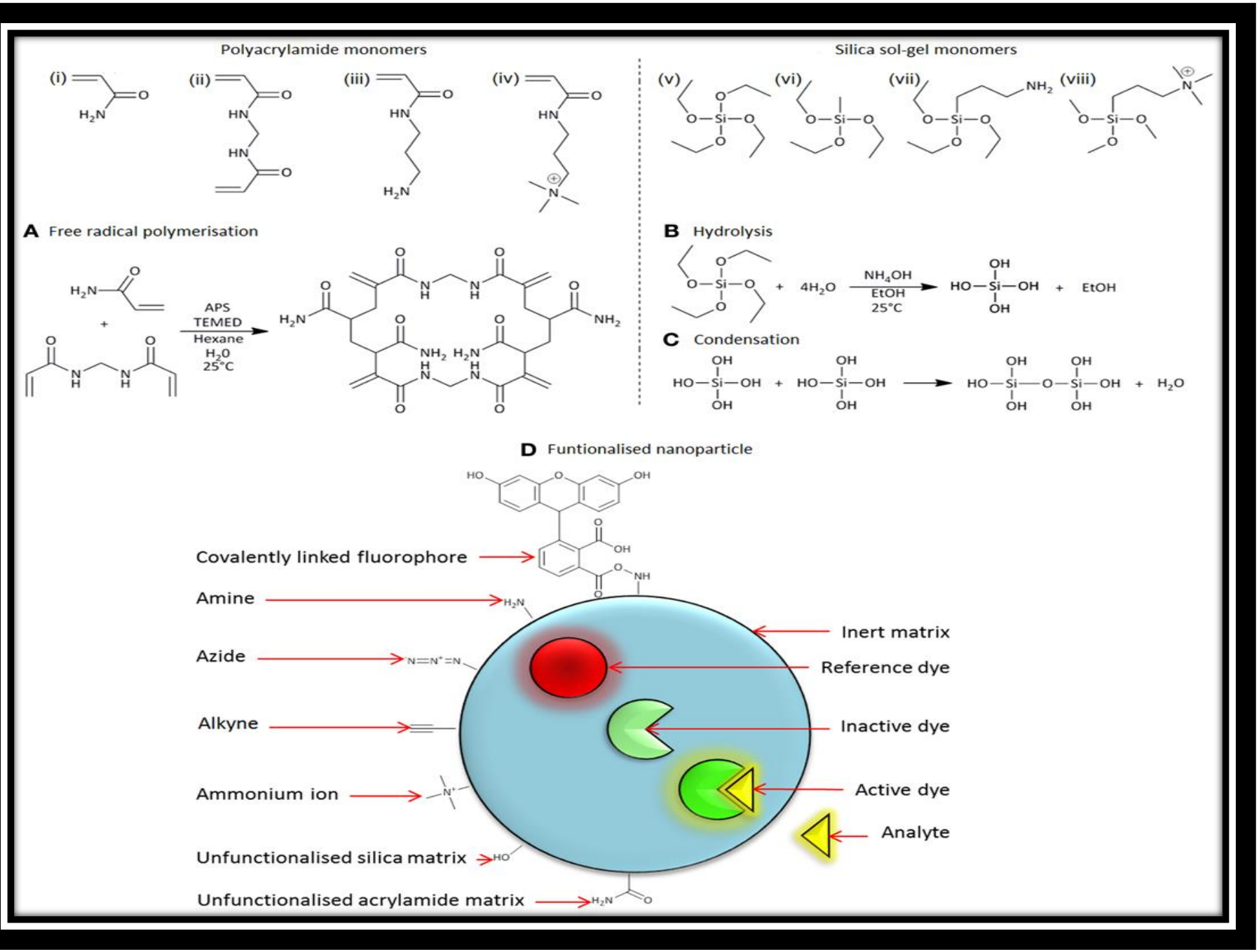

Primary Amine
Carboxylic Acid
EDC
o-Acylisourea Active Ester
Peptide-Carrier Conjugate
Isourea By-product

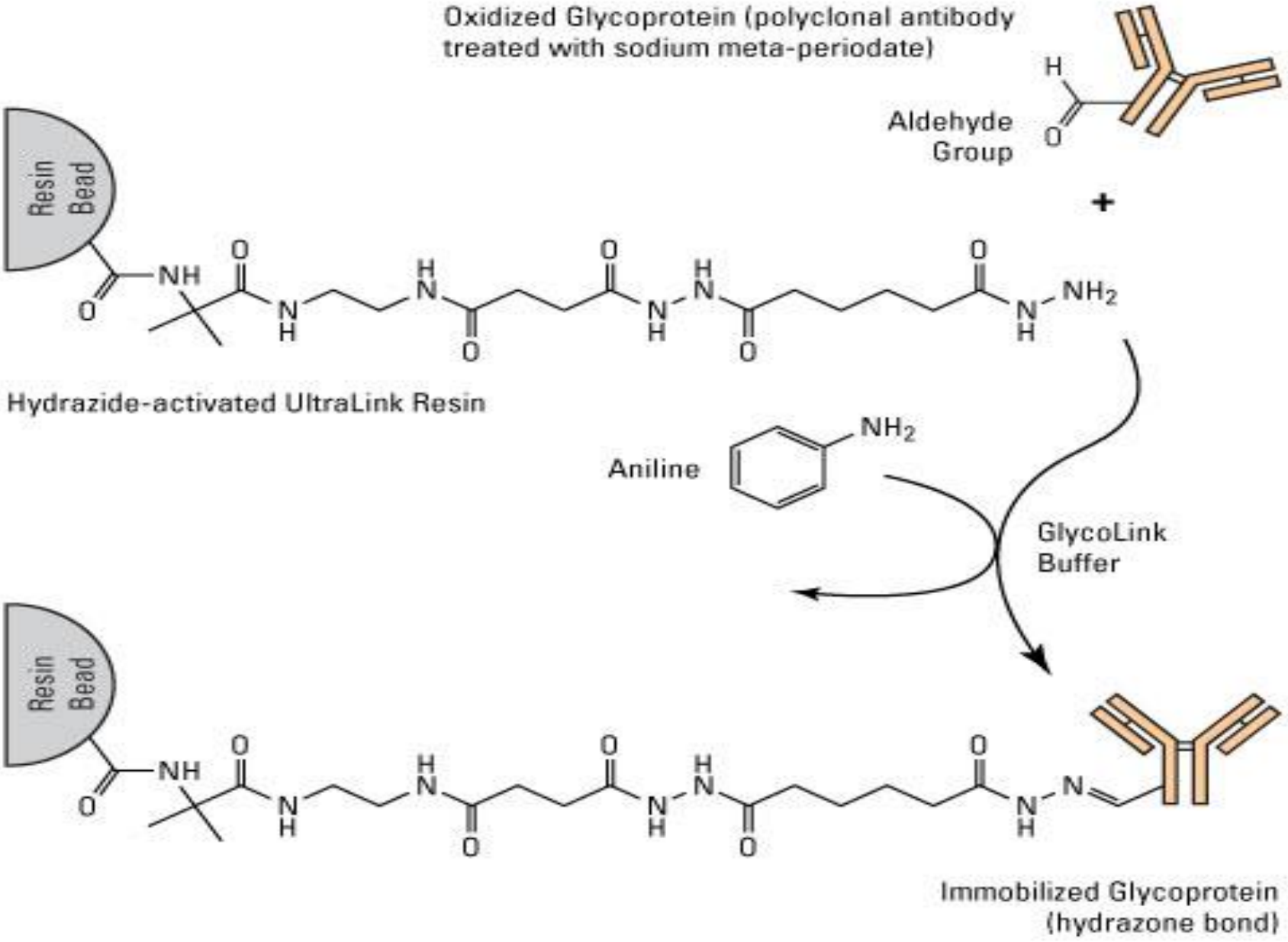
Activation of hydroxyl-groups by cyanogen bromide

Forming of reactive cyanate ester

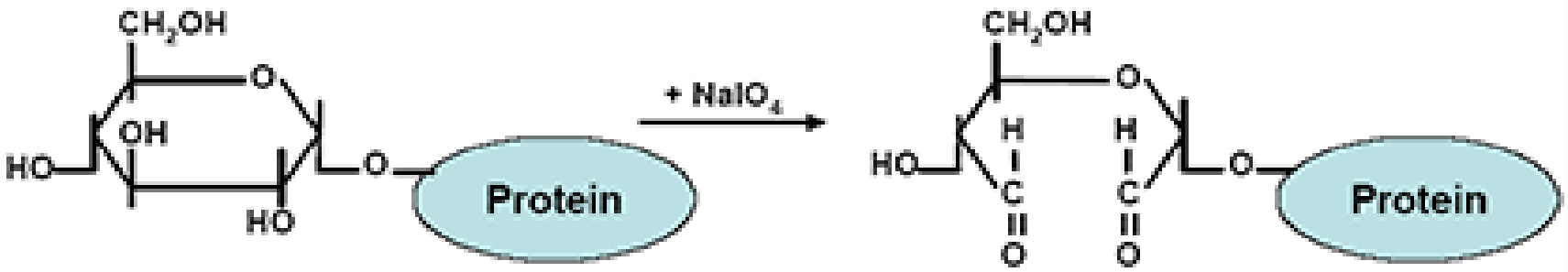


Covalent binding of ligands via amino-groups

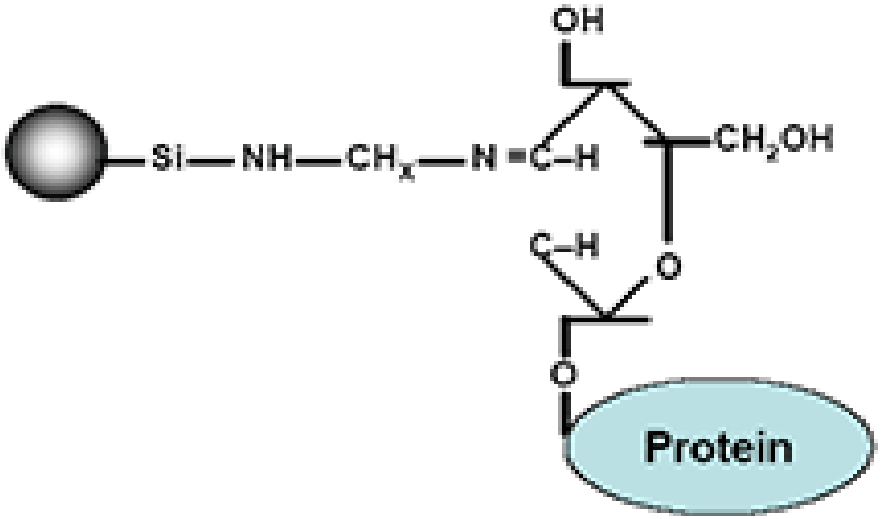

Polyacrylamide monomers
(i)
(ii)
(iii)
(iv)
Silica sol-gel monomers
(v)
(vi)
(vii)
(viii)
A Free radical polymerisation
APS
TEMED
Hexane
H2O
25°C
B Hydrolysis
4H2O
NH4OH
EtOH
25°C
EtOH
C Condensation
D Funtionalised nanoparticle
Covalently linked fluorophore
Amine
Azide
Alkyne
Ammonium ion
Unfunctionalised silica matrix
Unfunctionalised acrylamide matrix
Inert matrix
Reference dye
Inactive dye
Active dye
Analyte


Oxidized Glycoprotein (polyclonal antibody treated with sodium meta-periodate)
Aldehyde Group
Resin Bead
Hydrazide-activated UltraLink Resin
Aniline
GlycoLink Buffer
Resin Bead
Immobilized Glycoprotein (hydrazone bond)

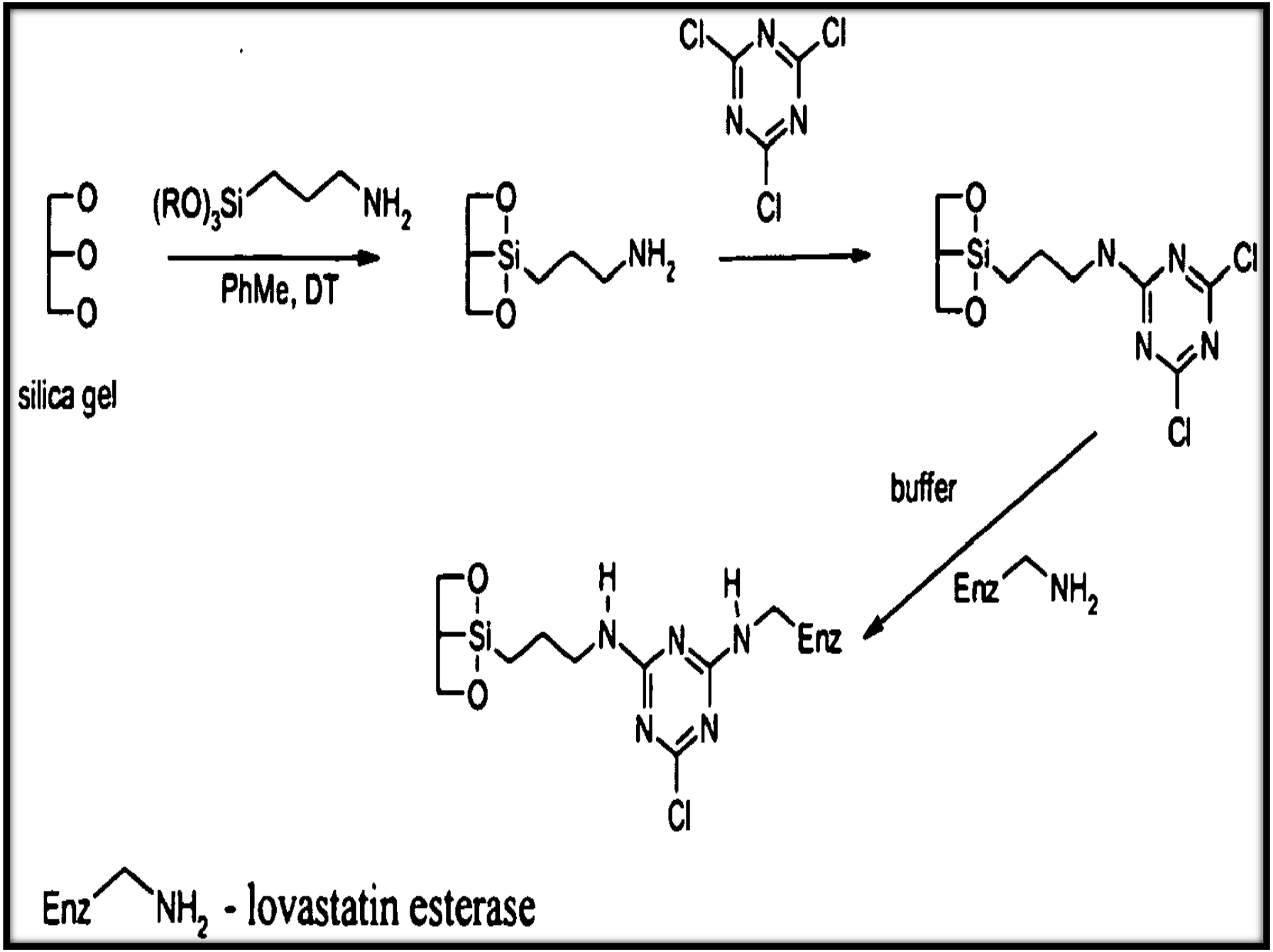
Oxidation of carbohydrate residues



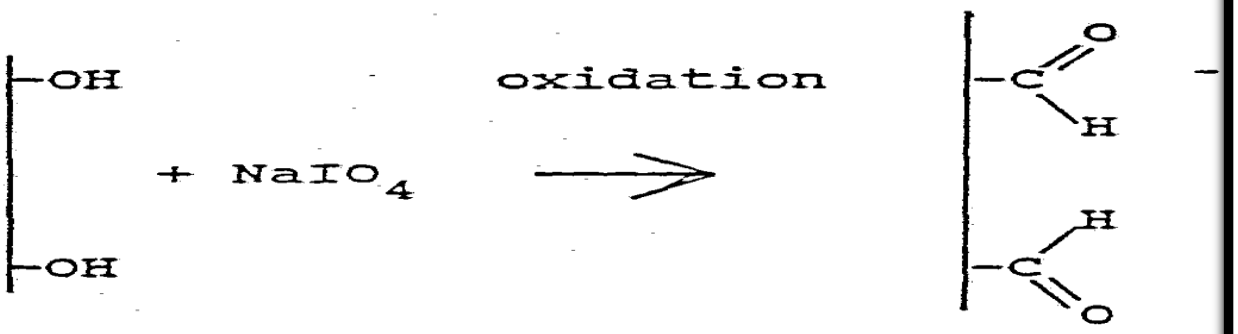
Forming of aldehyde-groups



Site-directed immobilization
through carbohydrates

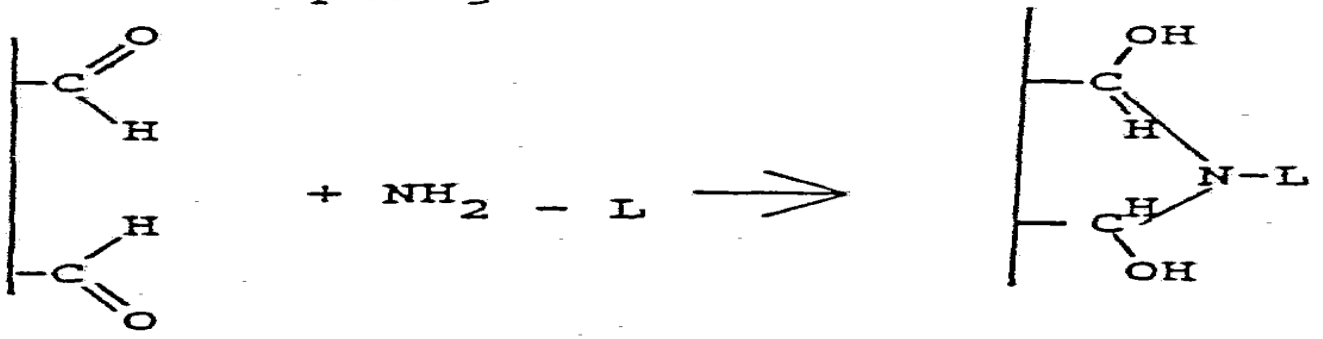

silica gel
(RO)3Si
NH2
PhMe, DT
Cl
N
Cl
N
N
Cl
Si
O
buffer
Enz
NH2
H
Enz - lovastatin esterase

