

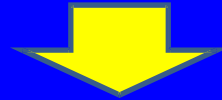
DASAR BIOPROSES IMOBILISASI ENZIM

DODY Guntama, S.T., M.Eng

TEKNIK IMOBILISASI ENZIM

DEFINISI (Chibata, 1978)

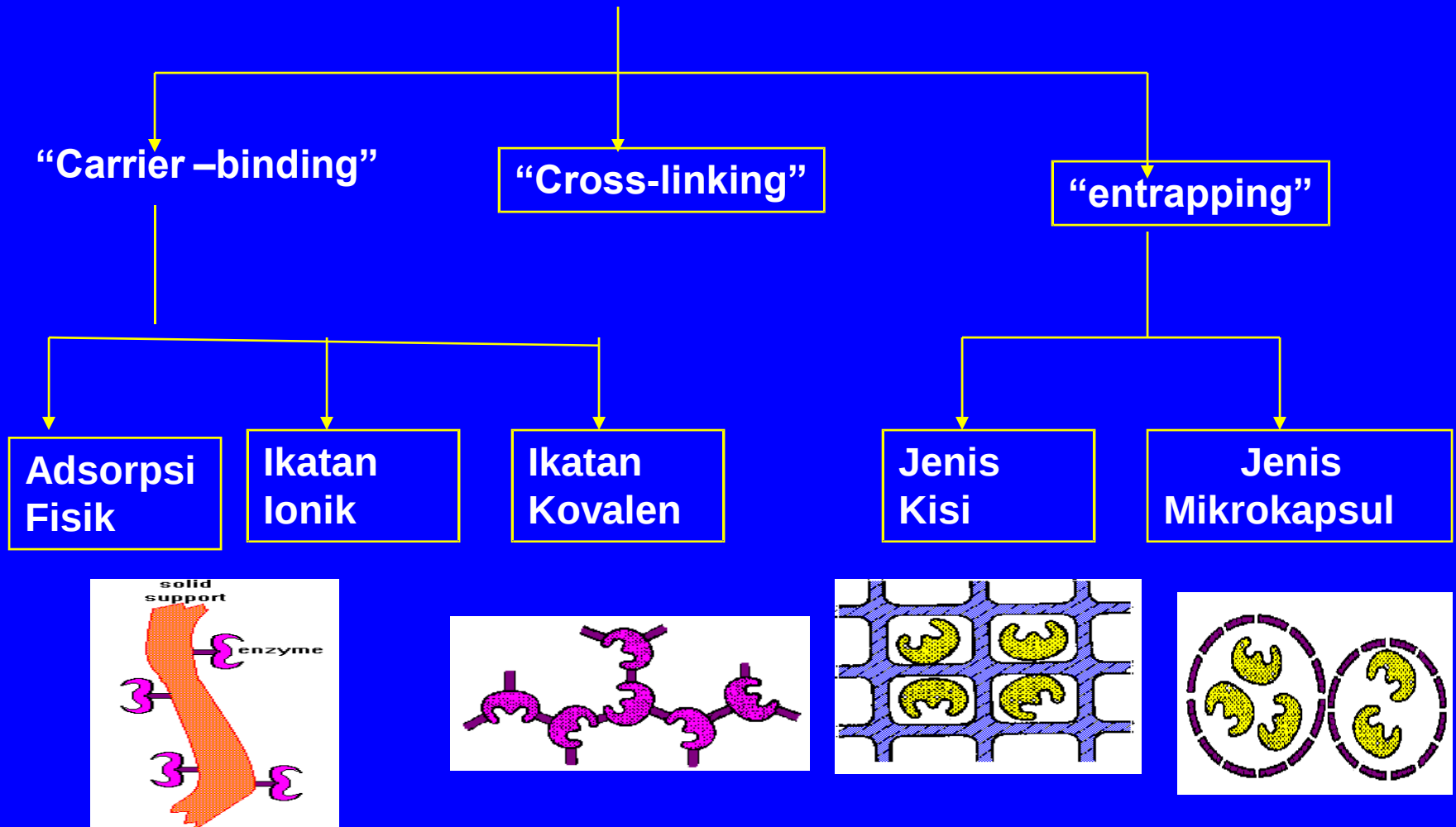
Enzim yang secara fisik ditempatkan di dalam suatu daerah/ruang tertentu, sehingga dapat menahan aktivitas katalitiknya serta dapat digunakan secara berulang-ulang dan kontinyu.



