



جذب و تبدیل آنزیمی دی اکسید کربن توسط آنزیم کربنیک انهیدراز آزاد و تثبیت شده

حمید حیدرزاده درزی^{۱*}، سعیده گیلانی لاریمی^۲، آرش کریمیان^۳

۱- استادیار مهندسی شیمی - دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده نفت و پتروشیمی، سبزوار، ایران

۲- دکتری مهندسی شیمی - دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، بابل، ایران

۳- کارشناس مهندسی شیمی - دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده نفت و پتروشیمی، سبزوار، ایران

خلاصه:

گرمایش زمین و تغییرات آب و هوایی ناشی از دی اکسید کربن موجود در جو بحرانی است که تماماً به وسیله انسان و فرایند صنعتی شدن شکل گرفته است. راهکار هایی جذب و تبدیل دی اکسید کربن به دو دسته عمده بیولوژیکی و غیر بیولوژیکی تقسیم می شوند. راهکار های غیر بیولوژیکی بر خلاف روش های بیولوژیکی با وجود کارآمدی خود با آلودگی های زیست محیطی دیگری همراه هستند. در این پژوهش روش آنزیمی به عنوان یکی از روش های بیولوژیکی جذب و تبدیل دی اکسید کربن مورد بررسی قرار گرفته است. آنزیم کربنیک انهیدراز با نقش موثری بر مرحله هیدراتاسیون دی اکسید کربن سرعت کلی واکنش جذب و تبدیل دی اکسید کربن به کربنات کلسیم جامد را به شدت افزایش می دهد. طی این تحقیق عوامل تاثیر گذار بر واکنش آنزیمی نظیر دما، pH و یونهای موجود در محیط واکنش مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین تثبیت آنزیم به عنوان روشی موثر برای افزایش فعالیت آنزیمی، استفاده مجدد از آنزیم و سهولت انتقال جرم مواد اولیه و محصولات برای آنزیم کربنیک انهیدراز بررسی شد.

کلمات کلیدی: دی اکسید کربن، جذب آنزیمی، کربنیک انهیدراز، تثبیت آنزیم

۱. مقدمه

میزان دی اکسید کربن بعد از انقلاب صنعتی رشد بسیار زیادی داشته است که این موجب نگرانی های جدی در زمینه آب و هوا و محیط زیست ایجاد کرده است. روش های زیادی برای جذب و ذخیره سازی و یا تبدیل کربن دی اکسید پیشنهاد شده است که غالب آن ها بسیار پر هزینه به نظر می رسند. تبدیل کربن دی اکسید به بی کربنات توسط آنزیم کربونیک انهیدراز به تازگی با مطالعات و تحقیقات انجام شده به حالت اقتصادی نزدیک شده است. در این روش، یون بی کربنات توسط واکنش با یک یون فلزی مناسب به صورت کربنات جامد در می آید که میتوان تا میلیون ها سال آن را نگه داری و ذخیره کرد [۳].

* H.Heydarzadeh@hsu.ac.ir



فرایند کلی تبدیل دی اکسید کربن به کربنات کلسیم جامد به صورت زیر انجام می شود: دی اکسید کربن محلول در آب، با آب واکنش داده و بی کربنات تولید می شود.



که در آن $K_1 = k_1/k_{-1}$ می باشد.

سپس کربنیک اسید در اثر واکنش زیر قرار می گیرد.



در حضور یون Ca^{2+} ، ماده $CaCO_3$ تشکیل و رسوب می کند.



در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس و pH خنثی (۷) ثابت سرعت K_1 ، $0.0026 M^1s^{-1}$ است و مقدار k_1 و k_{-1} به ترتیب $6.2 \times 10^{-2} s^{-1}$ و $23.7 s^{-1}$ است. همچنین در واکنش مرحله دوم K_2 برابر با 1.7×10^{-4} است. سرعت واکنش اول بسیار آهسته است اما وقتی از کاتالیست بیولوژیکی کربنیک آنهیدراز استفاده می کنیم سرعت واکنش به میزان قابل توجهی افزایش می یابد و به میزان $1.4 \times 10^6 M^1s^{-1}$ می رسد بنابراین آنزیم کربنیک آنهیدراز نقش کلیدی در جذب و ذخیره سازی کربن دی اکسید خواهد داشت. آنزیم کربونیک آنهیدراز با حذف واکنش مرحله اول که کندترین مرحله از واکنش ها می باشد، طی واکنشهای زیر سرعت کلی واکنش تبدیل دی اکسید کربن به کربنات کلسیم جامد را به شدت افزایش می دهد. [۴]