Activation:

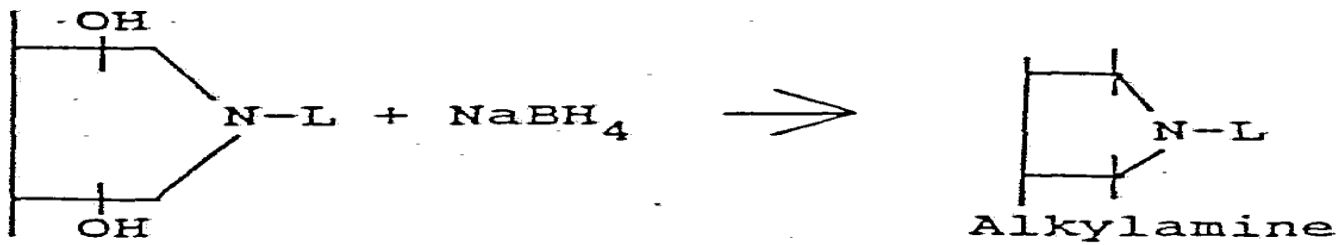


Matrix

Coupling:

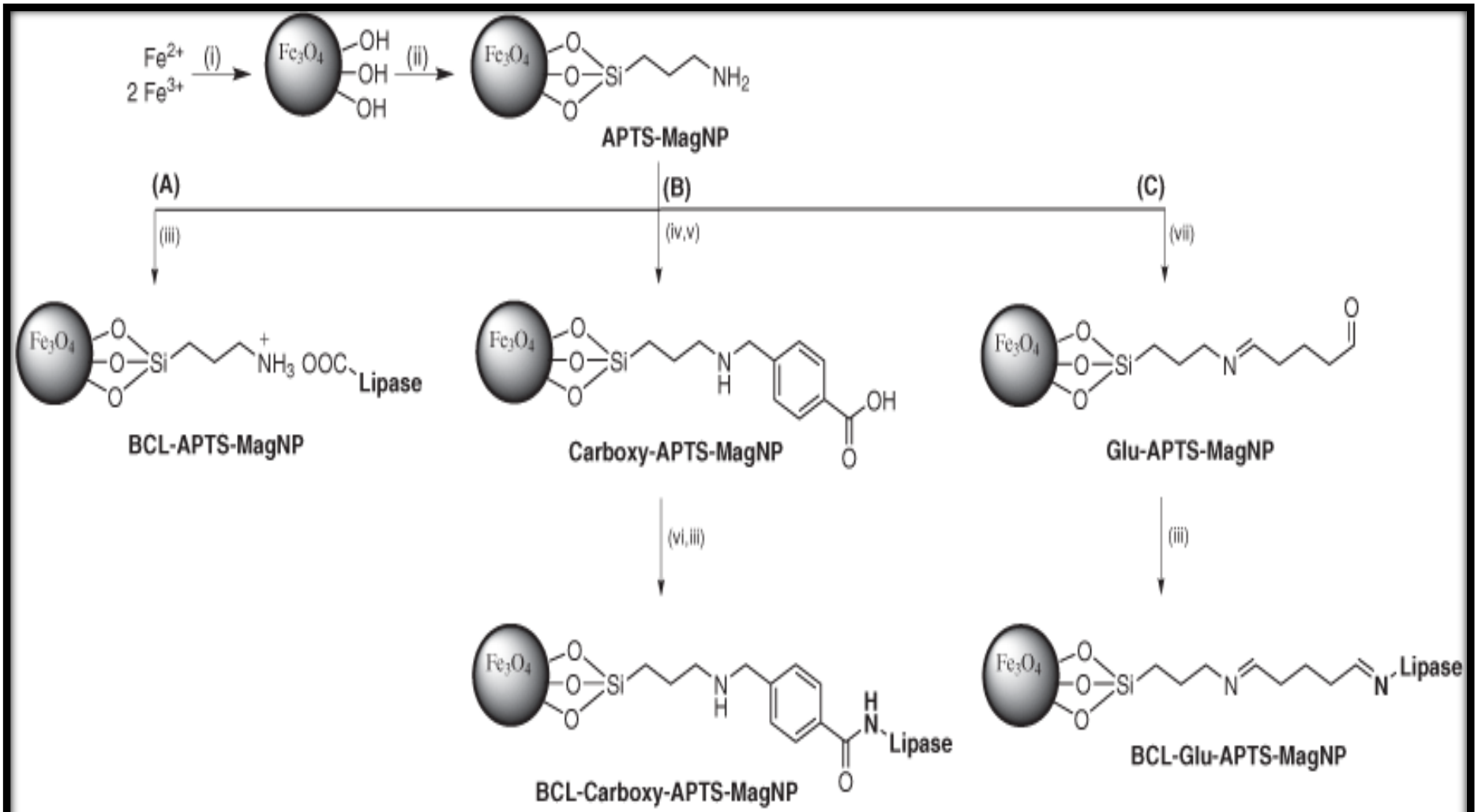


Reduction:

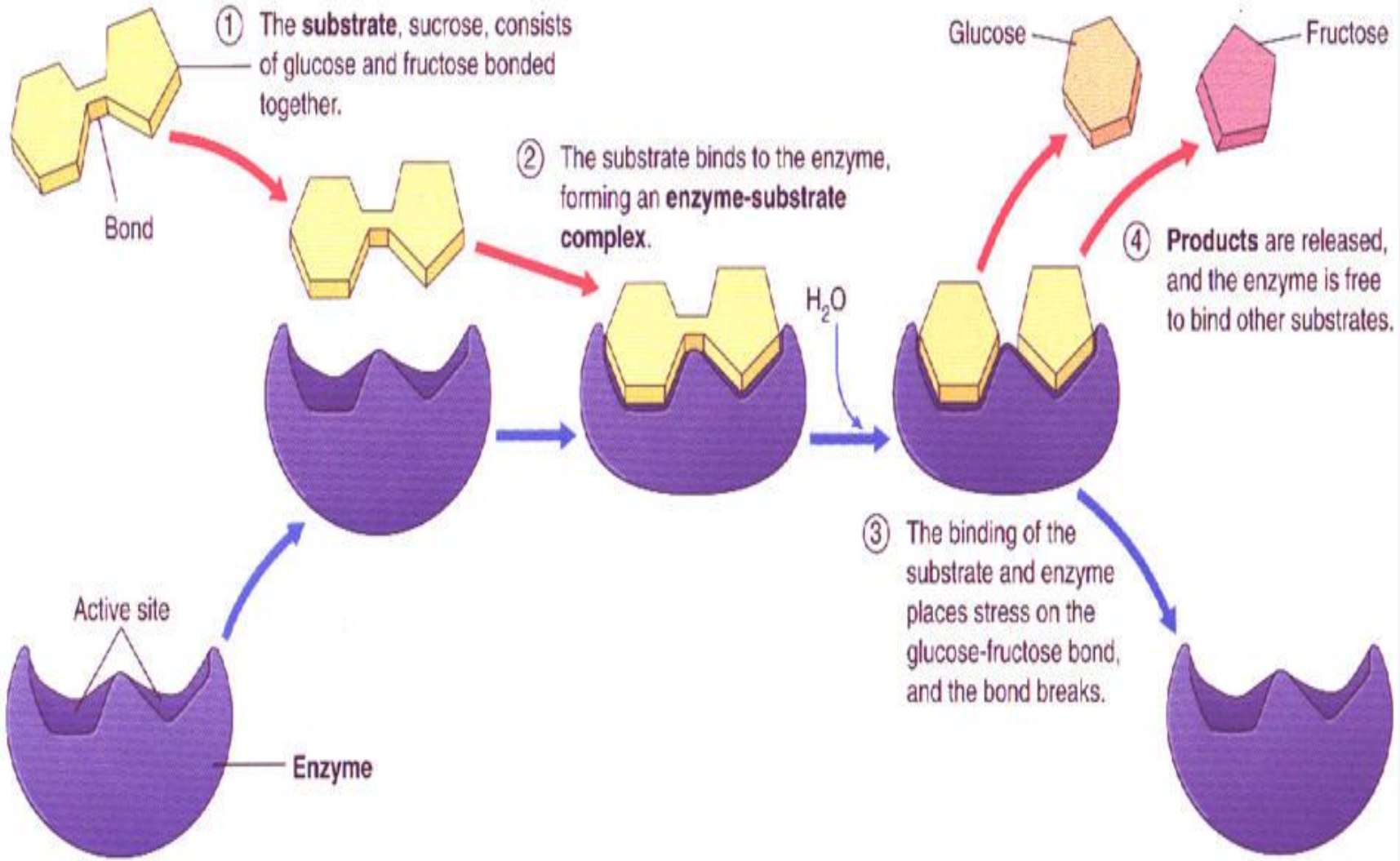


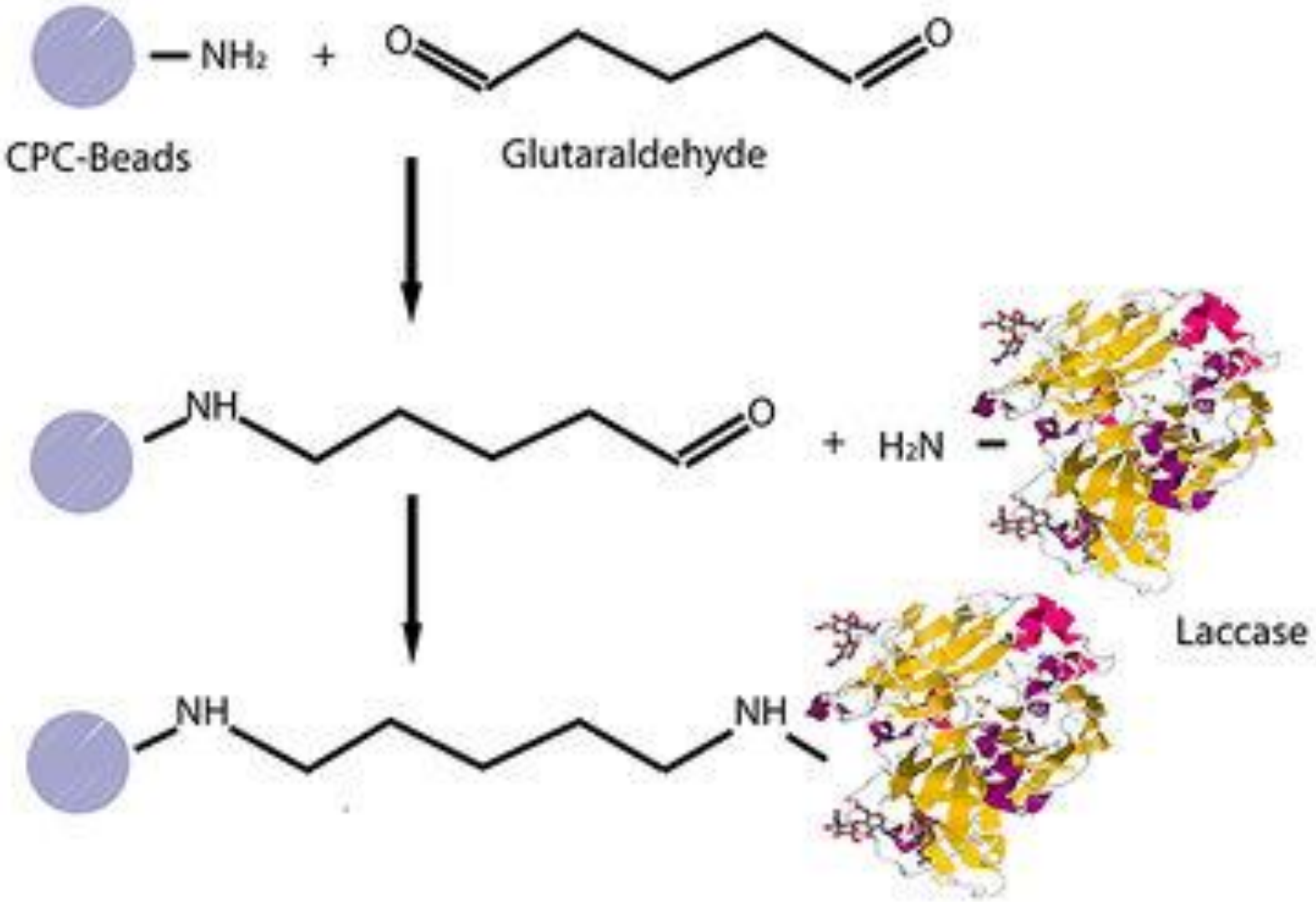
Alkylamine

where L = ligand

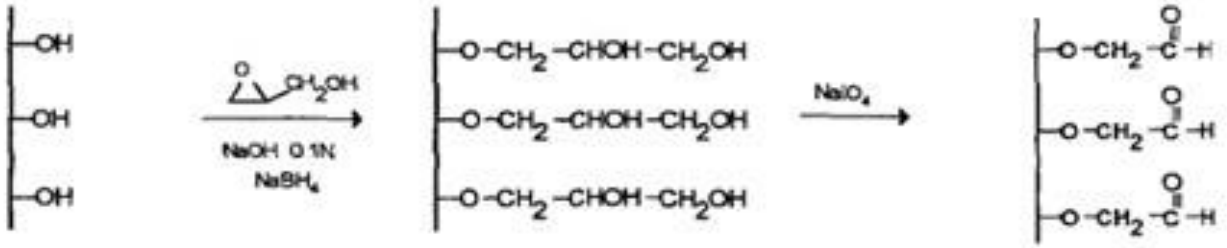


Scheme 1. Immobilization of *B. cepacia* lipase on superparamagnetic nanoparticles (A = Adsorption method; B = Carboxybenzaldehyde method; C = Glutaraldehyde method); (i) Fe^{2+}/Fe^{3+} oxides, NaOH (0.5 mol L^{-1}), 0.5 h; (ii) (3-aminopropyl)trimethoxysilane, 12 h; (iii) *B. cepacia* lipase (550 µg lipase/mL), 1 h; (iv) 4-carboxybenzaldehyde, 4 h; (v) $NaBH_4$, 1 h; (vi) 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride, 20 min.; (vii) glutaraldehyde, 2 h.


① The substrate, sucrose, consists of glucose and fructose bonded together.
Bond
② The substrate binds to the enzyme, forming an enzyme-substrate complex.
H_2O
③ The binding of the substrate and enzyme places stress on the glucose-fructose bond, and the bond breaks.
④ Products are released, and the enzyme is free to bind other substrates.
Glucose
Fructose
Active site
Enzyme