Keuntungan Imobilisasi :

1. Dapat digunakan berulang
2. Penghentian proses cepat (diambil dengan filtrasi, laju alir <<)
3. Kestabilan lebih baik dengan adanya ikatan pada imobilisasi.
4. Hasil tidak terkontaminasi enzim → untuk pangan dan farmasi
5. Dapat digunakan untuk tujuan analisis, misalnya menentukan umur tengah enzim dan perkiraan penurunan aktivitas
6. Dapat digunakan untuk proses kontinyu
7. Pengontrolan lebih baik

METODE IMOBILISASI ENZIM



Bentuk enzim imobil :

Partikel, membran, selongsong atau serat

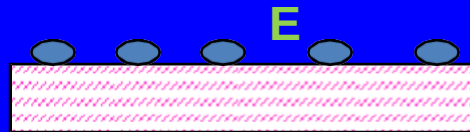
Metode Imobilisasi :

1. "Carrier Binding

- Enzim diikat pada "carrier" (matriks) yang tidak larut air



luas permukaan diemeter pori → muatan enzim



- Jenis :

- a. Adsorbsi fisik

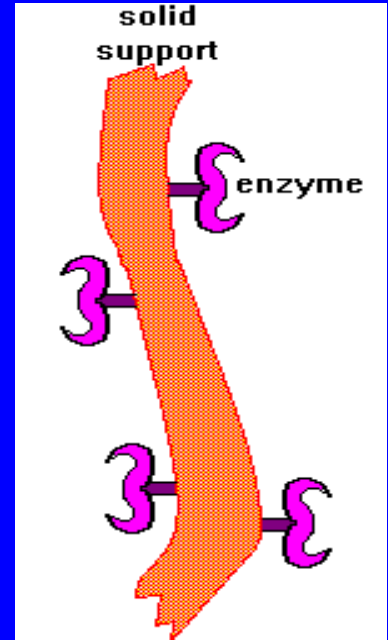
- ~ Mudah dilakukan dan ekonomis
 - ~ Enzim diadsorbsi pada permukaan "carrier"

- Kelebihan :

- ~ Kondisi lunak → aktivitas enzim tetap tinggi
 - ~ Dapat diregenerasi

- Kelemahan :

- ~ Kekuatan ikatan lemah
 - ⇒ pH atau kekuatan ion berubah → bocor!
 - ~ Enzim dirusak oleh m.o/enzim proteolitik



Contoh “Carrier” untuk adsorpsi fisik :

- Karbon aktif
- Gelas porous
- Tanah liat
- Kaolinit
- Alumina
- Silika gel
- Bentonit
- hidroksil apatit
- gel Ca-fosfat
- pati
- gluten
- butil sefrosa
- concana valin A

Faktor pemilihan carrier :