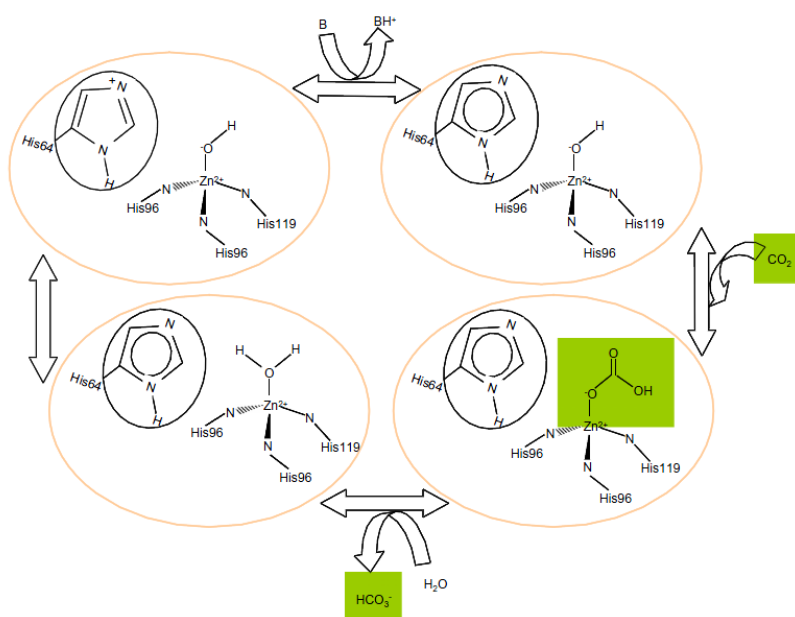
کربنیک آنهیدراز یک آنزیم دارای پروتئین فلزی است که در سایت های فعال آن یون فلزی Zn^{++} وجود دارد. این آنزیم به عنوان کاتالیزور واکنش هیدراتاسیون تبدیل کربن دی اکسید به بی کربنات (HCO_3^-) عمل می کند. فعالترین و کارآمدترین این نوع آنزیم می تواند ثابت سرعت واکنش را به $10^6 s^{-1}$ افزایش بدهد. این آنزیم منشا های فراوانی دارد (حیوانات، گیاهان، جلبک ها و باکتری ها) [۱]. حداقل پنج کلاس از این آنزیم تاکنون شناسایی شده است α ، β ، δ و ζ که از لحاظ ساختاری همگی دارای سایت فعال حاوی فلز روی یا یک فلز مشابه دیگر با کارکرد کاتالیستی مشابه روی هستند [۲].

۲. مکانیزم عملکرد کربنیک آنهیدراز بر دی اکسید کربن

مکانیزم عملکرد کربنیک آنهیدراز بر دی اکسید کربن چهار مرحله است. از شواهد آزمایشات این طور نتیجه گیری می شود که هیدراتاسیون دی اکسید کربن با تشکیل پیوند بین گروه هیدروکسیل-روی جایگاه فعال آنزیم با اتم کربن موجود در دی اکسید کربن آغاز می شود. در مرحله دوم ایجاد بیکربنات با جابجایی یک مولکول آب انجام می شود. در