NH₂
+
O
O
CPC-Beads
Glutaraldehyde
NH
O
+ H₂N
NH
NH
Laccase

ACTIVATION OF THE SUPPORT

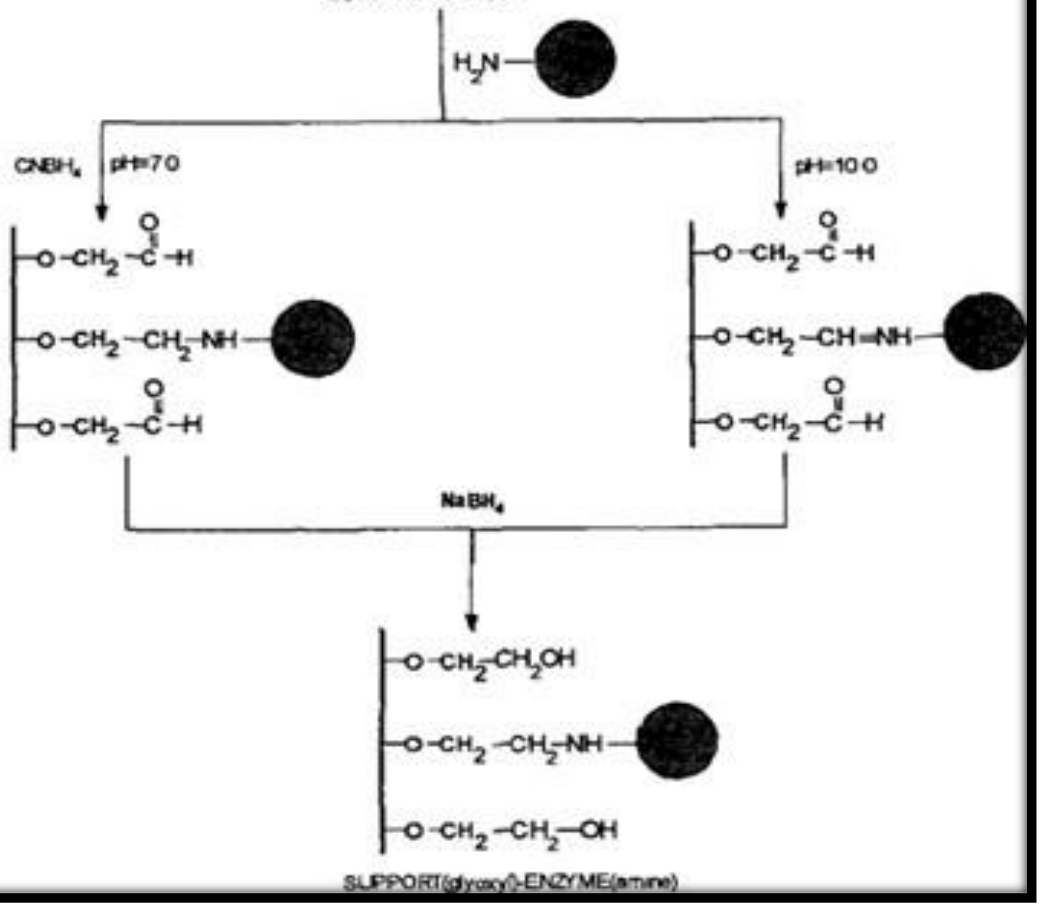


AGAROSE GEL

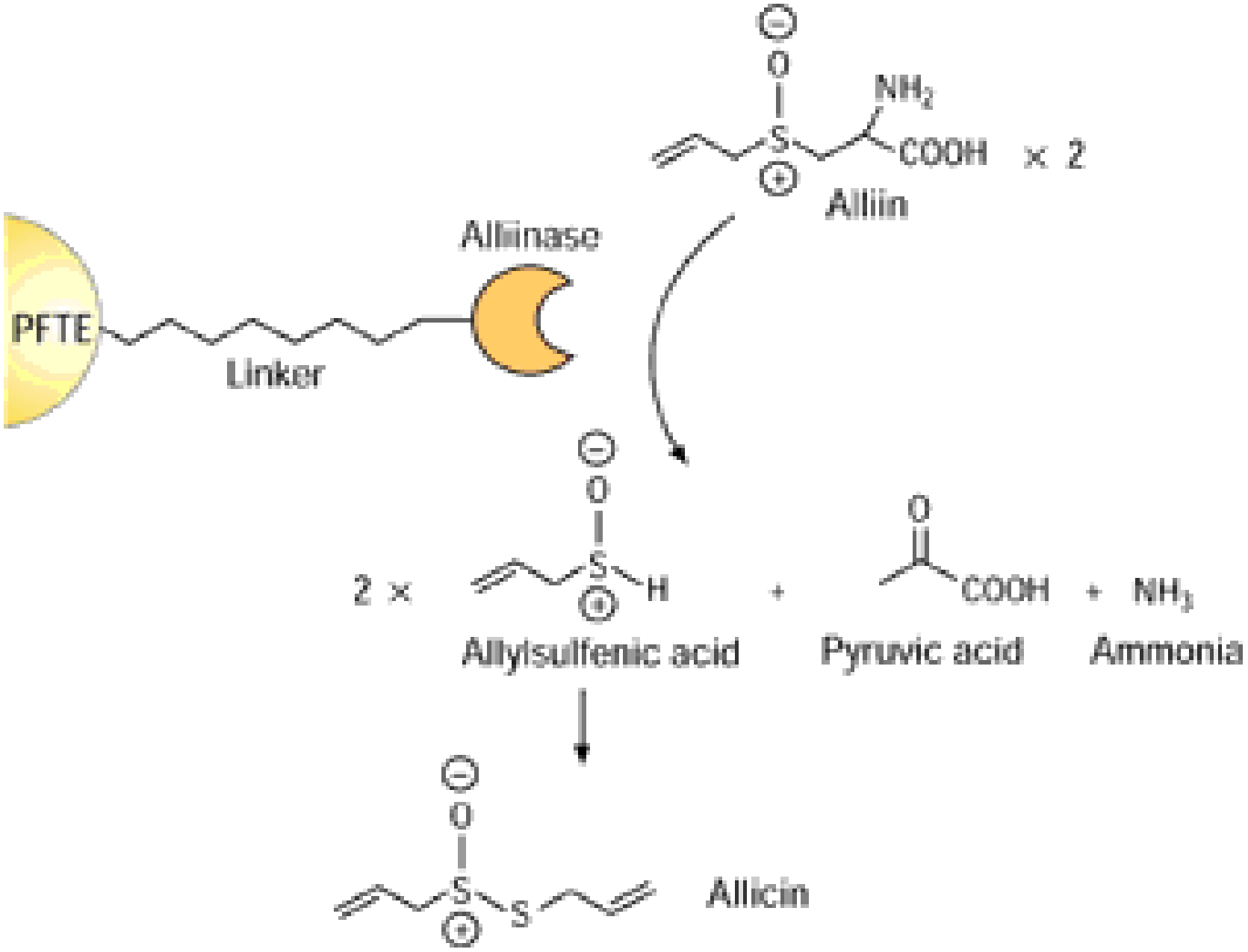
GLYCERYL-AGAROSE

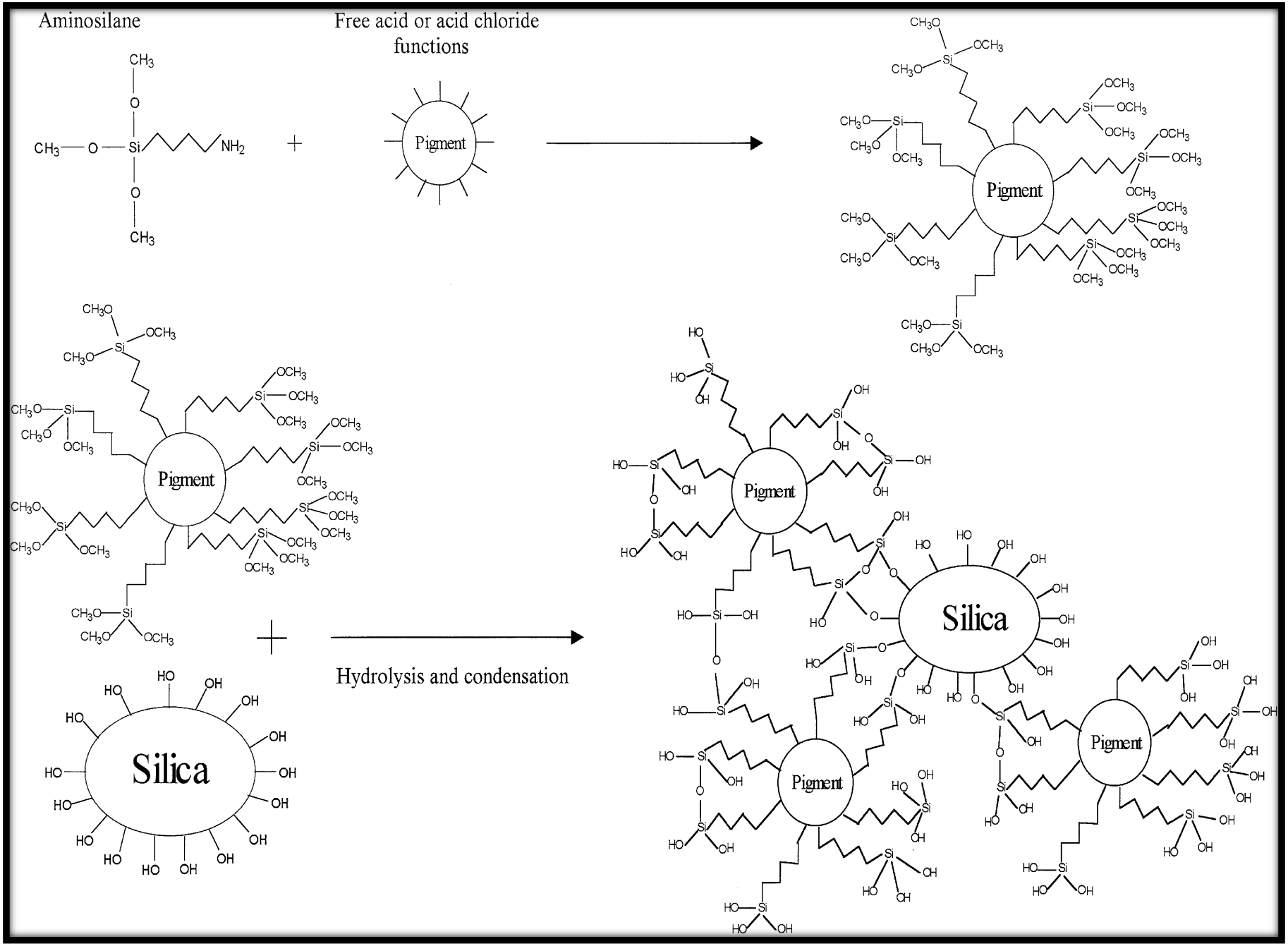
GLYOXYL-AGAROSE

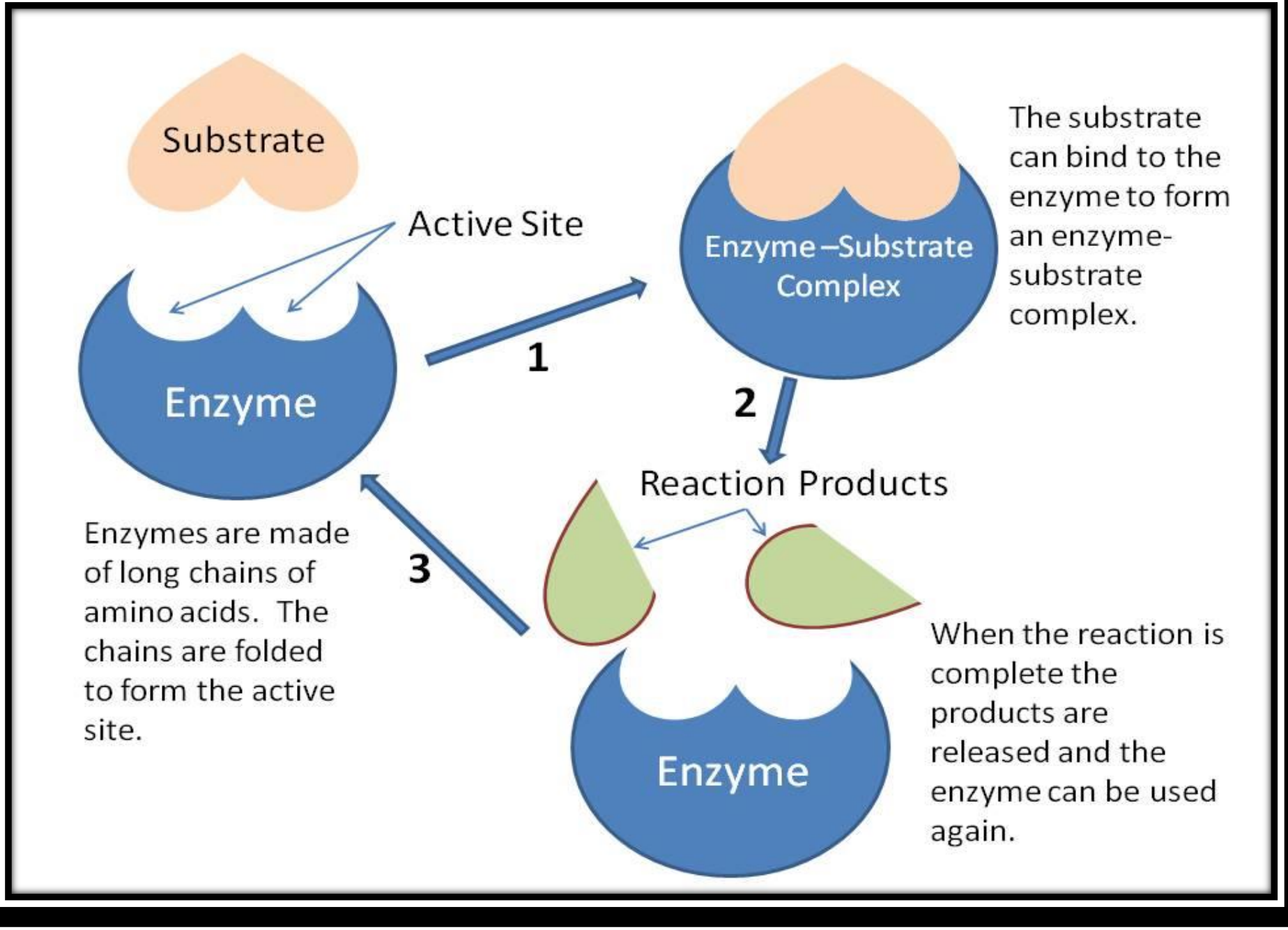
ENZYME IMMOBILIZATION

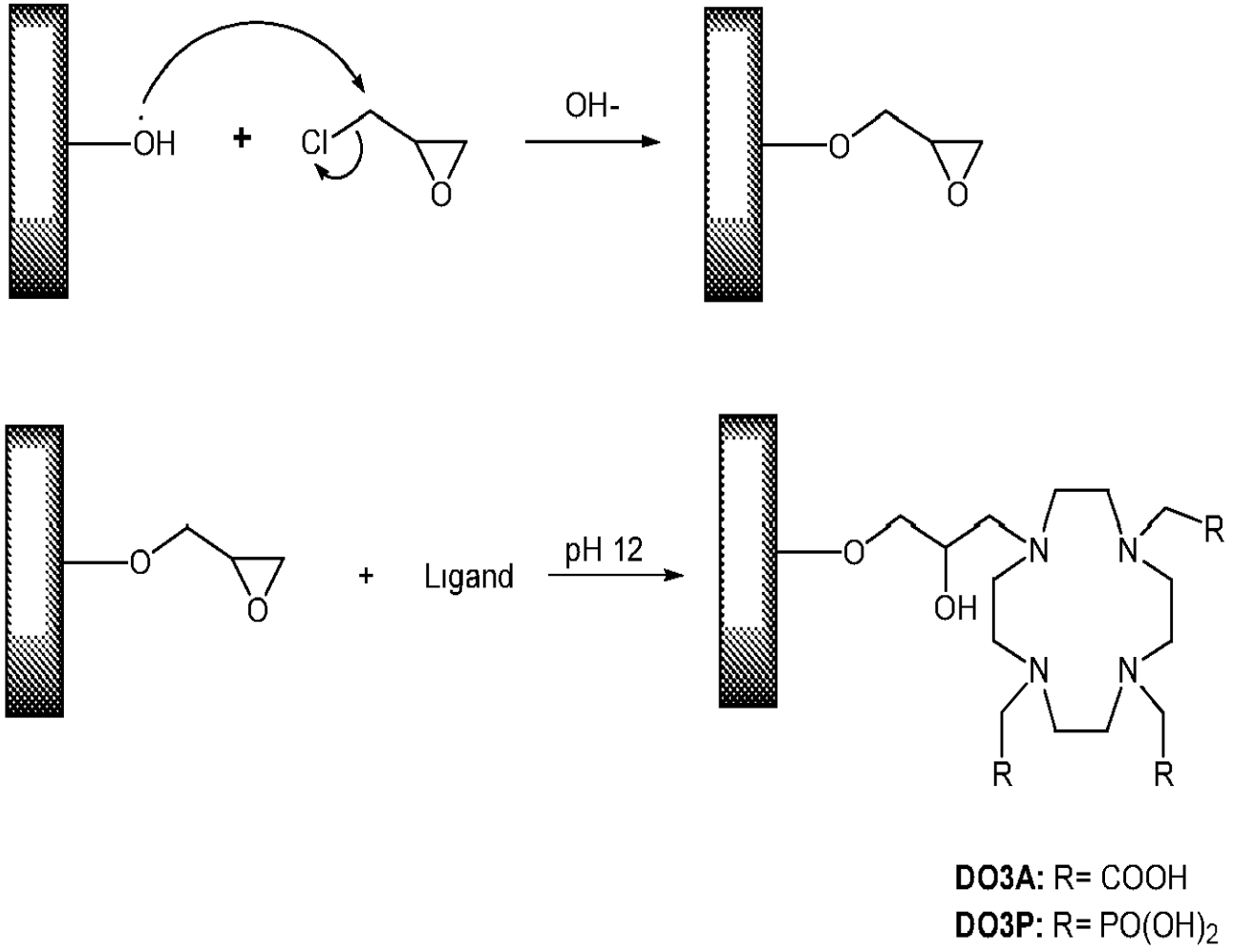


END POINT IMMOBILIZATION


NH2
COOH
x 2
Alliin
Alliinase
PFTE
Linker
2 x
H
+
COOH
+ NH3
Allylsulfenic acid
Pyruvic acid
Ammonia
Allicin


Aminosilane
Free acid or acid chloride functions
Pigment
Silica
Hydrolysis and condensation


Substrate
Active Site
Enzyme
1
Enzyme –Substrate Complex
The substrate can bind to the enzyme to form an enzyme-substrate complex.
2
Reaction Products
Enzymes are made of long chains of amino acids. The chains are folded to form the active site.
3
Enzyme
When the reaction is complete the products are released and the enzyme can be used again.