- Ukuran partikel
- Diameter pori
- Luas permukaan

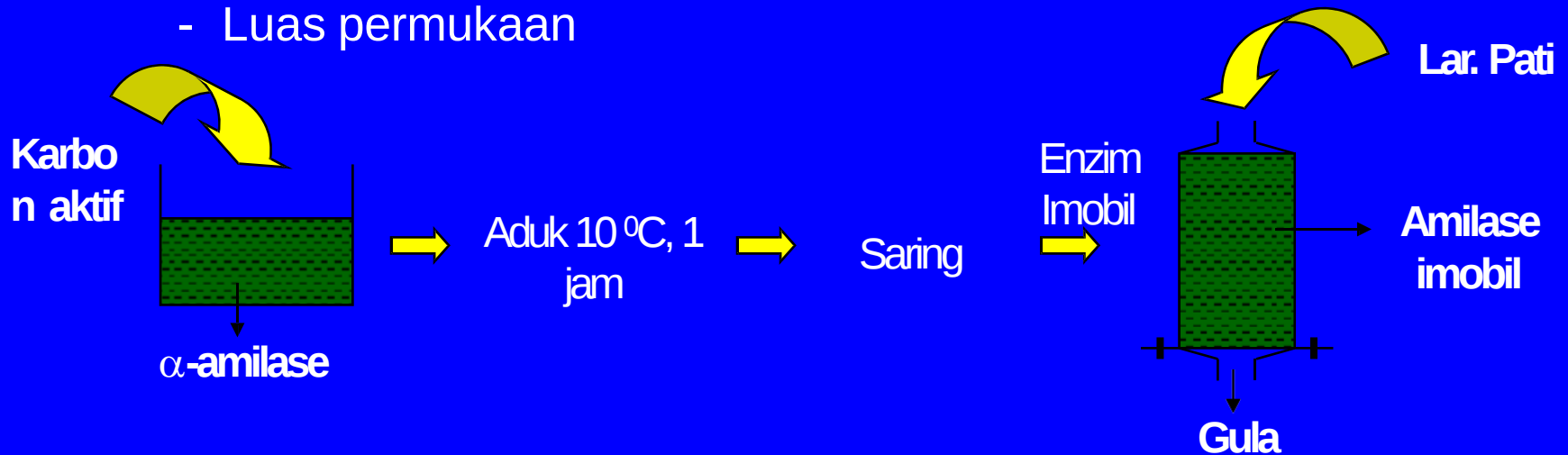


Table 11.14 Adsorption carriers for immobilization of enzymes

Type of carrier	Carrier	Enzyme used
Inorganic	Aluminium oxide	Glucoamylase
	Bentonite	Invertase
	Glass	Lipase
	Ca phosphate gel	Aspartase
Organic	Activated carbon	Glucose oxidase
		α -Amylase
		β -Amylase
		Glucoamylase
	Starch	Invertase
		α -Amylase
		Glucose isomerase
	Tannin aminoethyl cellulose	Aminoacylase

KEUNTUNGAN

- 1) Kondisi ringan dan pengoperasian yang mudah;
- 2) Biaya bahan pembawa dan prosedur imobilisasi yang relatif murah;
- 3) Tidak ada persyaratan aditif kimia selama adsorpsi;
- 4) Regenerasi pembawa yang mudah untuk didaur ulang; dan
- 5) Perolehan kembali aktivitas enzim yang tinggi.

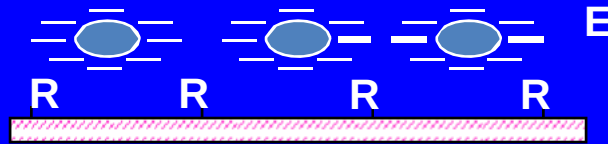


KEKURANGAN

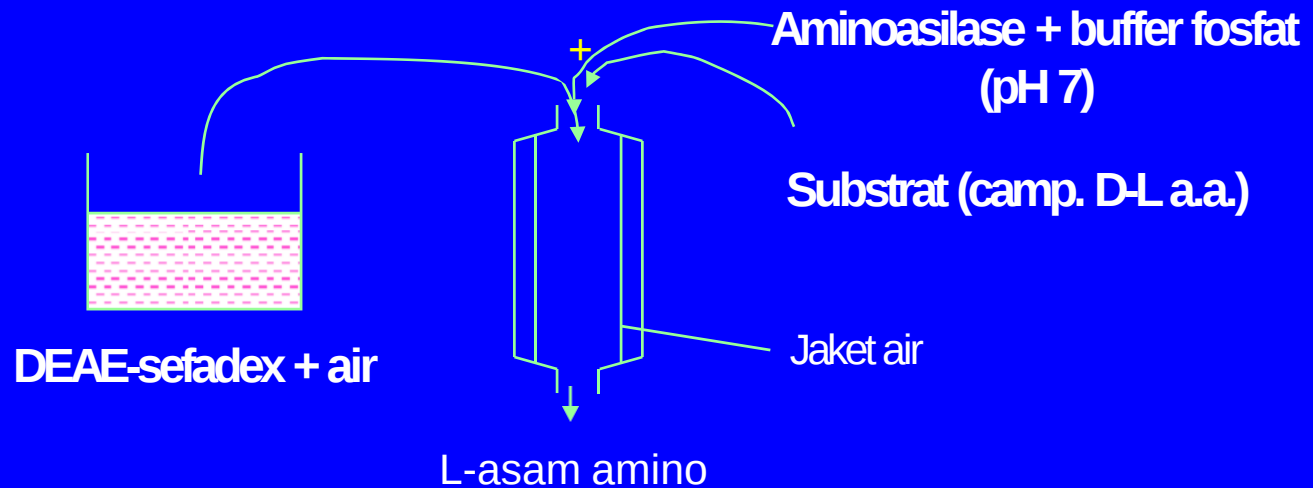
- 1) Karena hanya melibatkan ikatan yang lemah, oleh karena itu desorpsi enzim atau lepasnya enzim dari permukaan matriks akibat perubahan suhu, pH, kekuatan ionik atau bahkan keberadaan substrat, sering terjadi.
- 2) Jika adsorpsi terjadi secara non-spesifik maka protein atau senyawa lain juga dapat teradsorpsi. Hal ini dapat mengubah sifat-sifat enzim yang diimobilisasi atau jika zat yang teradsorpsi adalah substrat untuk enzim, maka laju reaksinya dapat menurun.
- 3) Efisiensi rendah