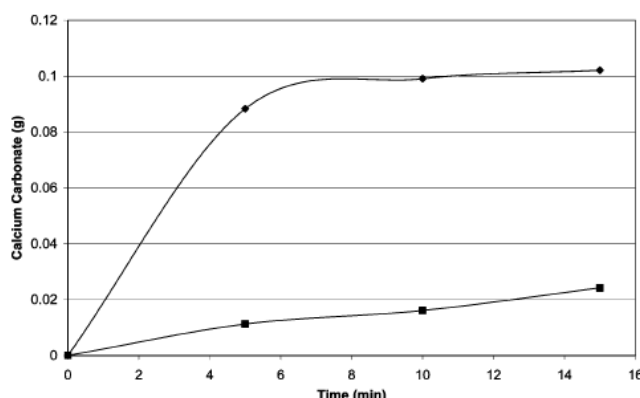
مرحله سوم جابجایی درون مولکولی پروتون مولکول آب متصل به روی به گروه ایمیدازول هیستیدین انجام می شود. در مرحله چهارم پروتون جابجا شده به گروه ایمیدازول به محیط بافری آنزیم منتقل شده که طی این مرحله آنزیم شکل فعال اولیه خود را باز می یابد. شماتیک مکانیزم در شکل ۱ نشان داده شده است. در حالت کلی سایت فعال شامل یک یون روی (II) که توسط باقی مانده های اسید آمین هیستیدین محاصره شده و یک مولکول آب/یون هیدروکسید است. با اینکه در آنزیم های کلاس β آب مستقیماً با یون روی پیوند ندارد اما مکانیزم روی هیدروکسید برای آن و کلاس γ معتبر است. [۳]



شکل ۱ - مکانیزم عملکرد کربونیک آنهیدراز در هیدراتاسیون [۳]

۳. بررسی عوامل موثر بر جذب و ذخیره سازی آنزیمی دی اکسید کربن

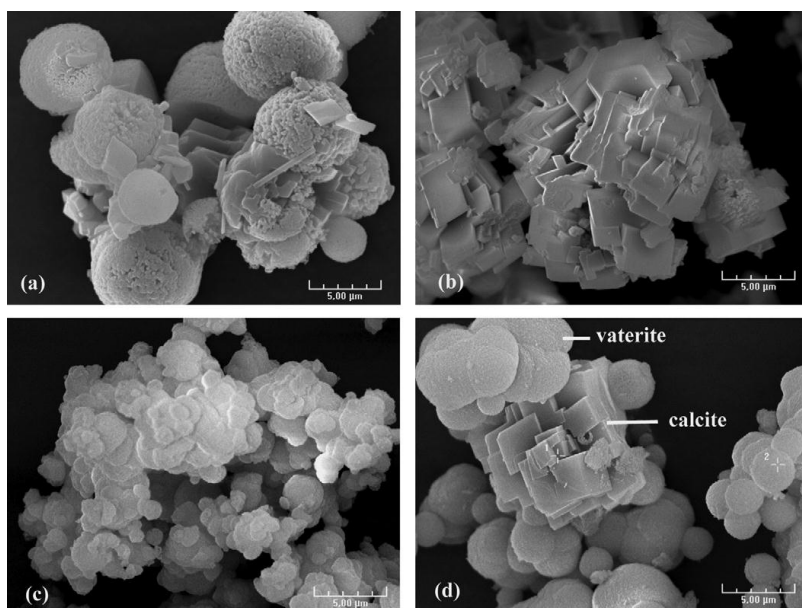
میرجعفری و همکارانش اثر آنزیم کربنیک آنهیدراز گاوی را بر هیدراتاسیون دی اکسید کربن مورد بررسی قرار دادند. طی این تحقیق کربن دی اکسید گازی را در آب دیونیزه دمیده و آب اشباع از کربن دی اکسید را تولید کردند. سپس محلول کربنیک آنهیدراز را در محیط واکنش بافر فسفات قرار دادند. واکنش با اضافه کردن آب حاوی دی اکسید کربن آغاز شد. اثر غلظت آنزیم و دما طی آزمایشات با محلول حاوی آنزیم از غلظت ۰.۲ تا ۶ میکرو مولار و در دمای ۰، ۳۵، ۵۰ درجه سلسیوس بررسی گردید. بر اساس آزمایشات نتیجه شد استفاده از آنزیم تاثیر بسیار زیادی بر تولید کربنات کلسیم داشته است و طی کمتر از ده دقیقه به حداکثر مقدار خود رسید که در شکل ۲ نشان داده شده است. همچنین افزایش غلظت آنزیم تاثیر مثبتی در تشکیل بی کربنات و به طبع آن کربنات دارد ولی افزایش دما موجب کاهش تشکیل بی کربنات می شود. [۴]