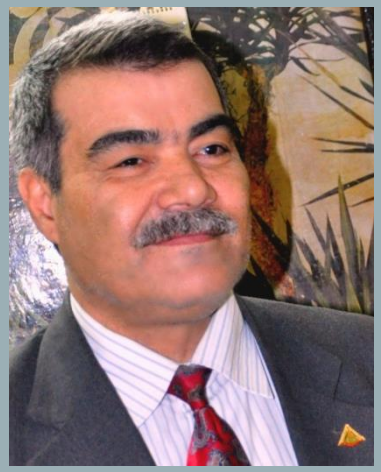
Scheme 6. Schematic representation of ligand immobilisation

محاضرات
كيمياء الأنزيمات وتحميلها
المستوي الثالث (البيوتكنولوجي)
المحاضرة الحادية عشر

اعداد

أ.د/ فرحات فودة علي فودة

أستاذ الكيمياء الحيوية



٤- التفاعل بين الجلوترالدهيد والانزيم الذى يحتوى على amio group - للحامض الامينى ليسين وتعرف هذة الطريقة بالارتباط التساهمى Cross Linking ويوضح التفاعل التالى المعادلات الكيميائية وكذلك الشكل الذى يوضح فعل مادة الجلوترالدهيد التى تقوم بفعل Cross Linking

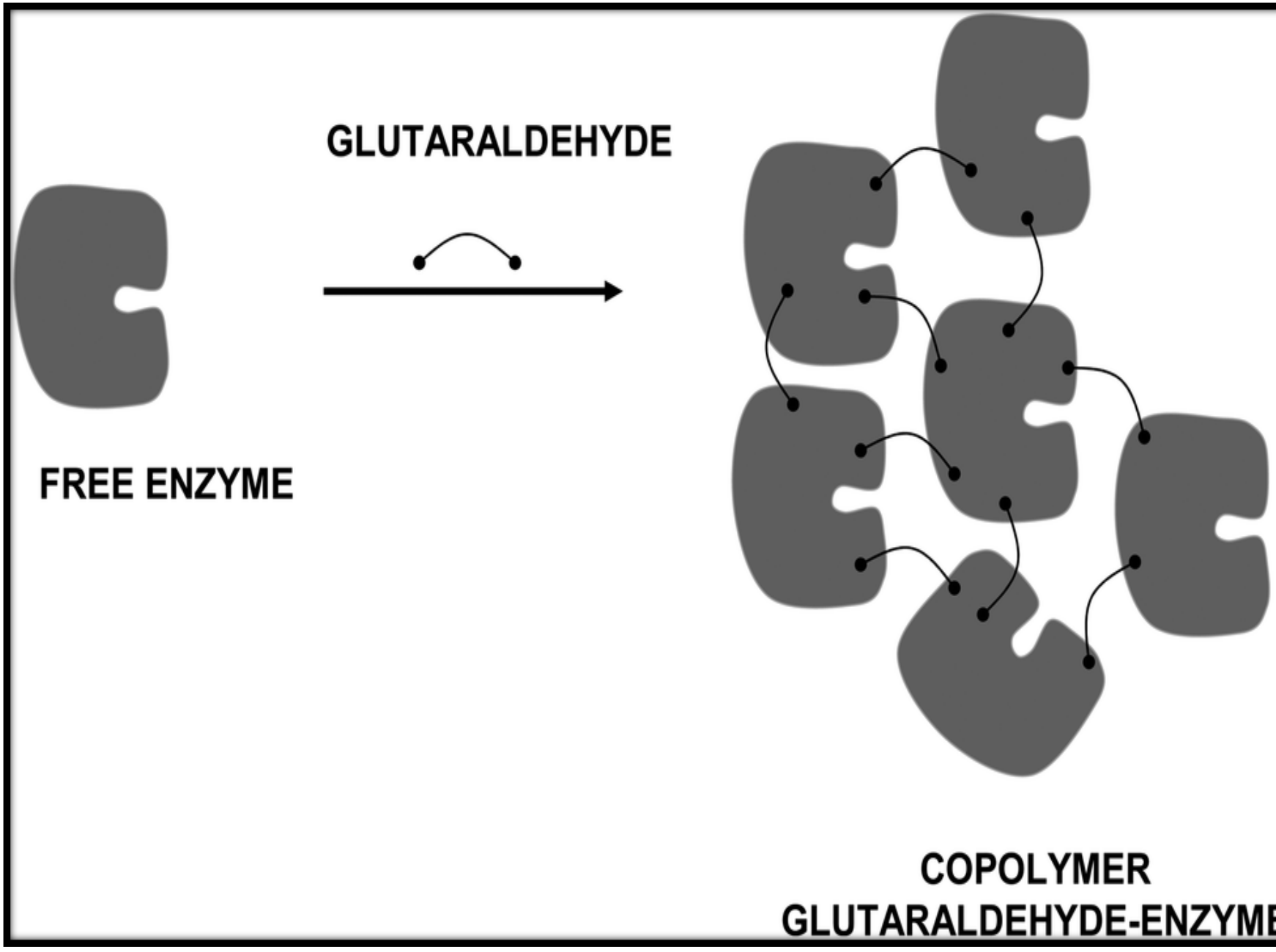
1) $R\text{-}NH_2 + CHO\text{-}(CH_2)_3\text{-}CHO \rightarrow R\text{-}N{=}CH\text{-}(CH_2)_3\text{-}CHO$

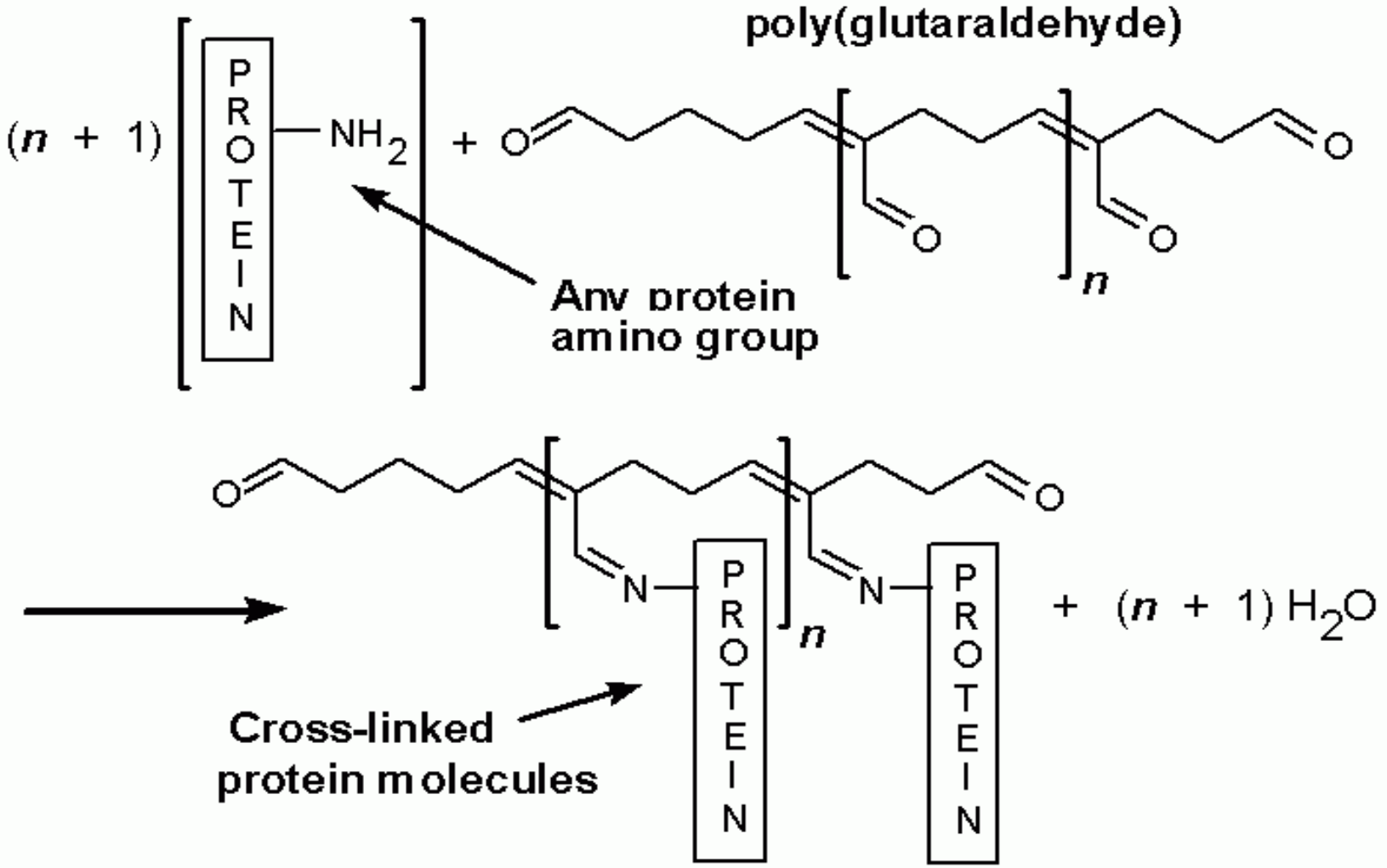
2) $R\text{-}N{=}CH\text{-}(CH_2)_3\text{-}CHO + NH2\text{-}Enzyme \longrightarrow$

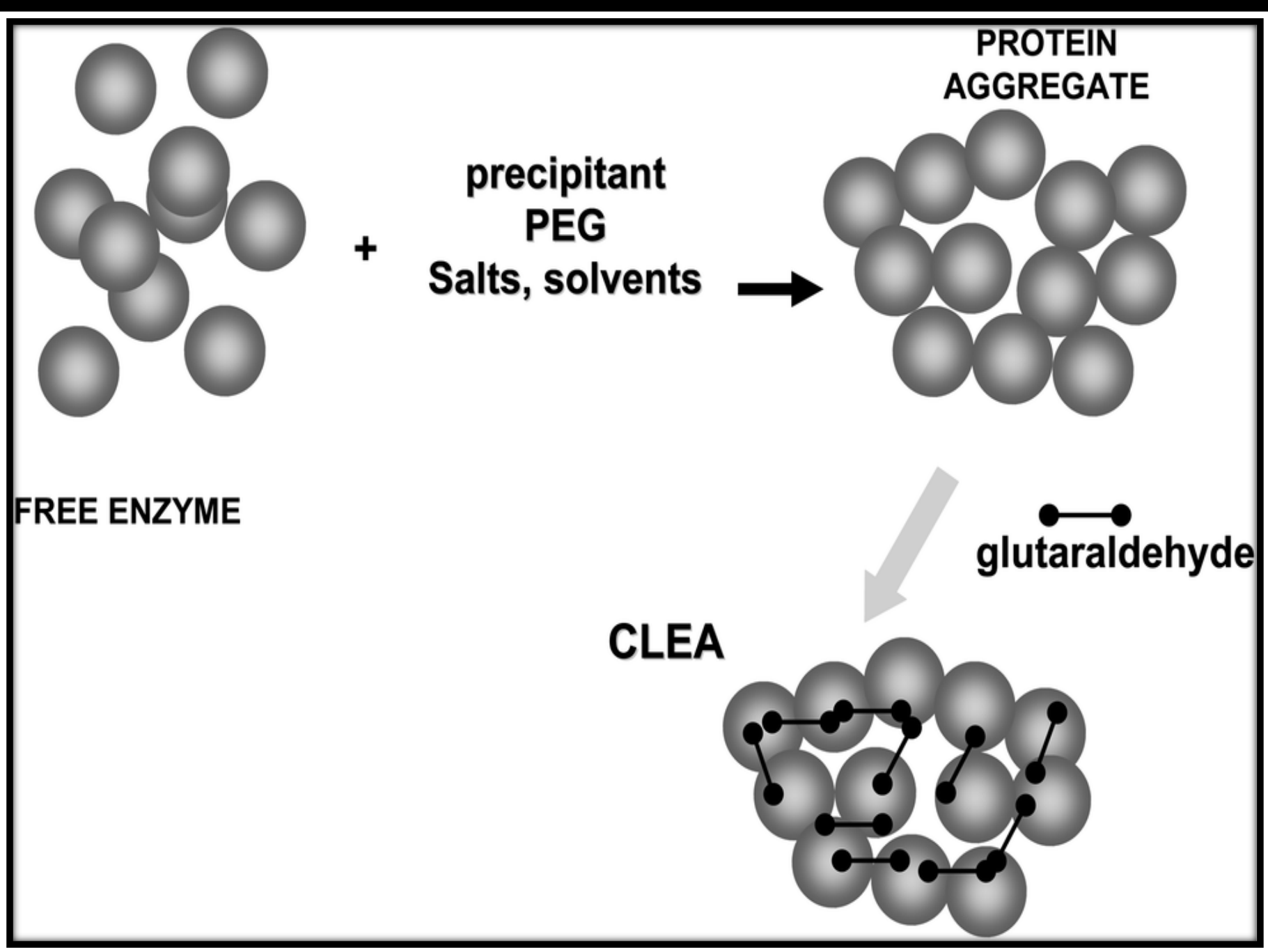
$R\text{-}N{=}CH\text{-}(CH_2)_3\text{-}CH{=}N\text{-}Enzyme$

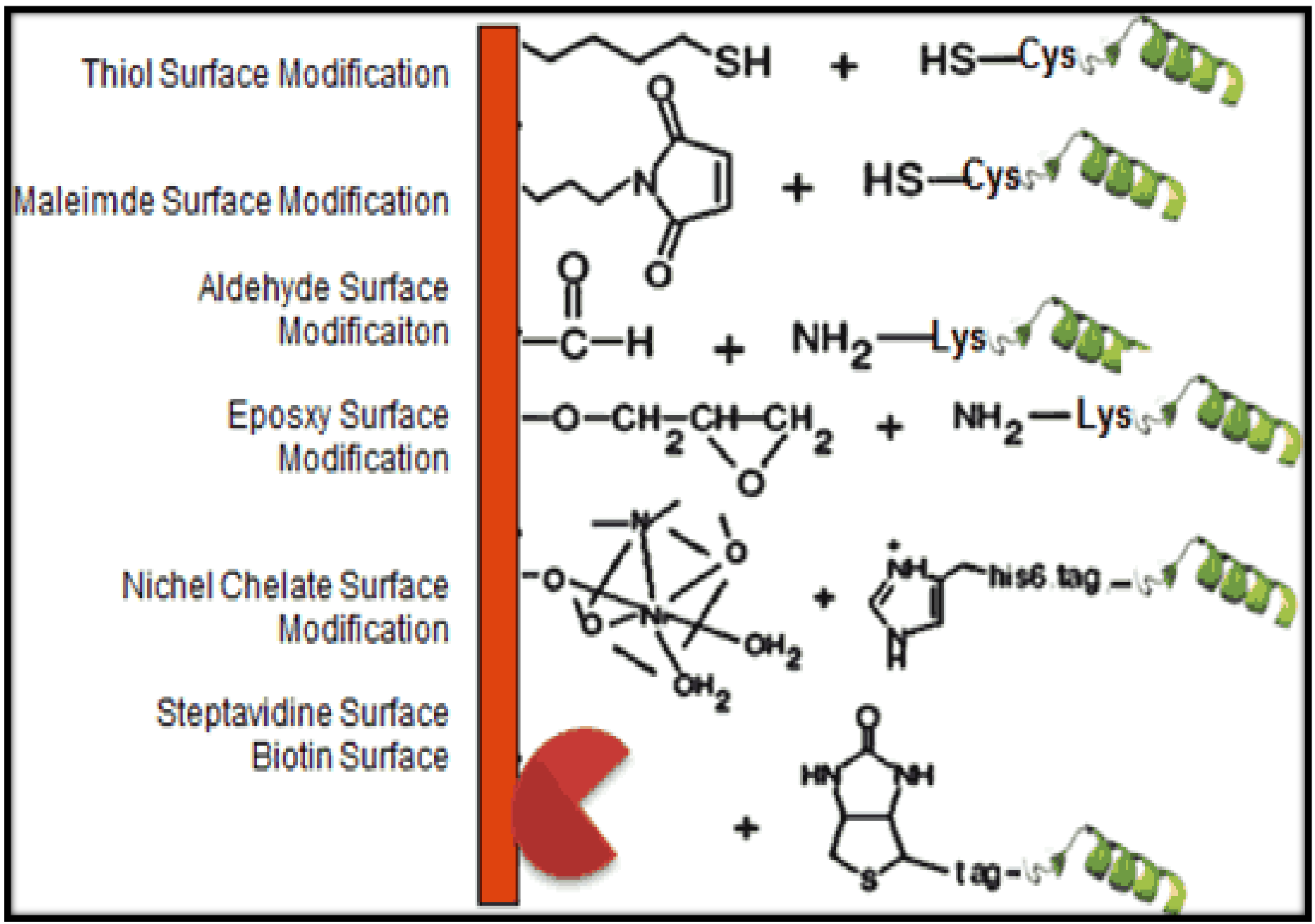
3) $R\text{-}N{=}CH\text{-}(CH_2)_3\text{-}CH{=}N\text{-}Enzyme + NaBH_4 \longrightarrow$

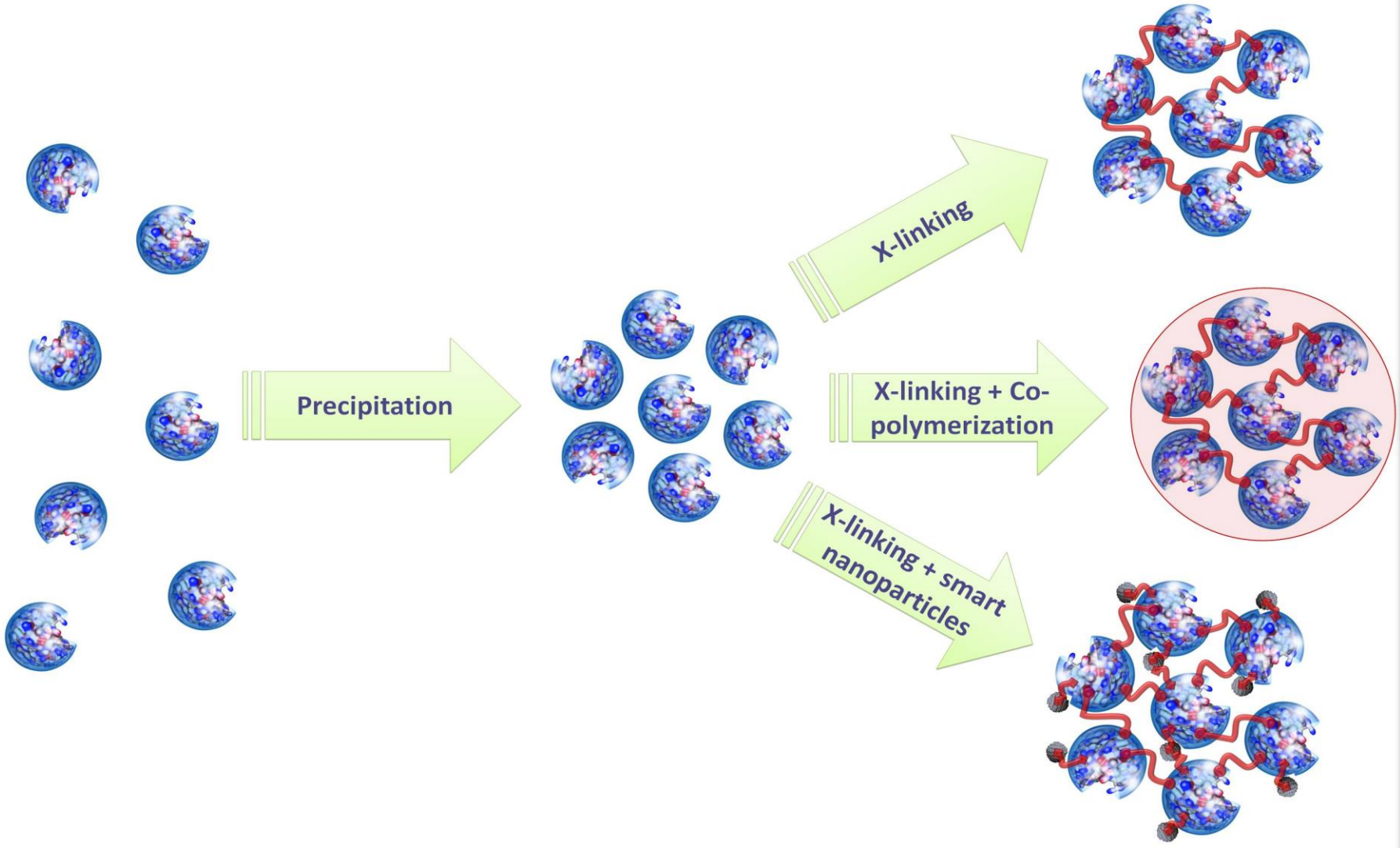
$R\text{-}NHCH\text{-}(CH_2)_3\text{-}CHNH\text{-}Enzyme$