b. Ikatan Ionik

- Terjadi ikatan ionik antara enzim dengan “carrier” yang tidak larut air dan mengandung residu penukar ion (R)



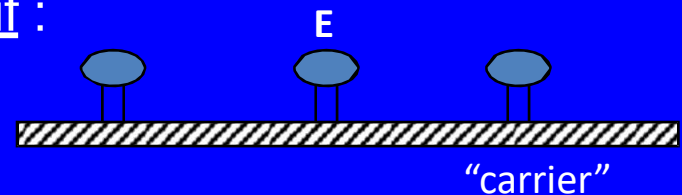
- Kelebihan dan kekurangan sama dengan cara adsorpsi
- Cara immobilisasi :



⇒ Terjadi interaksi antara gugus amine (carrier) yang bermuatan pos dengan gugus karboksil (enzim) yang bermuatan negatif.
Setelah 32 hari → keaktifan masih 60 %

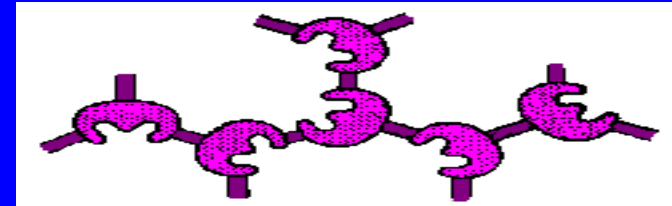
c. Ikatan Kovalen

- Terbentuk ikatan kovalen antara enzim dengan “carrier” tidak larut dalam air $\Rightarrow$ ikatan kuat & tdk bocor
- Gugus fungsional enzim yang berperan :
 - 1) α atau β -amino
 - 2) α , β , atau γ -karboksil
 - 3) Sulfohidril
 - 4) Hidroksil
 - 5) Imidazol
 - 6) Fenolik
- “Carrier” mengandung gugus reaktif :
 - ✓ Diazonium
 - ✓ Asam azida
 - ✓ Isosianat
 - ✓ Halida
- Kelemahan : konformasi berubah $\rightarrow$ aktivitas hilang



2. Cross Linking (Ikatan Silang)

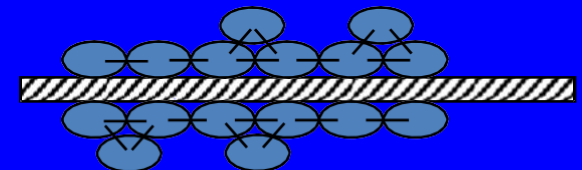
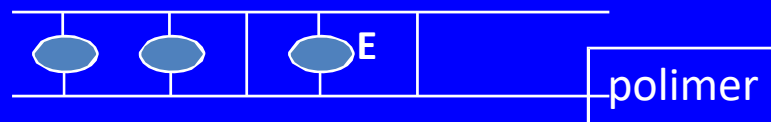
- Terjadi ikatan kimia, tetapi tidak digunakan *carrier* tidak larut air
⇒ Pembentukan ikatan melintang inter molekuler antara molekul enzim dengan pereaksi bifungsional atau multifungsional.
- Pereaksi :
 - ✓ glutaraldehid ⇒ paling banyak digunakan
 - ✓ diazobenzidine (atau turunannya)
 - ✓ Etil khloroformat
 - ✓ N-N-hexamethylene bisiodoasetat
 - ✓ dll