شکل ۲- واکنش تبدیل دی اکسید کربن به کربنات کلسیم جامد طی زمان (◆) با استفاده از آنزیم و (■) بدون آنزیم [۴]

فاور* و همکارانش در دو دمای مختلف (۵ و ۲۰ درجه سلیسیوس) و در دو PH مختلف (۸/۵ و ۱۰/۵) تشکیل $CaCO_3$ را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که سرعت واکنش در حالت دمای ۵ درجه و PH ۱۰/۵ ده برابر حالت های دیگر بوده است. همچنین بر اساس این آزمایشات نتیجه شد که ظرفیت بافر نیز در سرعت واکنش تاثیر دارد. به طوری که اگر این ظرفیت کم باشد بعد از مدتی PH محیط واکنش به شدت کاهش می یابد و تشکیل رسوب کلسیم کربنات را با مشکل مواجه خواهد کرد. فاور با آنالیز رسوب های $CaCO_3$ پی برد که دو نوع فاز و رسوب از کلسیم کربنات تشکیل می شود، کلسیم کربنات وترایت[†] و کلسیت[‡]. زمانی که PH بالا و دما محیط واکنش پایین باشد کلسیم کربنات وترایت و زمانی که PH پایین و دما محیط واکنش بالا باشد کلسیم کربنات کلسیت بیشتر تشکیل می شود. شکل ۳ نمایی از عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی را نشان می دهد. [۵]

* Favre
† Vaterite
‡ Calcite



شکل ۳ - عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی از کربنات کلسیم جامد تشکیل شده در (a) ۵ درجه سانتی گراد با آنزیم (b) ۲۰ درجه سانتی گراد با آنزیم (c) ۵ درجه سانتی گراد بدون آنزیم و (d) ۲۰ درجه سانتی گراد بدون آنزیم [۵]

رامانان* و همکاران اثر یون های گوناگون را بر فعالیت آنزیم کربنیک انهیدراز بررسی کردند و نتیجه گرفتند که یون های فلزی مثل Pb^{2+} و Hg^{2+} مانع فعالیت آنزیم می شوند و یونهای نظیر کلسیم و منگنز تا حدودی فعالیت را کاهش می دهند. همچنین Cu^{2+} و Co^{2+} و Fe^{3+} موجب بهبود فعالیت آنزیم می شوند. همچنین مشخص شد که SO_4^{2-} موجود در گاز خروجی از دودکش پالایشگاه و مراکز صنعتی تنها آنیونی است که تاثیر مثبت بر میزان فعالیت این آنزیم دارد. [۶]

۴. تثبیت آنزیم کربنیک انهیدراز

تثبیت آنزیم یکی از کارآمدترین روش ها برای بکارگیری حداکثری از فعالیت آنزیم در واکنش آنزیمی می باشد. برای این منظور آنزیم را بر روی مواد جامد تثبیت می کنند. کرومبلیس[†] در سال ۱۹۸۸ از دانه های سیلیس و میله های گرافیتی به عنوان تثبیت کننده آنزیم کربنیک انهیدراز گاوی استفاده کرد. مواد حامل آنزیم به سبب استحکام، غیر آلی و غیر سمی بودنشان و همچنین سطح تماس بالا انتخاب شدند. این آزمایشات در برج پر شده از حامل های تثبیت شده با آنزیم کربنیک انهیدراز انجام شد.

تثبیت آنزیم BCA[‡] بر روی میله های گرافیتی به صورت پیوند آمیدی بین یکی از پروتئین های موجود در آنزیم و سطح فعال شده گرافیت با N-Hydroxysuccinimide اتفاق می افتد. برای فعالسازی سطح گرافیت جهت عملیات تثبیت آنزیم نیاز است که میله گرافیتی را برای ۱۰ دقیقه در یک راکتور پلاسمایی تحت فرکانس رادیویی، توان ۱۰ وات و