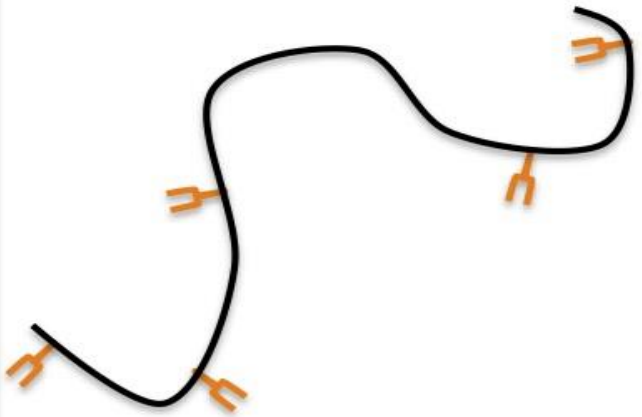

GLUTARALDEHYDE
FREE ENZYME
COPOLYMER
GLUTARALDEHYDE-ENZYME


poly(glutaraldehyde)
(n + 1)
PROTEIN
NH2
+
n
Any protein
amino group
N
PROTEIN
n
+ (n + 1) H2O
Cross-linked
protein molecules


PROTEIN
AGGREGATE
precipitant
PEG
Salts, solvents
+
FREE ENZYME
glutaraldehyde
CLEA

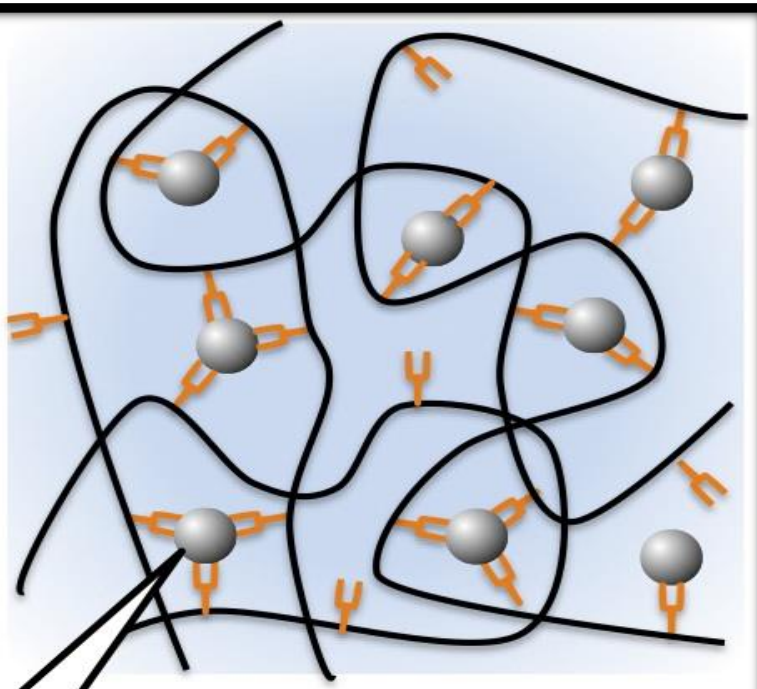

Thiol Surface Modification
Maleimde Surface Modification
Aldehyde Surface Modificaiton
Eposxy Surface Modification
Nichel Chelate Surface Modification
Steptavidine Surface Biotin Surface
SH
HS—Cys
HS—Cys
—C—H
NH2—Lys
—O—CH2—CH—CH2
NH2—Lys
his6 tag
tag


Precipitation
X-linking
X-linking + Co-polymerization
X-linking + smart nanoparticles

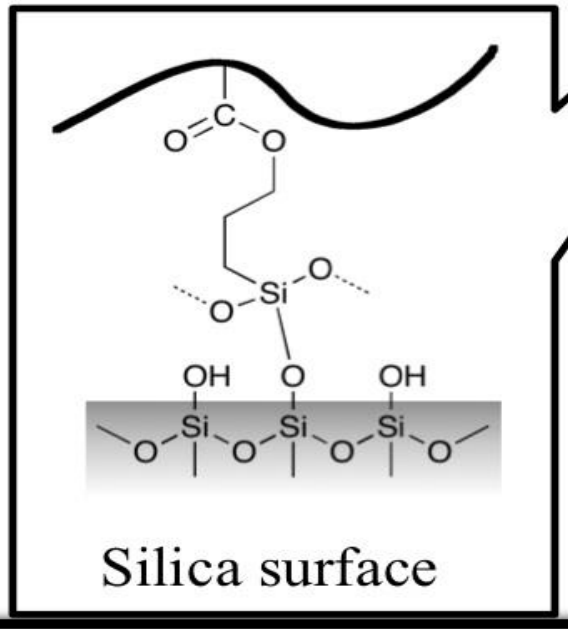


Water-soluble reactive copolymer

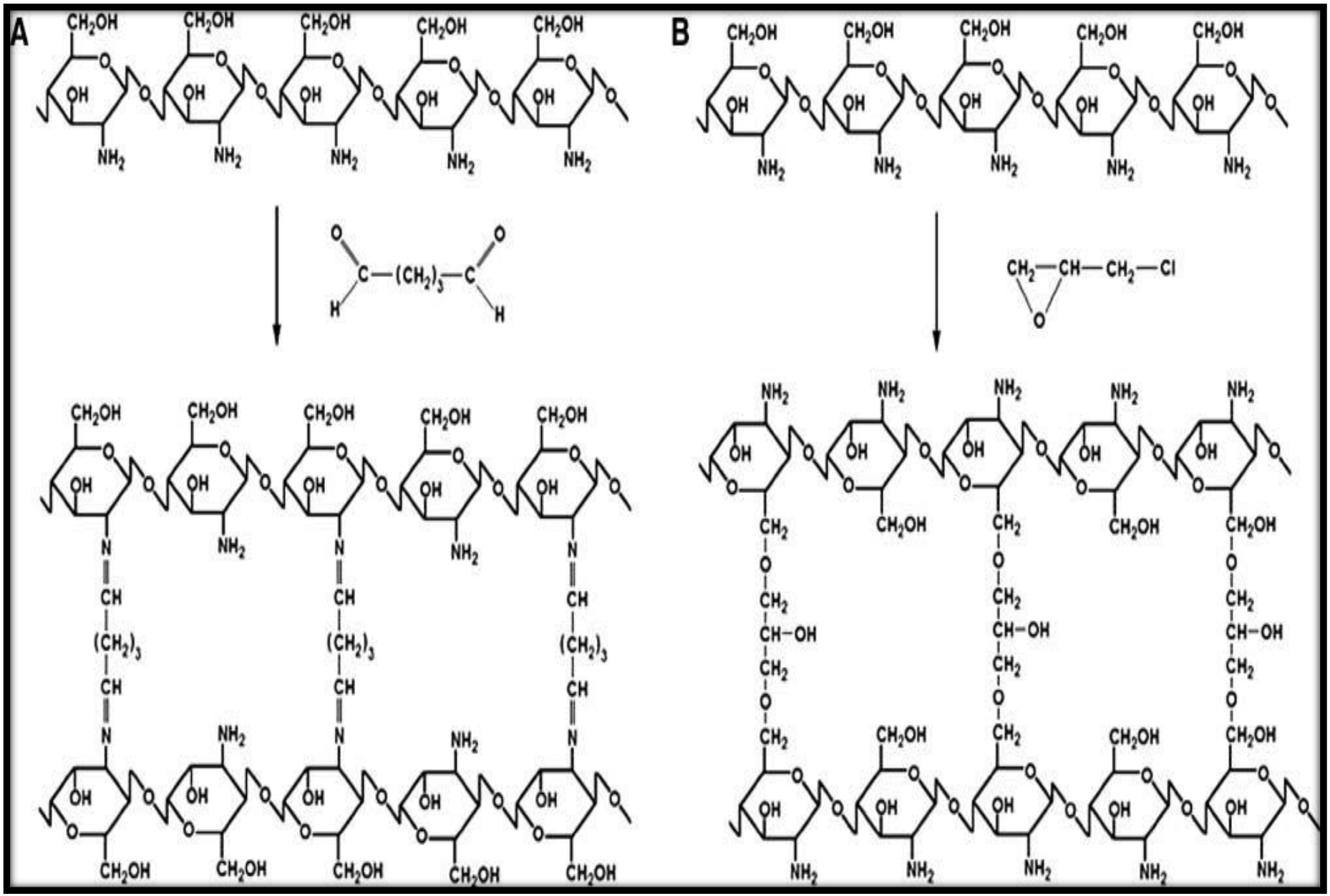
nanoparticles

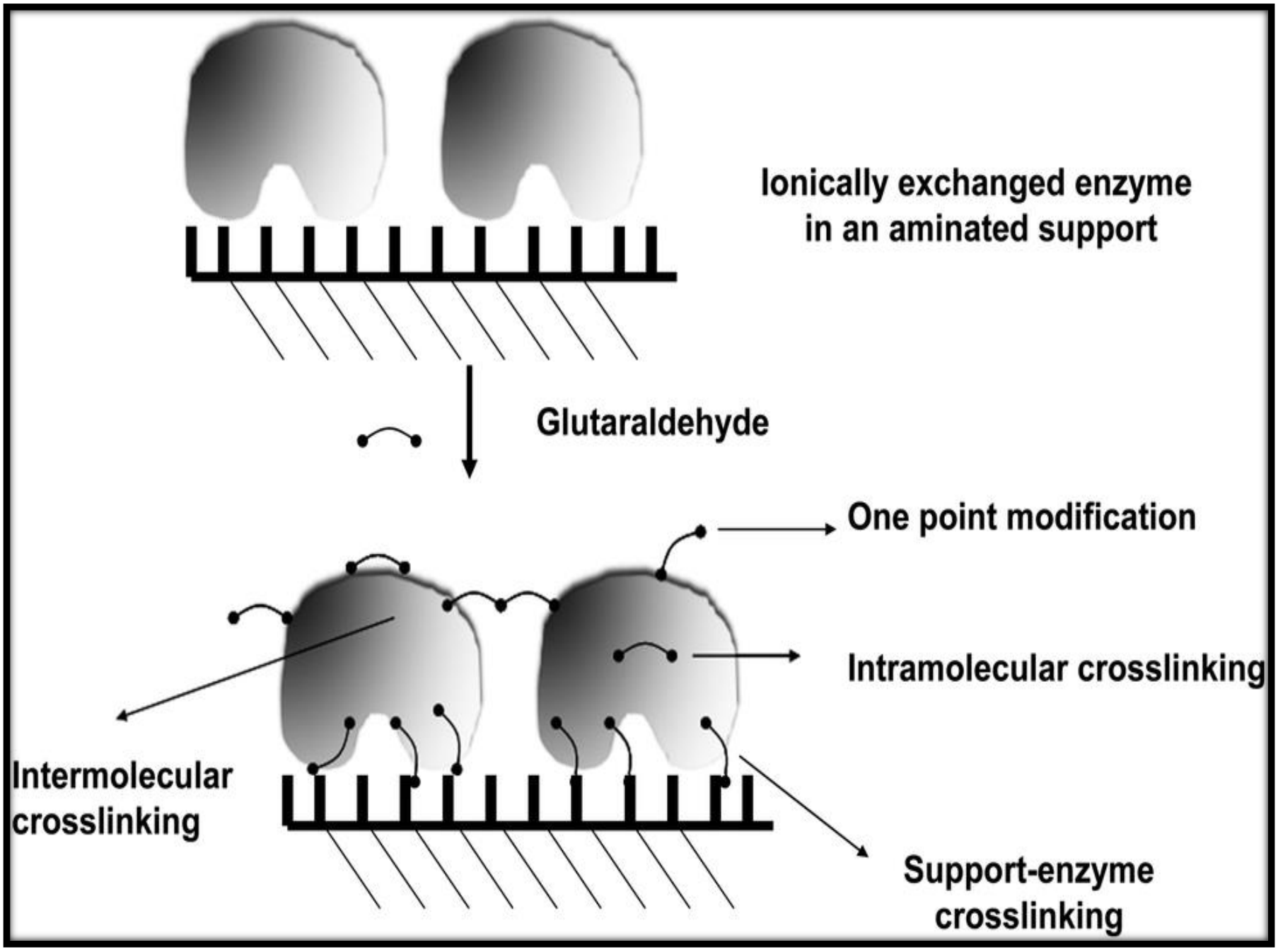


Hybrid hydrogel through nanoparticle-mediated polymer network

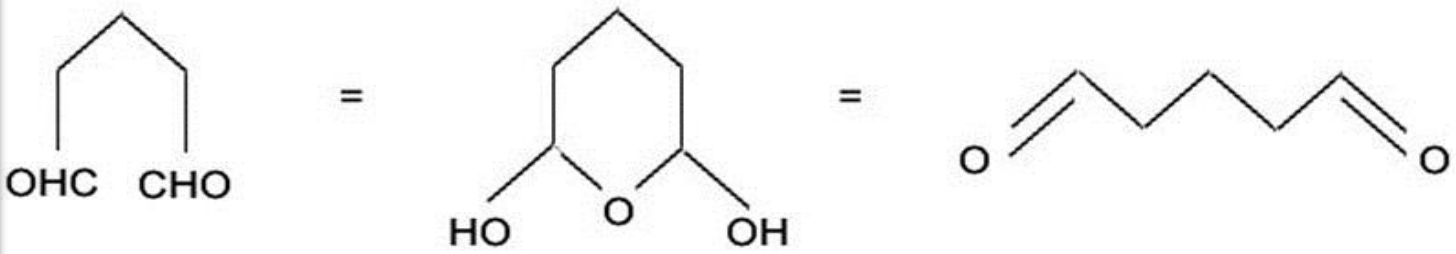


Silica surface

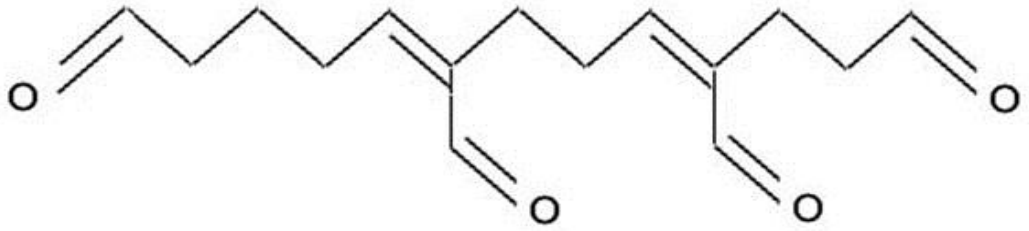

A
B


Ionically exchanged enzyme
in an aminated support
Glutaraldehyde
One point modification
Intramolecular crosslinking
Intermolecular
crosslinking
Support-enzyme
crosslinking