Untuk meningkatkan stabilitas ⇒ *cross linking* + adsorpsi

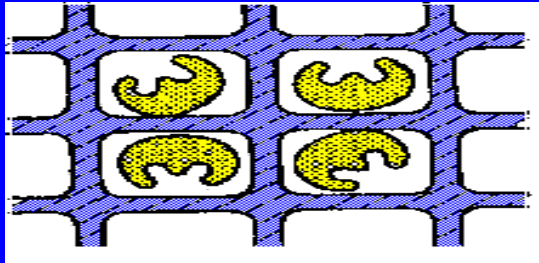


Kopolimerisasi

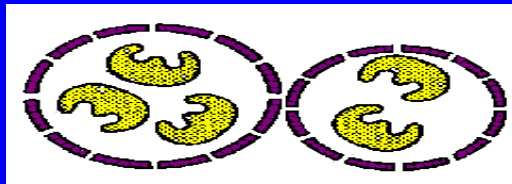


3. Entrapping (penjeratan)

- Lokalisasi enzim dalam kisi matriks atau mikrokapsul (membran semipermeabel)
 - ⇒ Enzim tidak terikat pada matriks gel atau membran



⇒ tipe kisi



⇒ tipe mikrokapsul

1 – 300 mμ

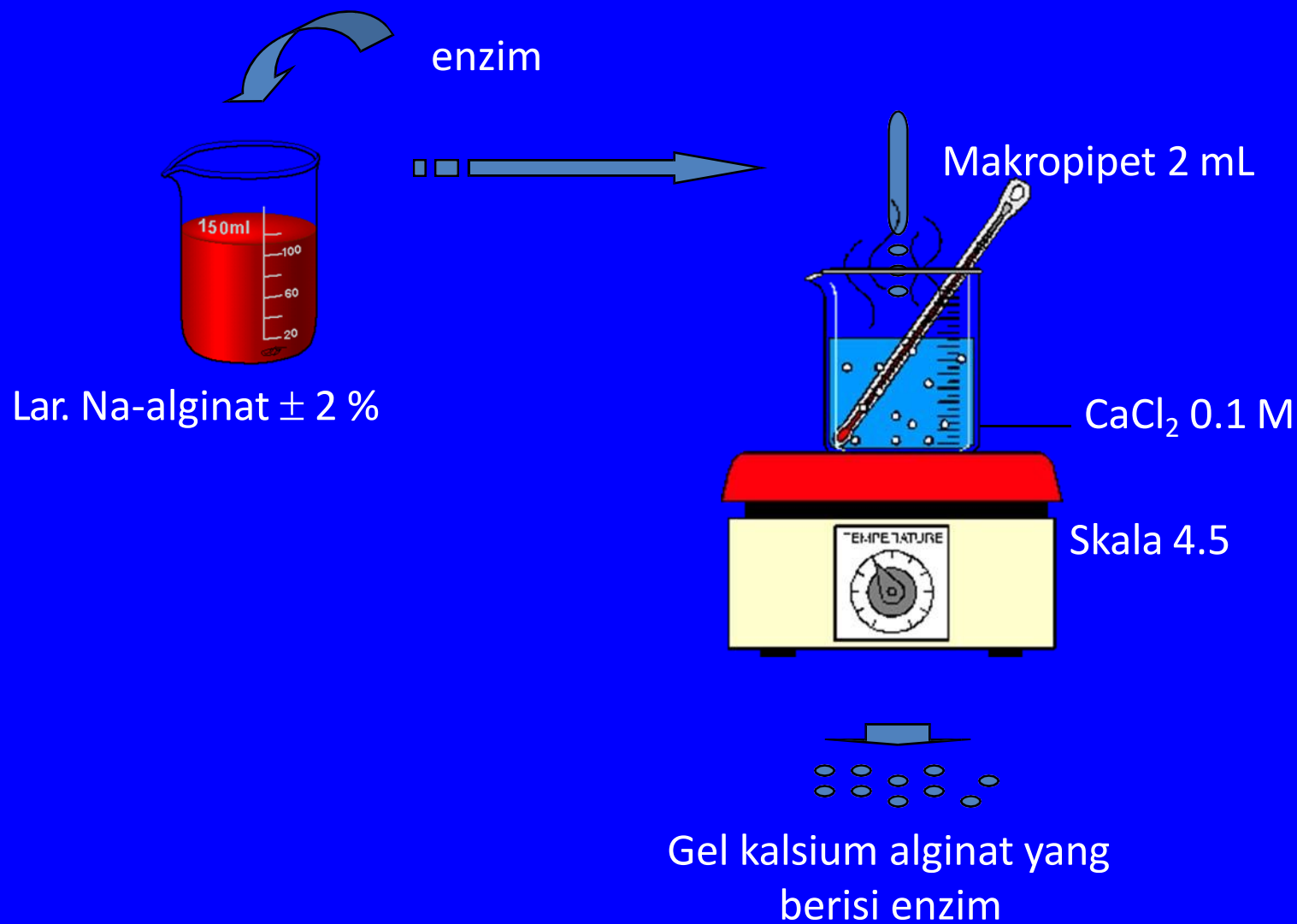