* Ramanan

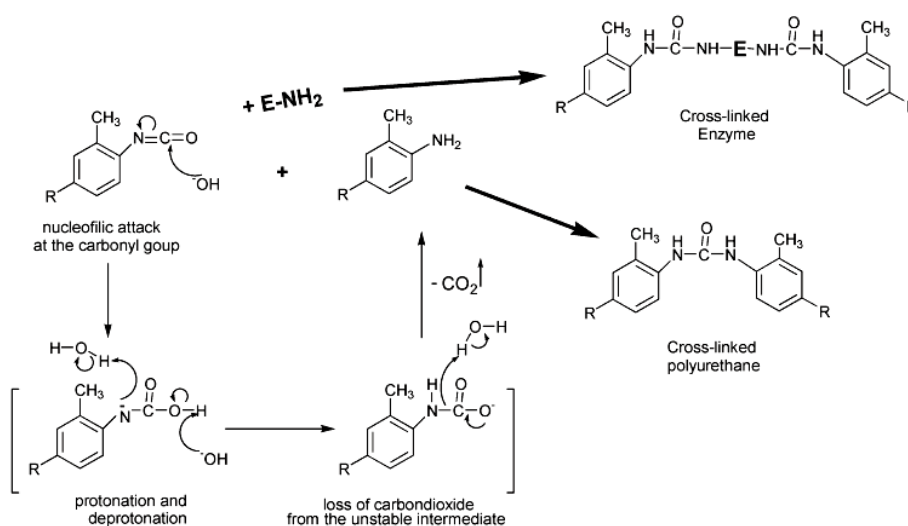
† Crumbliss

‡ Bovine Carbonic Anhydrase



فشار گاز اکسیژن که حدود ۱۰۰ میلی تور باشد قرار داده تا گروه کربوکسیلات روی آن اکسید شود. سپس لوله های گرافیتی را در حضور carbodiimide و p-dioxane و گاز نیتروژن قرار داده که این عمل منجر به فعال شدن سطح گرافیتی با N-hydroxysuccinimide می شود. این گرافیت فعال شده برای تثبیت آنزیم در محلول BCA مورد نظر قرار داده می شود. [۷]

اوزدمیر* و همکارانش آنزیم استاندارد کربنیک انهیدراز را در دمای اتاق در فوم پلی اورتان (PU) تثبیت کردند. این ماده به خاطر خاصیت آب گریزی شدید و خواصی که به عنوان یک ماده پلیمری متخلخل دارد گزینه مناسبی برای تثبیت کربنیک انهیدراز است. آنزیم تثبیت شده در PU بعد از ۴۵ روز تست و عملیات ۱۰۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرد. در این تست مشخص گردید که آنزیم تثبیت شده در PU توانایی تحمل ۷ سیکل عملیات را دارد و دمای بهینه عملیاتی آن ۳۵ تا ۴۵ درجه سلیسیوس است. شکل ۴ ساختار شیمیایی تثبیت آنزیم به همراه مرحله پلیمریزاسیون در محیط آبی را نشان می دهد. [۸]



شکل ۴- ساختار شیمیایی تثبیت آنزیم به همراه مرحله پلیمریزاسیون در محیط آبی [۸]

پرابو[†] و همکارانش مواد مختلف و پلیمرهایی با پایه بیولوژیکی متفاوتی را برای تثبیت باکتری مولد آنزیم به همراه کربنیک انهیدراز مورد بررسی قرار دادند. تثبیت سلول منبع تولید آنزیم در مواقعی که تولید و استخراج آنزیم بسیار مشکل یا پرهزینه باشد مورد توجه قرار می گیرد. بر این اساس در این تحقیق گونه *Bacillus pumilus* به همراه آنزیم کربنیک انهیدراز بر روی حامل های مختلف تثبیت گردید. مواد زیر به عنوان حامل فرایند تثبیت مورد استفاده قرار گرفتند:

۱. دانه کیتوزان - NaOH
۲. دانه کیتوزان - KOH
۳. دانه کیتوزان - NH₄OH
۴. دانه های آلژینات سدیم

* Ozdemir

† Prabhu



۵. دانه کیتوزان و آلژینات سدیم CaCl_2
۶. دانه های کیتوزان- پلی وینیل الکل
۷. دانه های کیتوزان-خاک رس
۸. دانه های کیتوزان- مزو آلومینا
۹. دانه های کیتوزان- NaOH اتصال عرضی شده با گلوکارآلدئید
۱۰. دانه های کیتوزان- NH_4OH اتصال عرضی شده با گلوکارآلدئید
۱۱. دانه های چند لایه (لایه های کیتوزان و آلژینات)