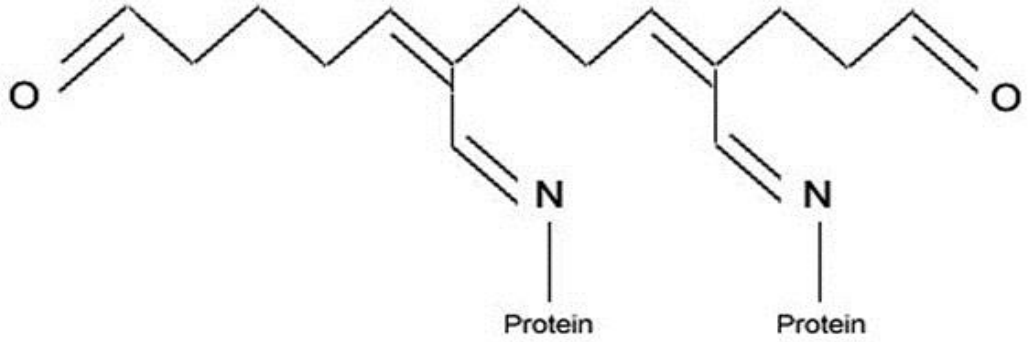
Three representations of glutaraldehyde

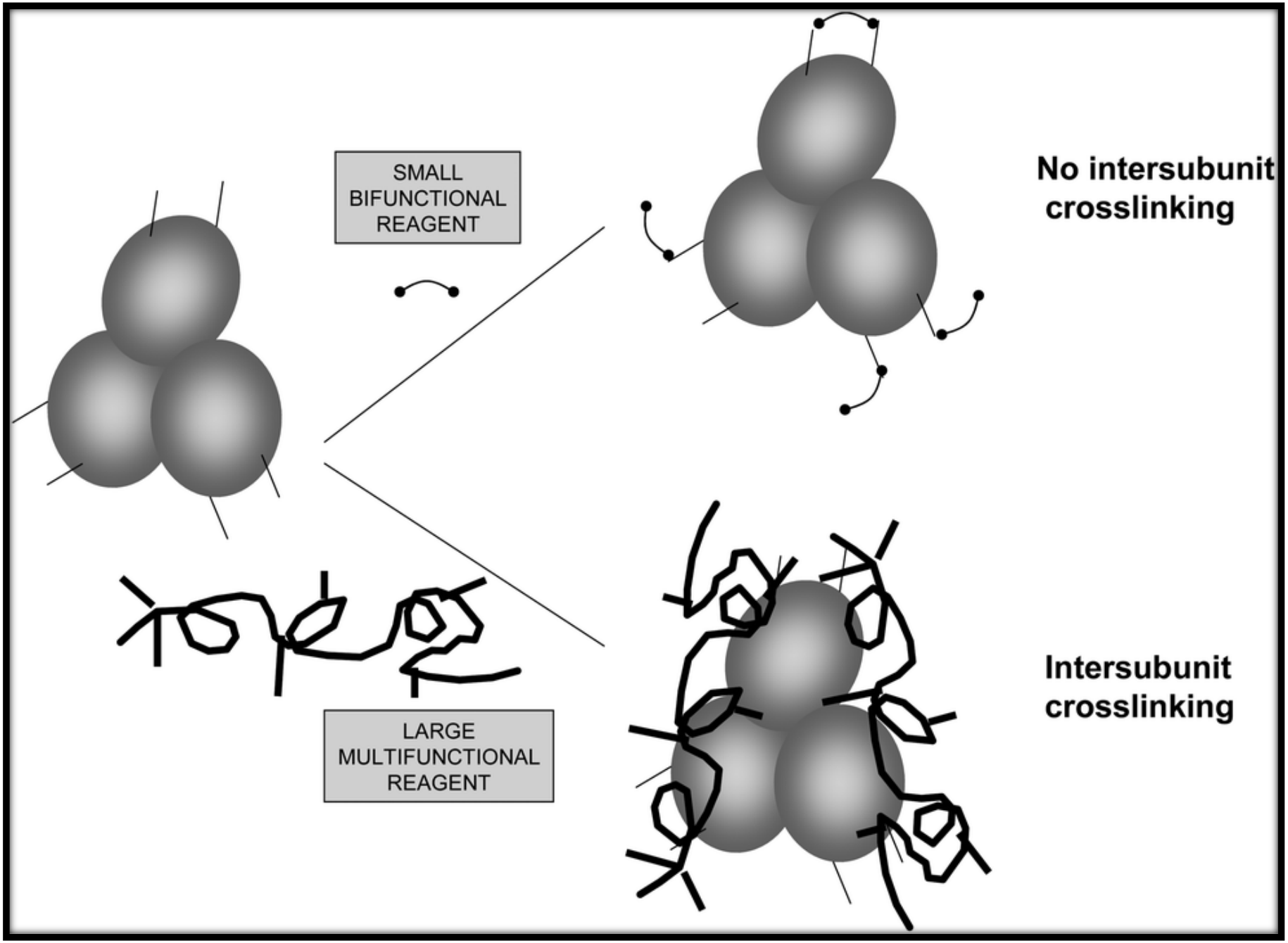


Polymerization adding of aldehyde side chain to each unit



Cross-linked with protein amino group NH_2




SMALL
BIFUNCTIONAL
REAGENT
No intersubunit
crosslinking
LARGE
MULTIFUNCTIONAL
REAGENT
Intersubunit
crosslinking

= وحيث ان مركب السيفاروز Sepharose

عبارة عن Bead-formed للاجاروز جل

ويعتبر ايضا من المواد التى تستخدم بنجاح فى

عمليات التحميل البيولوجية . والتركيب الكيميائى

للاجاروز Agrose

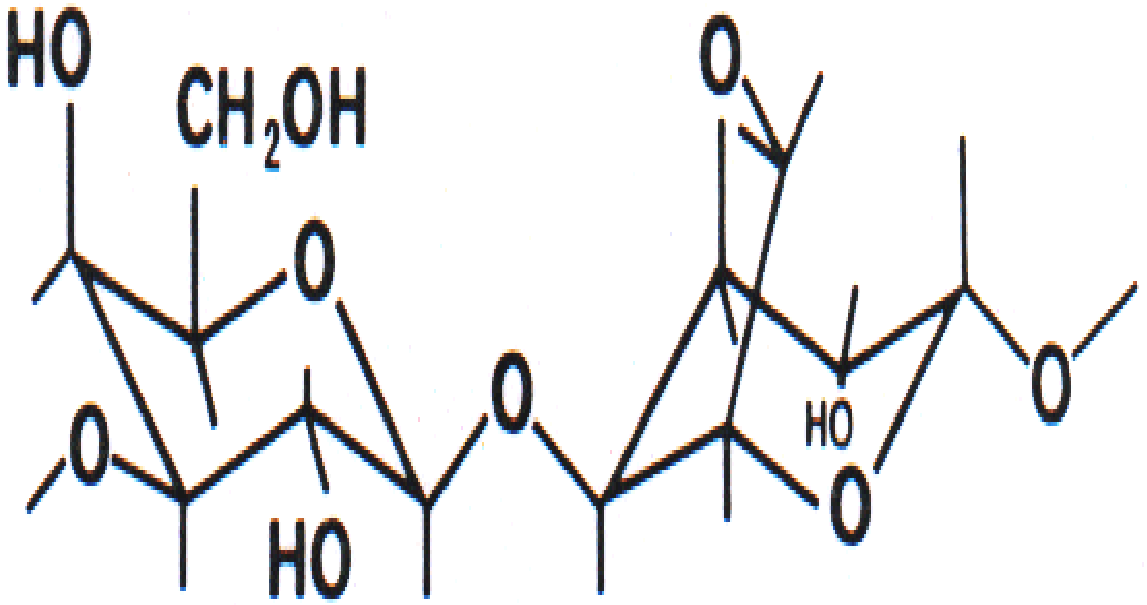
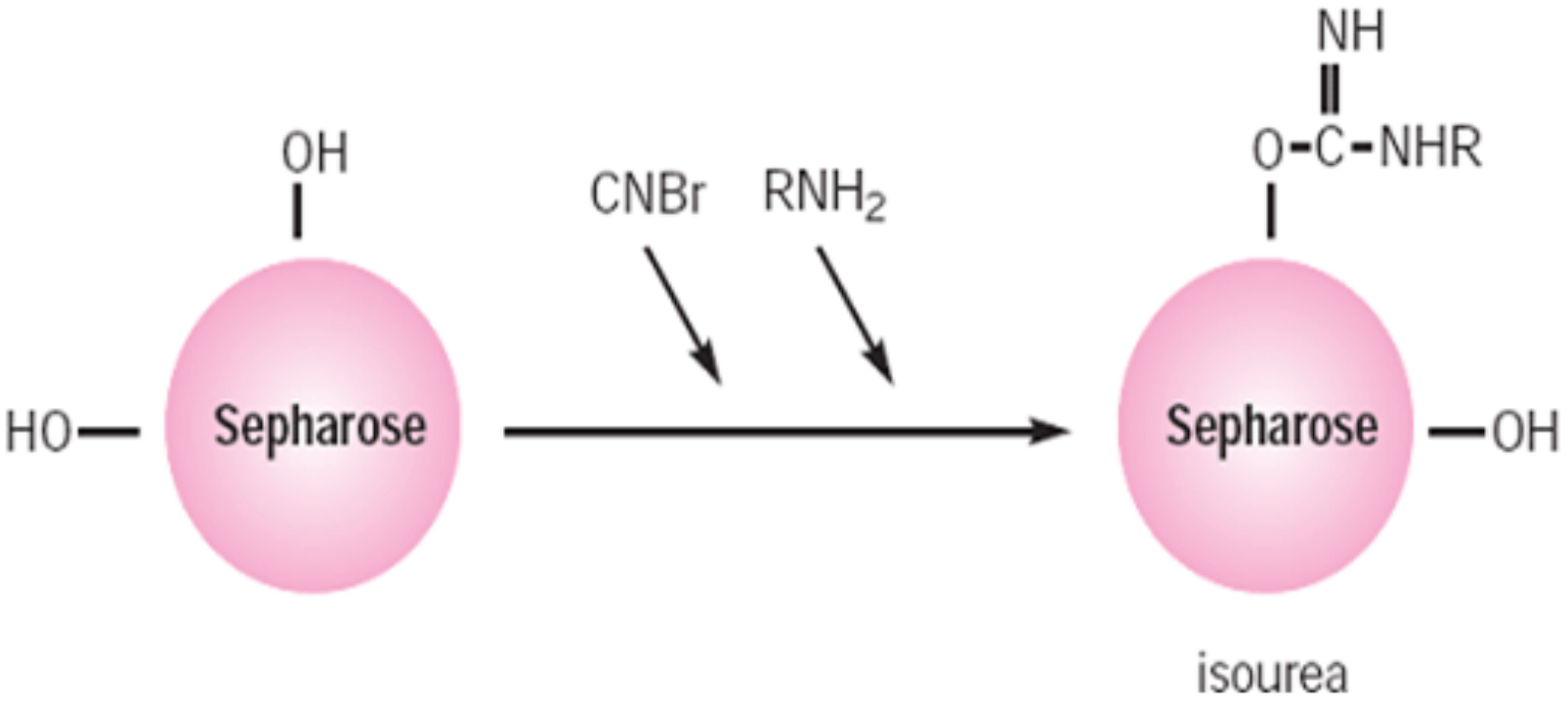
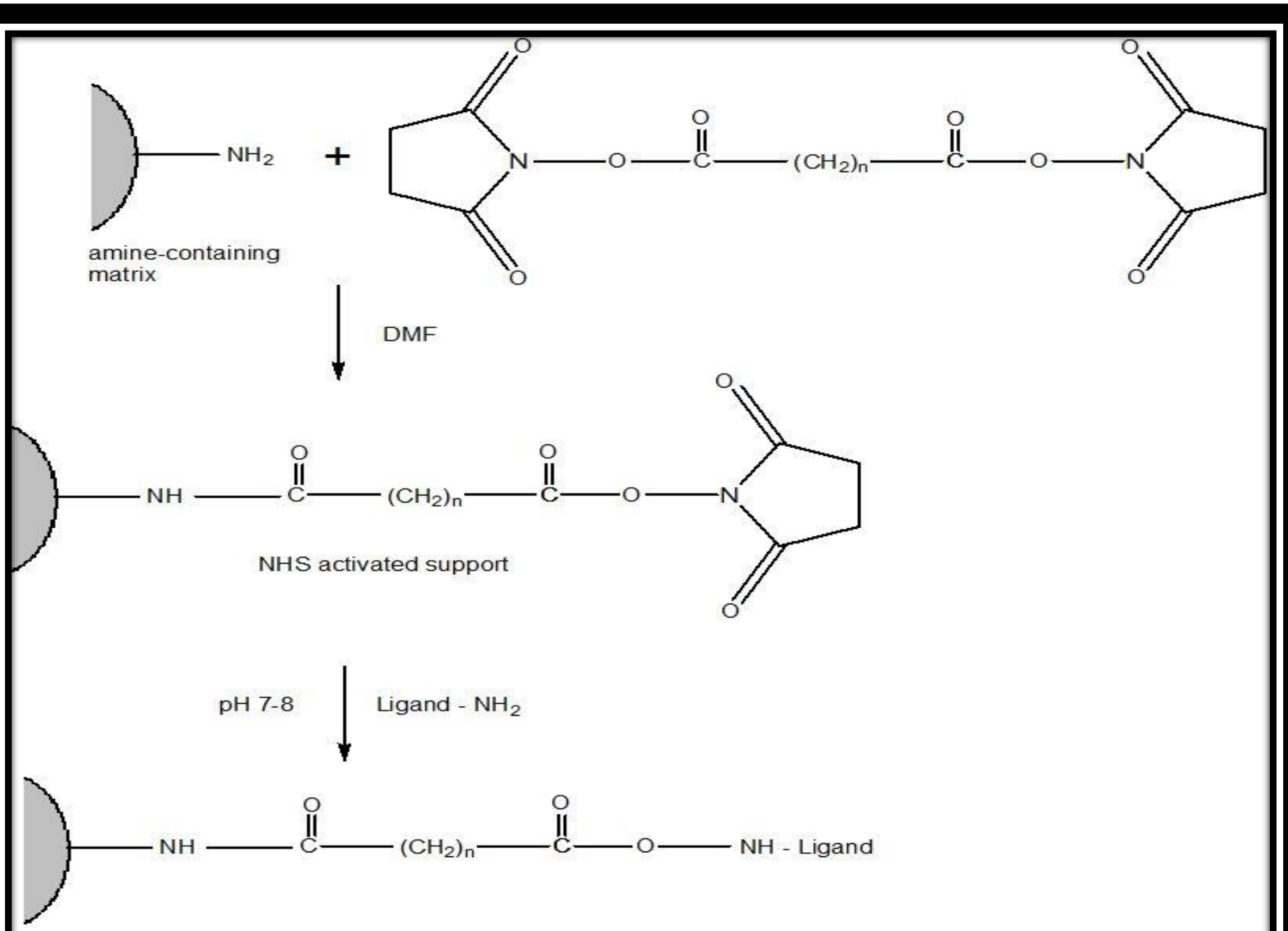


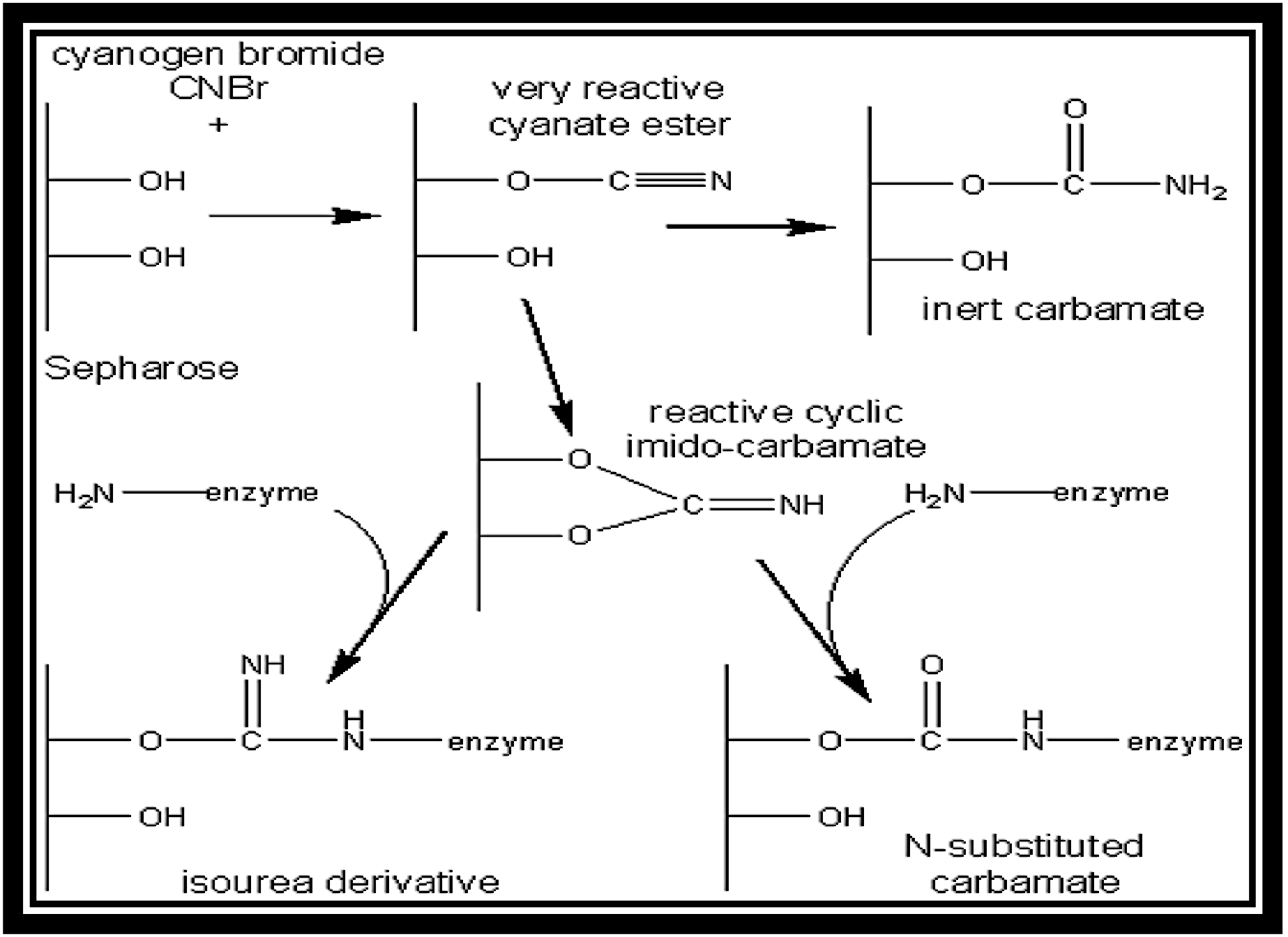
Fig. 26. Structure of the repeating unit of agarose. Note the presence of the unusual sugar 3,6-anhydro-L-galactose.