Membran
polimer
permanen

Mikrokapsul tidak
permanen

Bahan :

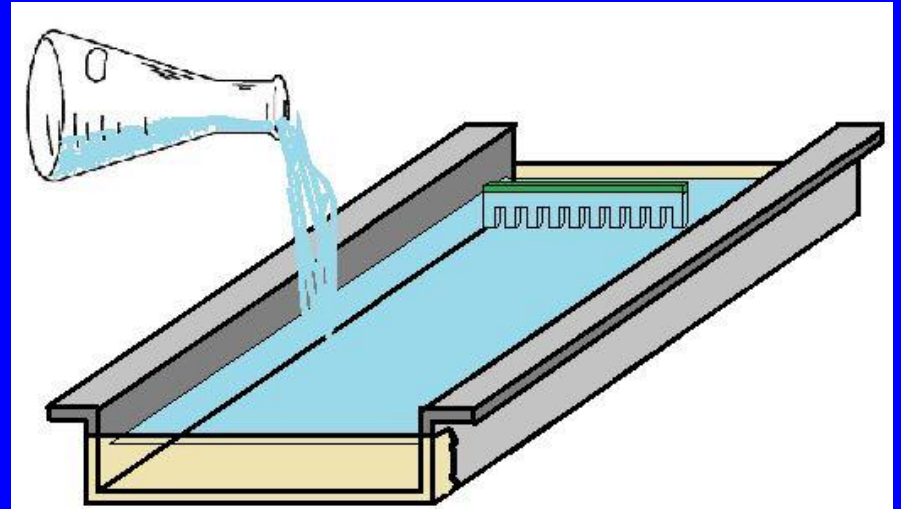
- Nilon
- Poliurea
- Etil selulosa
- Polistiren
- Kolodion
- Nitroselulosa
- Butil asetat selulosa

Cara Penjeratan Tipe Kisi



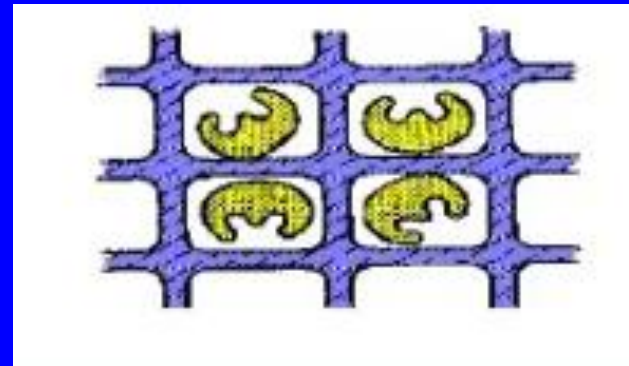
MATRIKS YANG DIGUNAKAN :

- 1) Gel poliakrilamida
- 2) Triasetat selulosa
- 3) Agar
- 4) Gelatin
- 5) Karagenan
- 6) Alginat