بر اساس نتایج بیشترین فعالیت آنزیمی در کیتوزان- NH_4OH ، دانه های چند لایه و دانه های آلژینات مشاهده شد. این به این دلیل است که گروه هیدروکسیل موجود در سطح این جذب را آسان تر می کند که با جذب بیشتر آنزیم، فعالیت آنزیمی کلی نیز بیشتر می گردد. [۹]

۵. نتیجه گیری

با پیشرفت چشمگیر تکنولوژی و صنایع مختلف میزان انتشار دی اکسید کربن به جو رشد بسیار زیادی داشته است. روش های متعددی برای جذب و ذخیره سازی دی اکسید کربن پیشنهاد شده است که روش های بیولوژیکی به دلایلی نظیر مقرون به صرفه بودن، کارایی قابل قبول نسبت به هزینه صرف شده و همچنین دوستدار محیط زیست بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. روش جذب و تبدیل آنزیمی به عنوان یکی از روش های بیولوژیکی به دلیل سریع بودن نسبت به سایر روش های بیولوژیکی کارآمد تر به نظر می رسد. برای این کار از آنزیم کربنیک آنهیدراز جهت تسریع هیدراتاسیون دی اکسید کربن استفاده می شود. در این روش، یون بی کربنات توسط واکنش با یک یون فلزی مناسب به صورت کربنات جامد در می آید که میتوان تا میلیون ها سال آن را نگه داری و ذخیره کرد. البته هیدراتاسیون دی اکسید کربن موجب کاهش pH می شود و این محیط اسیدی تا حدودی بر تشکیل رسوب کلسیم کربنات اثری منفی دارد. از معایب استفاده از آنزیم کربنیک آنهیدراز می توان به دشواری تهیه و استخراج آن اشاره کرد. در این مواقع می توان سلول مولد آنزیم را بر سطح مناسب تثبیت کرد و از آن برای انجام واکنش مورد نظر استفاده کرد.

۶. مراجع

1. Tashian, R. (1989). *The carbonic anhydrases: Widening perspectives on their evolution, expression and function*. Bio Essays, **10** (6), pp.186-192.
2. Tripp, B., Smith, K. and Ferry, J. (2001). *Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme*. Journal of Biological Chemistry, **276** (52), pp.48615-48618.
3. M.E. Russo, G. Olivieri, A. Marzocchella, P. Salatino, P. Caramuscio, C. Cavaleiro. (2013). *Post-combustion carbon capture mediated by carbonic anhydrase*. Separation and Purification Technology 107 331-339.



4. Mirjafari, P., Asghari, K., and Mahinpey, N. (2007). *Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO₂ sequestration purposes*. Industrial and Chemical Engineering Resources, **46**, pp. 921–926.
5. Favre, N., Christ, M. L., and Pierre, A. C. (2009). *Biocatalytic capture of CO₂ with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **60**, pp. 163–170.
6. Ramanan, R., Kannan K., Devi S. S., Mudliar, S., Kaur, S., Tripathi, A. K., and Chakrabarti, T. (2009a). *Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from Citrobacter freundii*. World Journal of Microbiology Biotechnology, **25**, pp. 981–987.
7. Crumbliss AL¹, McLachlan KL, O'Daly JP, Henkens RW. (1988), *Preparation and activity of carbonic anhydrase immobilized on porous silica beads and graphite rods*. Biotechnol Bioeng. **31**(8), pp. 796-801.
8. Ozdemir, E. (2009). *Biomimetic CO₂ Sequestration: 1. Immobilization of carbonic anhydrase within polyurethane foam*. Energy & Fuels, **23**, pp. 5725–5730.
9. Prabhu, C., Wanjari, S., Gawande, S., Das, S., Labhsetwar, N., Kotwal, S., Puri, A. K., Satyanarayana, T., and Rayalu, S. (2009). *Immobilization of carbonic anhydrase enriched microorganism on biopolymer based materials*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **60**, pp. 13–21.