وتعتبر مجاميع الايدروكسيل فى بواقى السكر يمكنها وبسهولة الارتباط الاشتراكى مع مجاميع الامين الاولية للانزيم حيث يتم تكوين روابط داخلية قوية

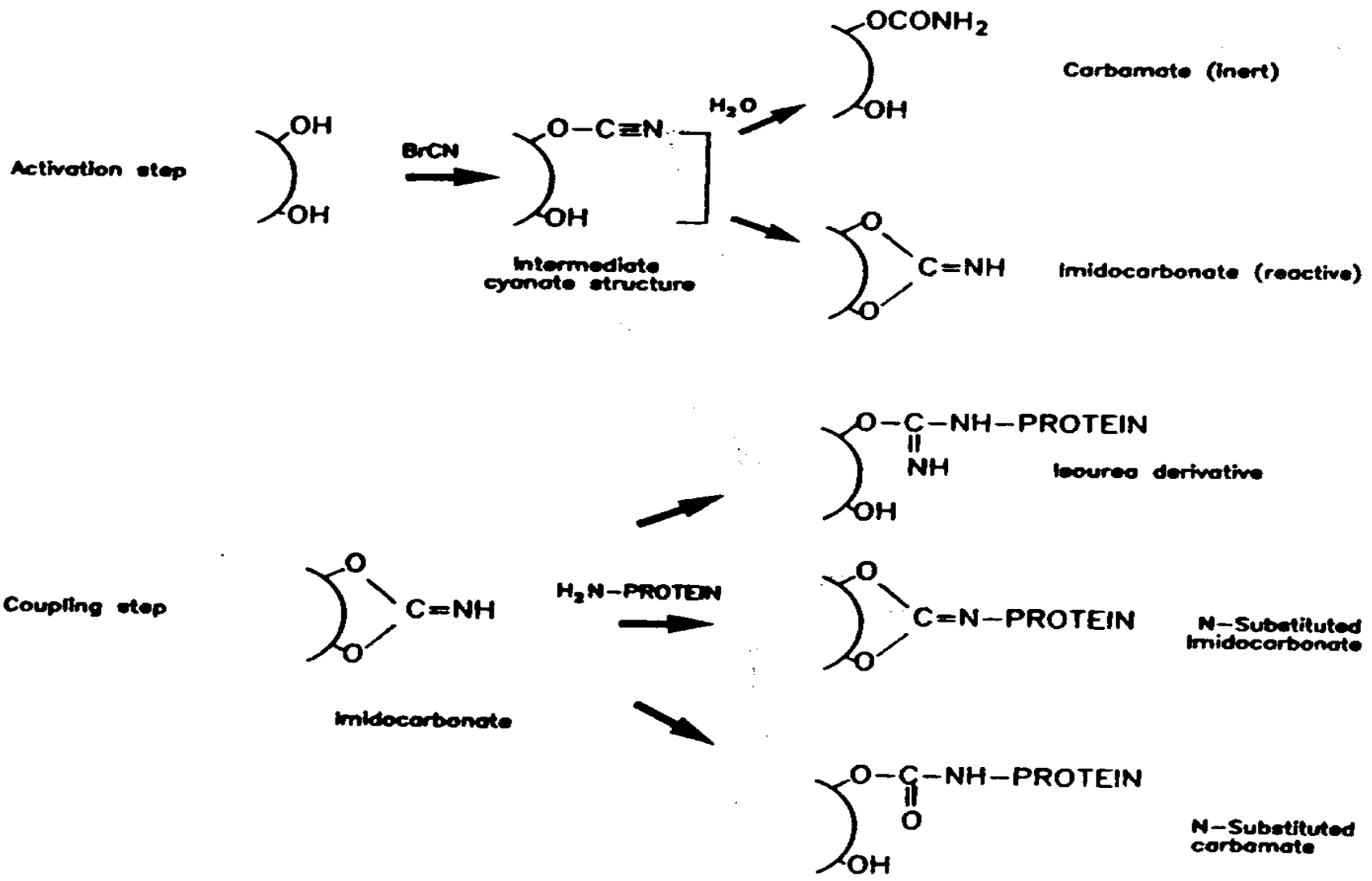
ويمكن توضيح ميكانيكية التنشيط والتحميل للانزيمات بالارتباط التساهمى كما فى الامثلة التالية :-



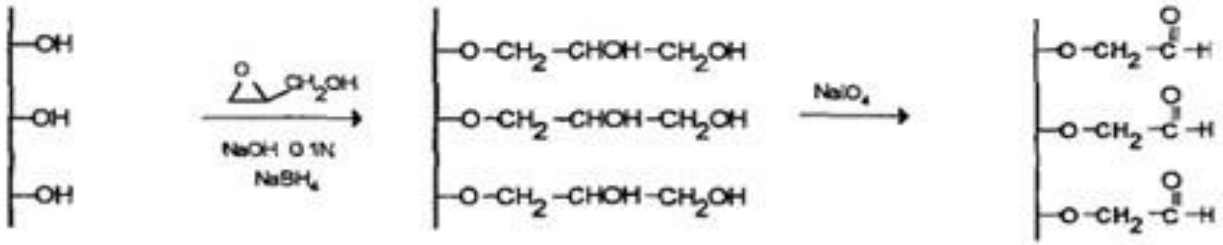

NH2
amine-containing matrix
+
O
N
O
C
(CH2)n
C
O
N
O
DMF
NH
C
(CH2)n
C
O
N
NHS activated support
pH 7-8
Ligand - NH2
NH
C
(CH2)n
C
O
NH - Ligand


cyanogen bromide
CNBr
+
very reactive
cyanate ester
OH
OH
O
C
N
OH
O
C
NH2
OH
inert carbamate
Sepharose
reactive cyclic
imido-carbamate
O
O
C
NH
H2N
enzyme
H2N
enzyme
NH
O
C
H
N
enzyme
OH
isourea derivative
O
C
H
N
enzyme
OH
N-substituted
carbamate