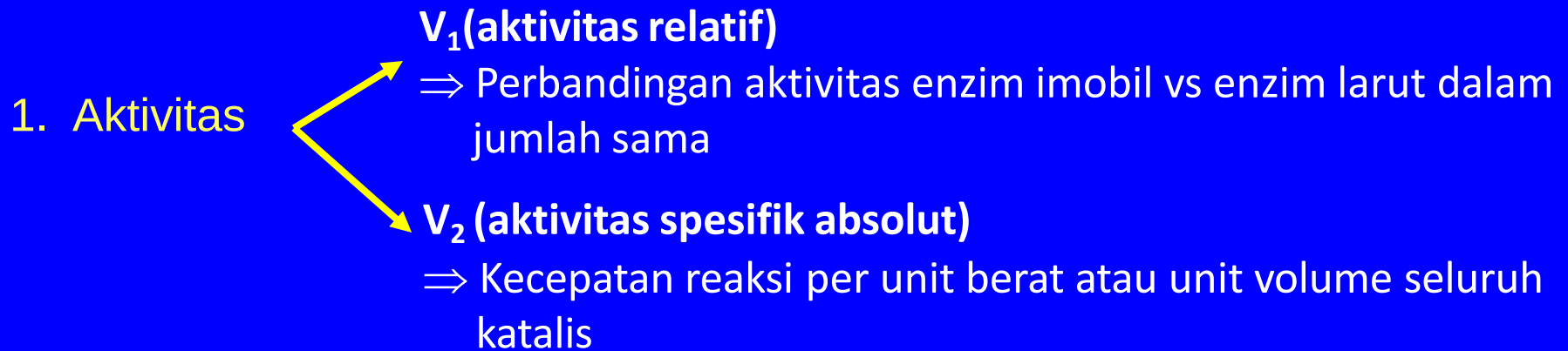


TEKNIK YANG DIGUNAKAN :

- 1) Menahan enzim di dalam gel (enzim dijerab dalam gel)
- 2) Menahan enzim dalam serat (enzim dijerab dalam serat penyangga)
- 3) Menahan enzim dalam mikrokapsul (enzim dijerab dalam mikrokapsul yang terbuat dari campuran monomer seperti poliamina dan kalsium alginat)



Perubahan Sifat Enzim Terimobilisasi



$V_1 \Rightarrow$ tidak deaktivasi enzim akibat imobilisasi

$V_2 \Rightarrow$ kemungkinan untuk mengimobilisasi enzim lebih banyak/sedikit per unit volume katalis

Penyebab penurunan aktivitas :

- Konfigurasi $\Rightarrow$ menghalangi substrat
- Grup reaktif pada sisi aktif ikut terikat pada matriks
- Terbentuk konfigurasi tidak aktif
- Kondisi reaksi $\Rightarrow$ denaturasi

2. pH optimum enzim imobil

Penyebab perubahan pH :