Activation and Coupling of Amino-Containing Ligands to Agarose



ACTIVATION OF THE SUPPORT

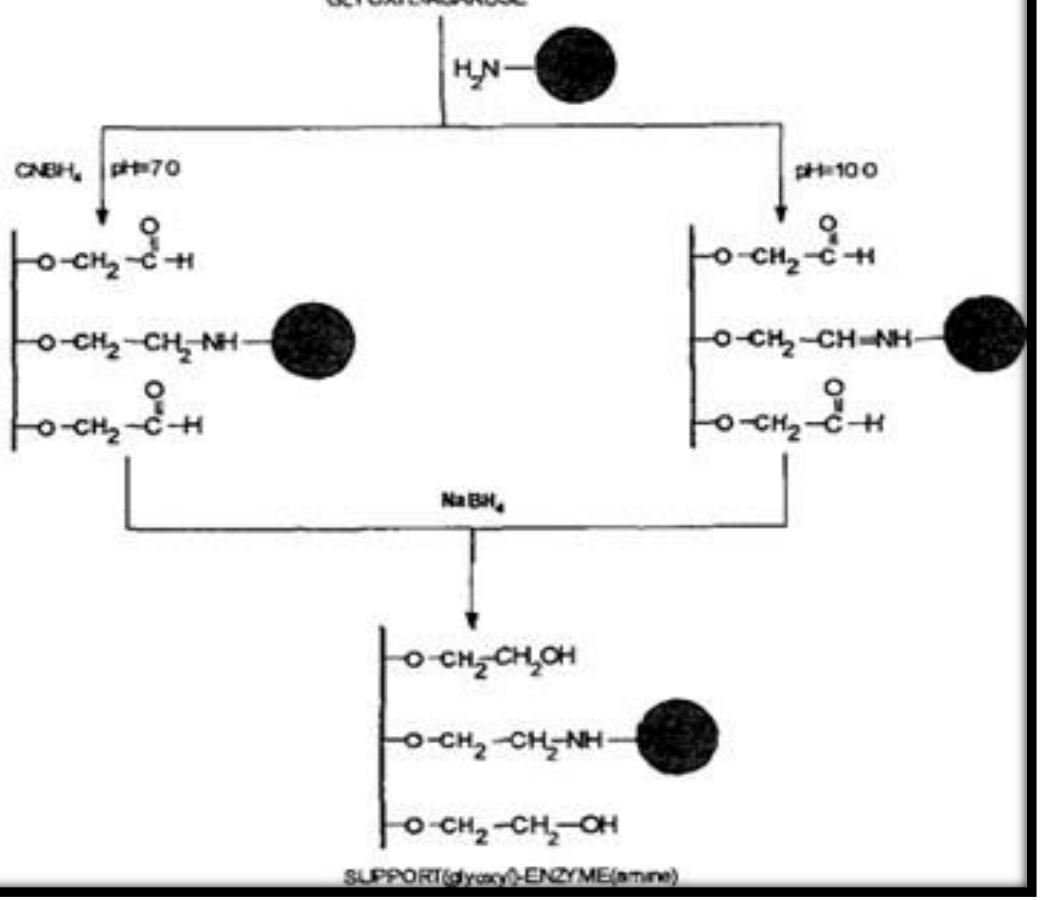


AGAROSE GEL

GLYCERYL-AGAROSE

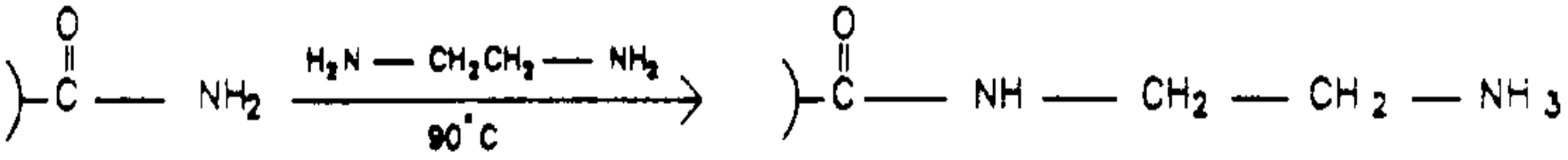
GLYOXYL-AGAROSE

ENZYME IMMOBILIZATION

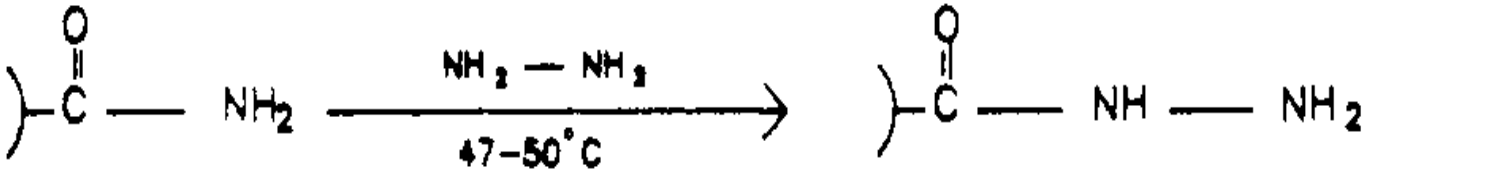


END POINT IMMOBILIZATION

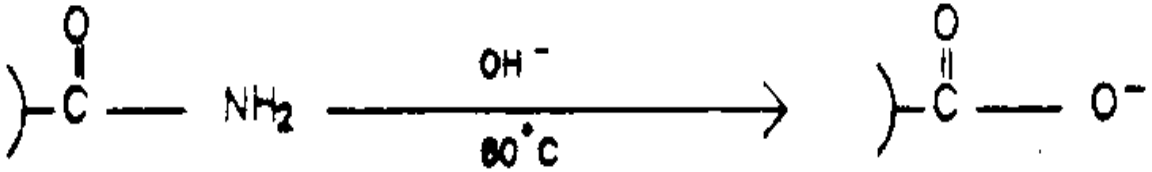
Activation of Acrylamide Resins



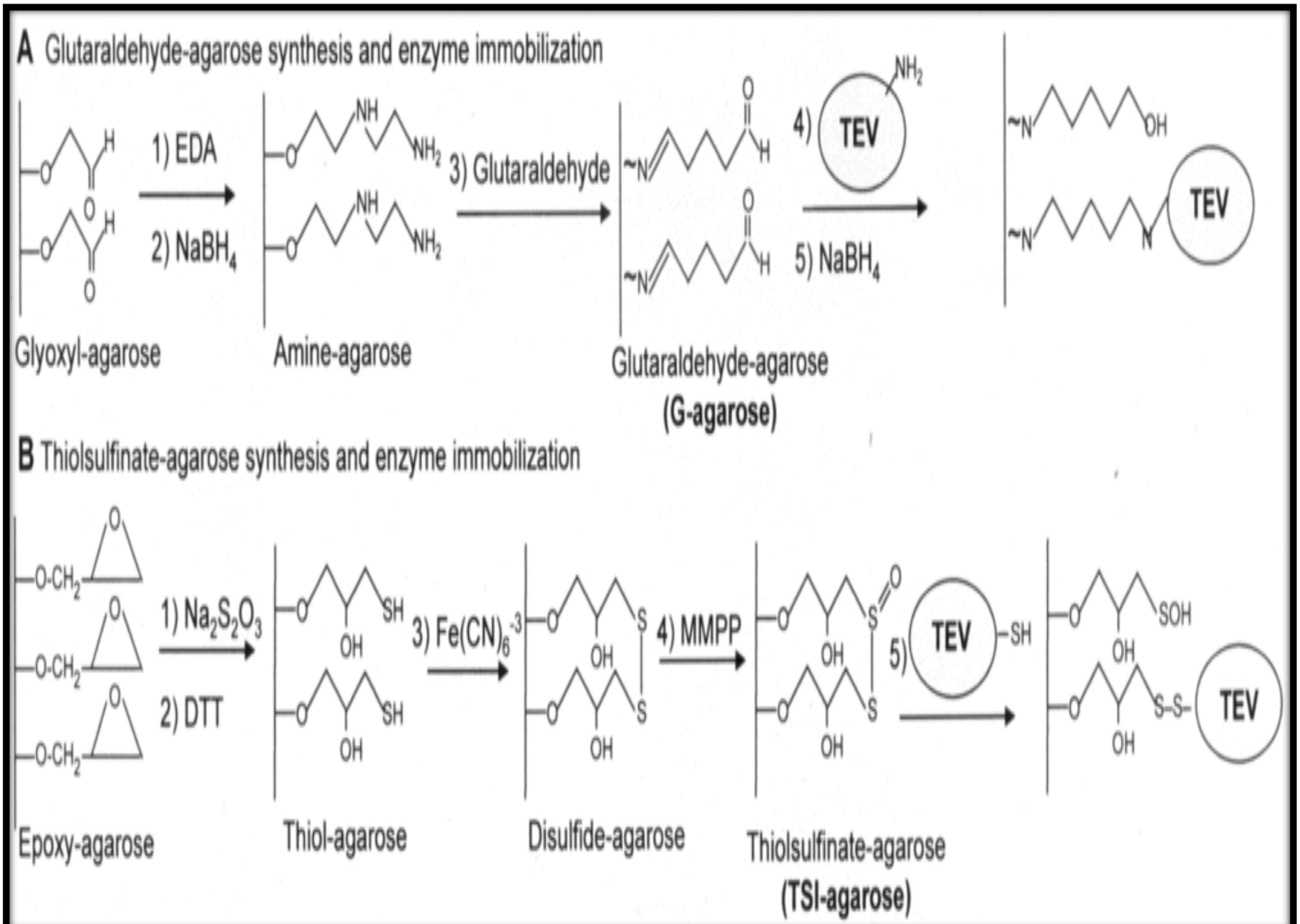
Aminoethyl–polyacrylamide

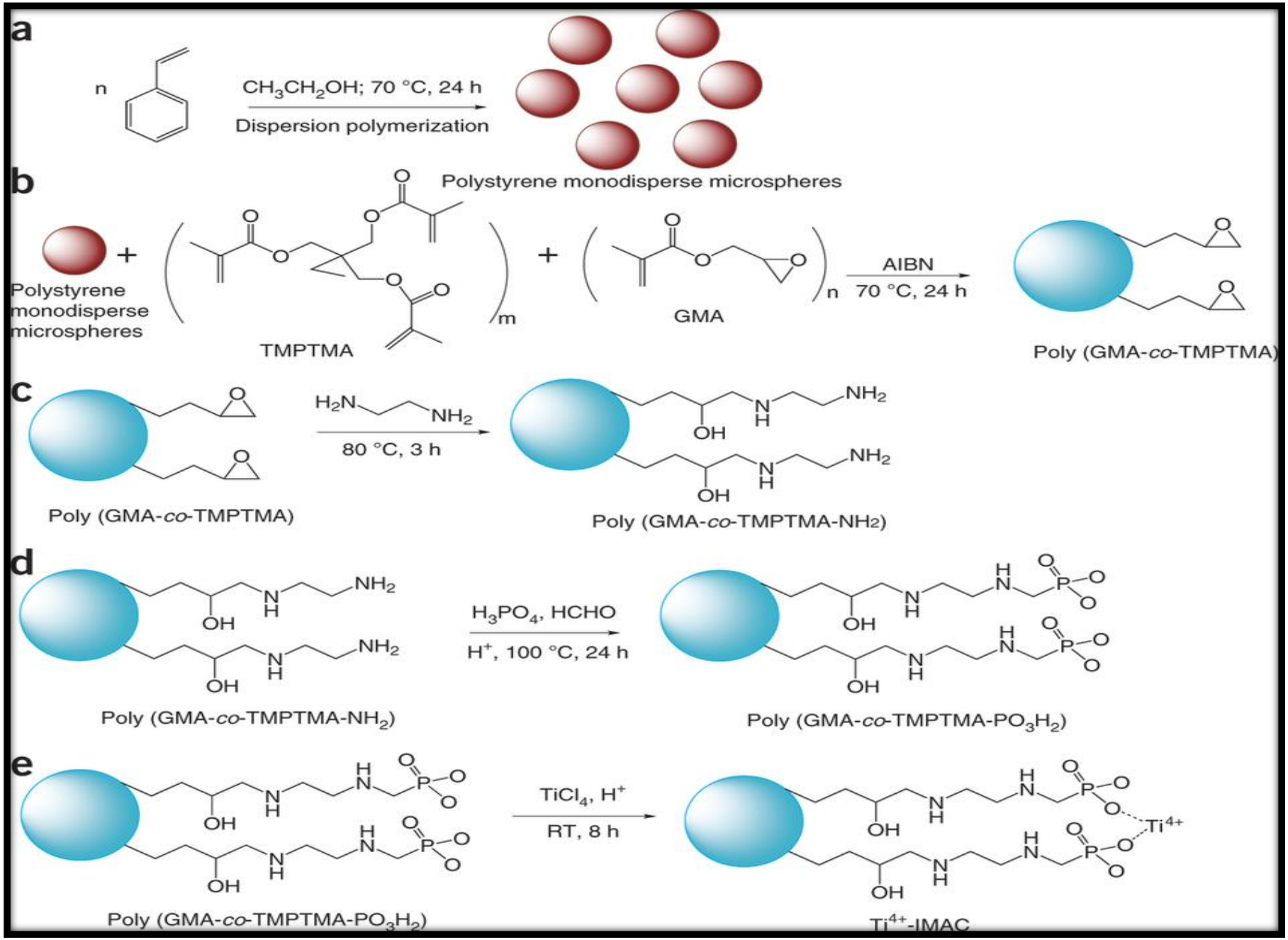


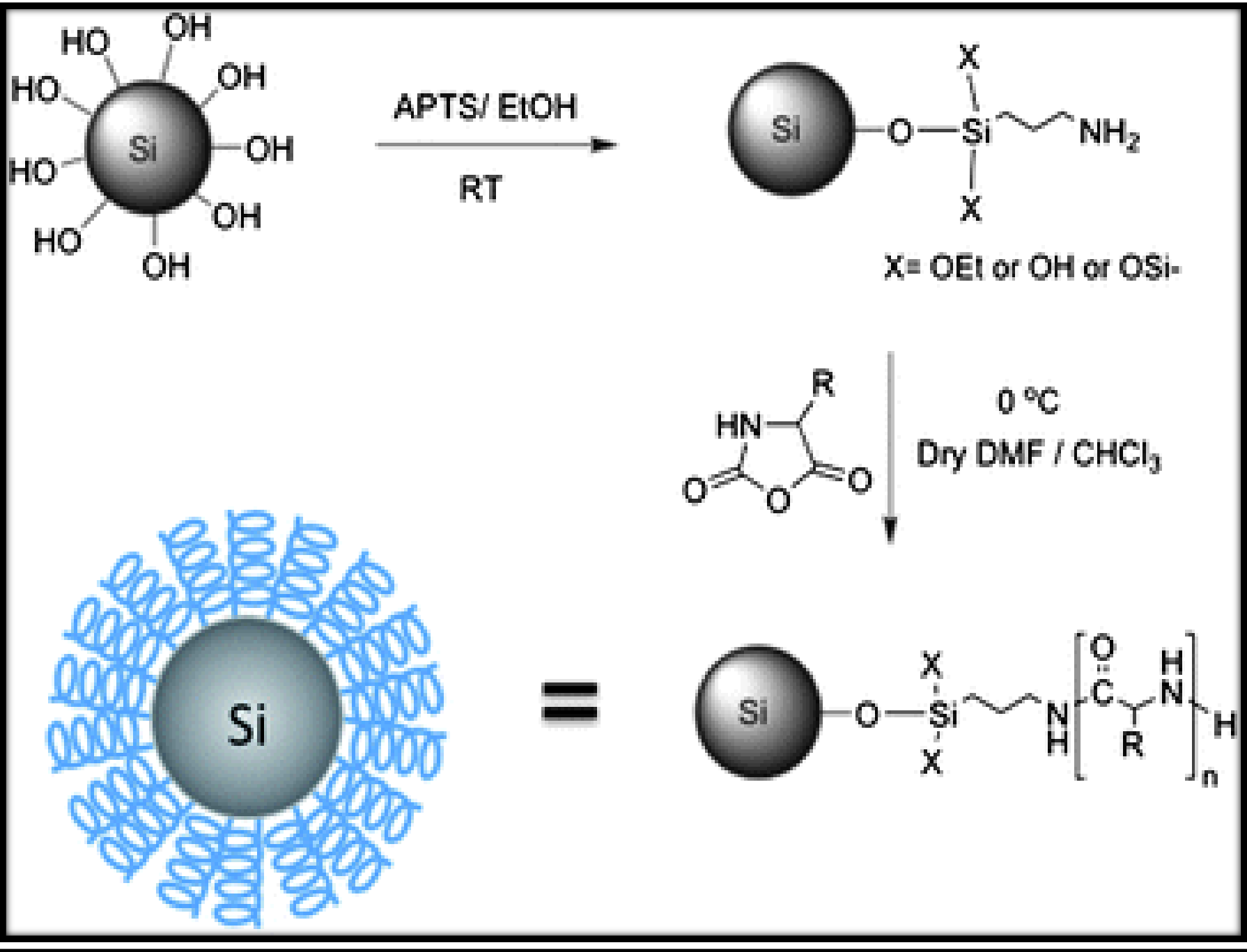
Hydrazide–polyacrylamide

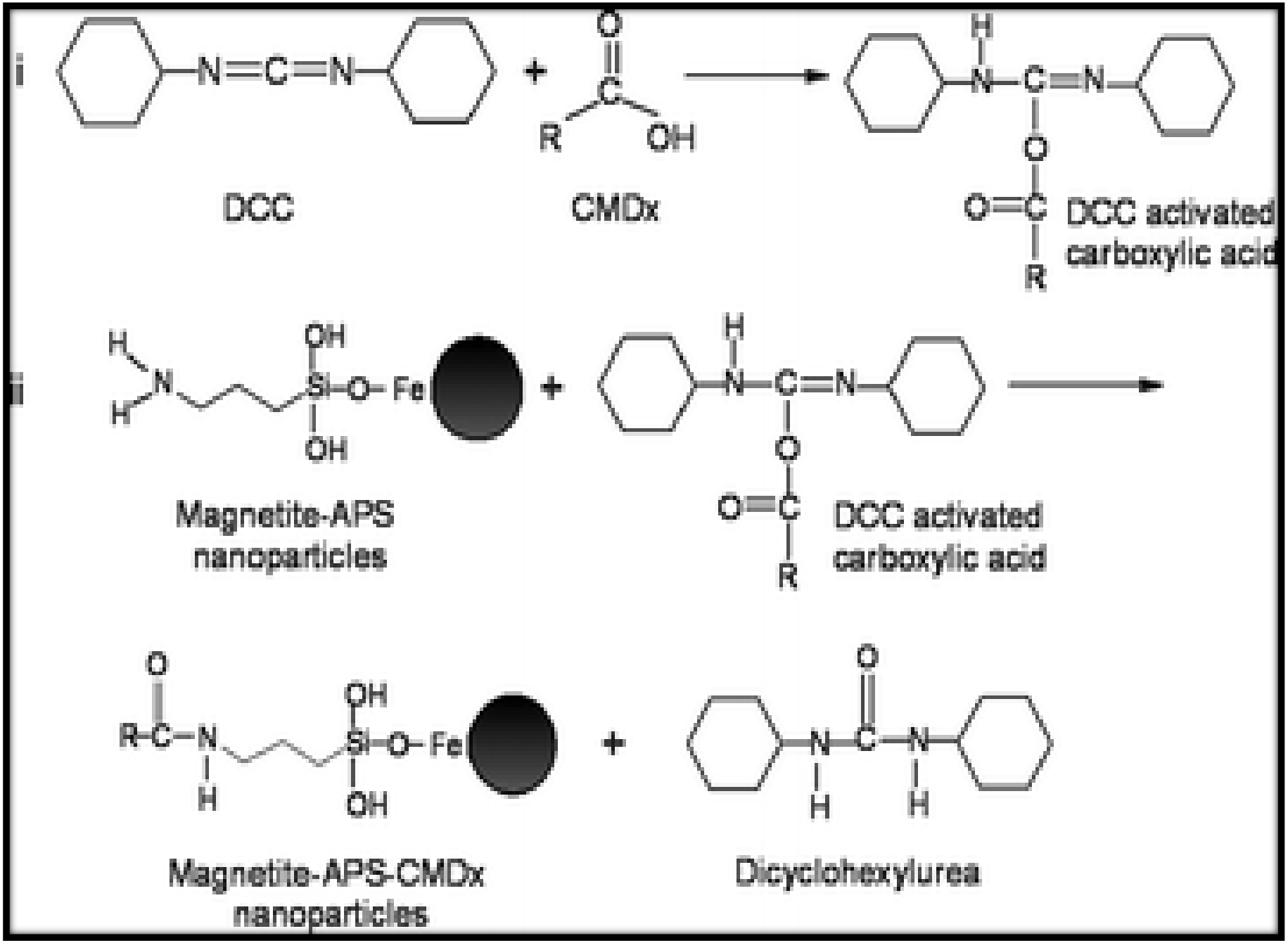


Carboxy–acrylamide


A Glutaraldehyde-agarose synthesis and enzyme immobilization
1) EDA
2) NaBH4
3) Glutaraldehyde
4) TEV
5) NaBH4
Glyoxyl-agarose
Amine-agarose
Glutaraldehyde-agarose
(G-agarose)
B Thiolsulfinate-agarose synthesis and enzyme immobilization
1) Na2S2O3
2) DTT
3) Fe(CN)6-3
4) MMPP
5) TEV
Epoxy-agarose
Thiol-agarose
Disulfide-agarose
Thiolsulfinate-agarose
(TSI-agarose)


a
n
CH3CH2OH; 70 °C, 24 h
Dispersion polymerization
Polystyrene monodisperse microspheres
b
Polystyrene monodisperse microspheres
TMPTMA
GMA
AIBN
70 °C, 24 h
Poly (GMA-co-TMPTMA)
c
Poly (GMA-co-TMPTMA)
H2N NH2
80 °C, 3 h
Poly (GMA-co-TMPTMA-NH2)
d
Poly (GMA-co-TMPTMA-NH2)
H3PO4, HCHO
H+, 100 °C, 24 h
Poly (GMA-co-TMPTMA-PO3H2)
e
Poly (GMA-co-TMPTMA-PO3H2)
TiCl4, H+
RT, 8 h
Ti4+-IMAC

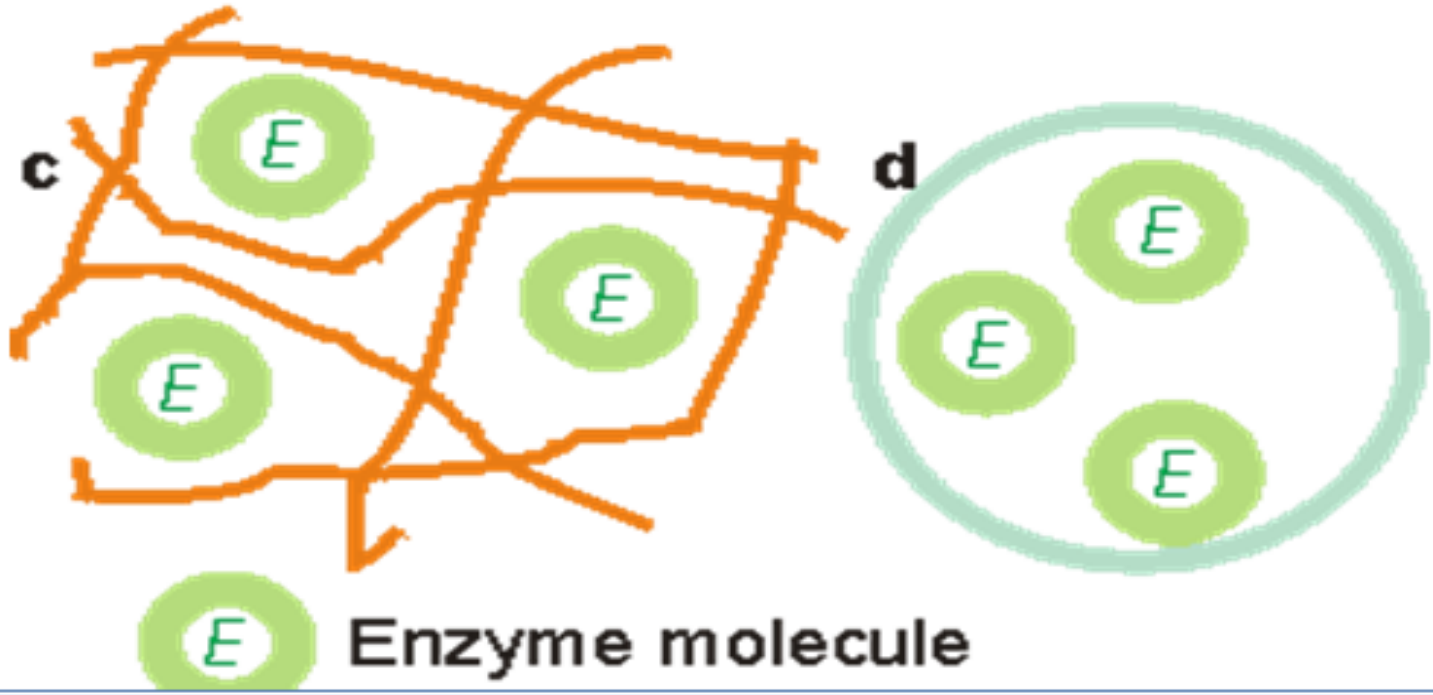

HO
OH
HO
OH
Si
OH
HO
OH
HO
OH
APTS/ EtOH
RT
X
Si
O
Si
NH2
X
X= OEt or OH or OSi-
R
HN
O
O
O
0 °C
Dry DMF / CHCl3
Si
=
Si
O
X
Si
X
N
H
O
C
R
H
N
H
n


i
DCC
CMDx
DCC activated carboxylic acid
ii
Magnetite-APS nanoparticles
DCC activated carboxylic acid
Magnetite-APS-CMDx nanoparticles
Dicyclohexylurea

٣- التحميل بطريقة التغليف الرقيق او عمل الكبسولة

Immobilization by Entrapment or Encapsulation

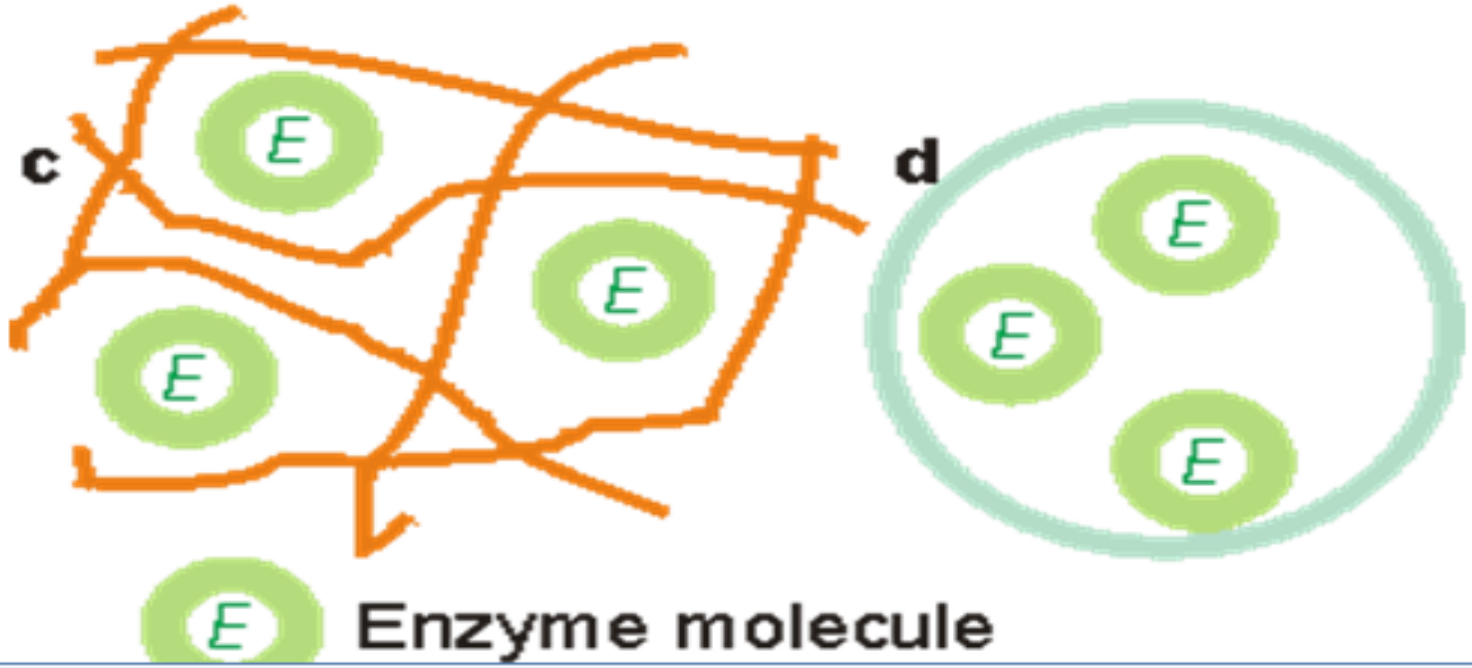
ويتم تحميل الانزيمات بهذة الطريقةعن طريق التغليف للانزيم ببوليمر من الجل الثابت فى محلول يحتوى على الانزيم .



٣- التحميل بطريقة التغليف الرقيق او عمل الكبسولة

Immobilization by Entrapment or Encapsulation

ويتم تحميل الانزيمات بهذة الطريقةعن طريق التغليف للانزيم ببوليمر من الجل الثابت فى محلول يحتوى على الانزيم .



مع تمنياتي لكم بالنجاح والتوفيق

THANK YOU