⇒ distribusi yang tidak seragam dari ion H^+ , ion OH^- dan substrat bermuatan

Carrier bermuatan **negatif** ⇒ pH optimum bersifat basa

CMC

Maleac anhydride/etilen

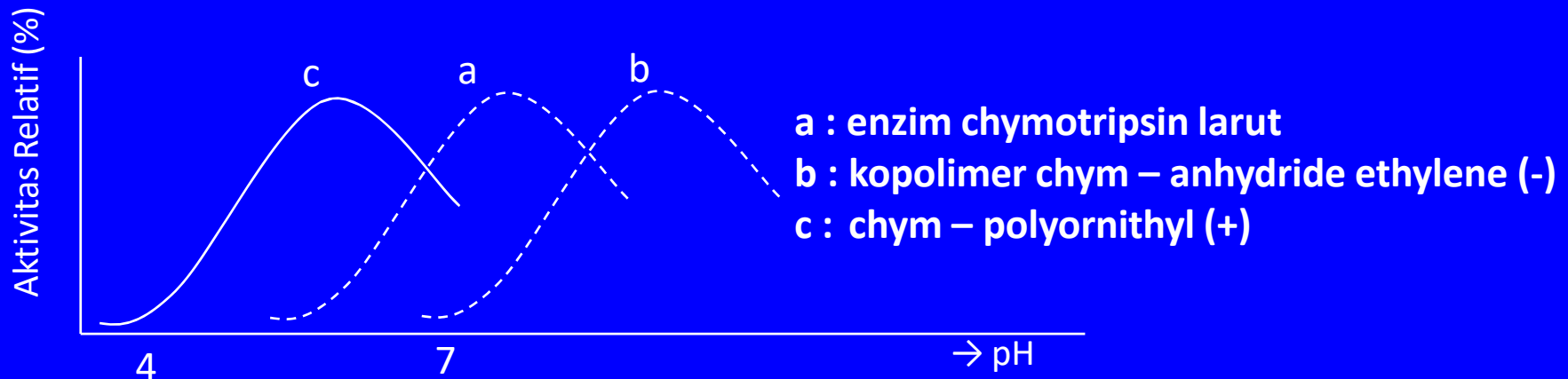
Asam galakturonat

Asam poliaspartat

Carrier bermuatan **positif** ⇒ pH lebih asam

DEAE-selulosa

Polimer polyornithyl



3. Stabilitas

⇒ Stabilitas operasi = $t_{1/2}$ (half-life)
= waktu dimana terjadi kehilangan 50 % dari aktivitas enzim semula

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \qquad k = \frac{2.303}{t} \log \frac{E_0}{E}$$

k = konstanta kerusakan enzim

t = waktu operasi

E_0 = aktivitas enzim mula-mula

E = aktivitas enzim pada waktu t

Stabilitas operasi ditentukan oleh :

- Jenis enzim
- Cara imobilisasi
- Jenis reaktor

Pengukuran Efisiensi Imobilisasi

(Aktifitas enzim yang teradsorbsi pada penyangga)

- Larutan enzim : aktifitas : 591 U/mL
volume larutan : 40 mL
∴ Total aktifitas : $40 \times 591 = 23600 \text{ U}$
- Berat Penyangga : 11 gram
↓
Setelah mobilisasi
→ Aktifitas enzim terimobilisasi : 381 U/g penyangga
∴ Total aktifitas enzim yang teradsorbsi pada penyangga
= $11 \times 381 \text{ U} = 4191 \text{ U}$

∴ Persentase aktifitas enzim teradsorbsi = $4191/23600 \times 100\%$
= 17,8 %

Faktor Pemilihan Metode Imobilisasi

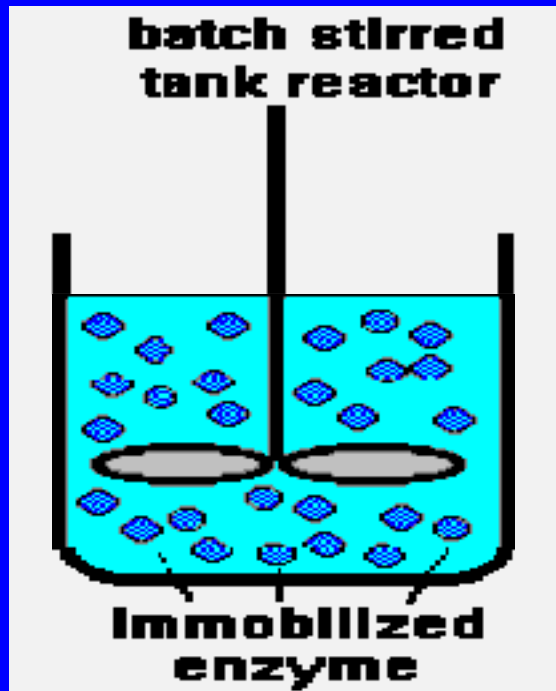
- Sifat Bahan
- Reaksi kimia yang terjadi
- Biaya
- Stabilitas kimia-fisik reaktan & biokatalis
- Hasil & kemurnian produk yg diinginkan

- ❑ Adsorpsi fisik dan ikatan ionik → stabilitas lebih rendah dgn adanya perubahan lingkungan
- ❑ Metode ikatan kovalen pada “carrier” organik sulit diregenerasi
→ tdk sesuai untuk industri
- ❑ Metode ikatan kovalen & cross-linking → perubahan bentuk mol enzim dpt menyebabkan penurunan aktivitas enzim
- ❑ Metode *entrappment* → aktivitas tinggi, tapi harus dihindarkan substrat atau produk ber-BM besar

Pertimbangan Penggunaan Enzim Imobil untuk Industri

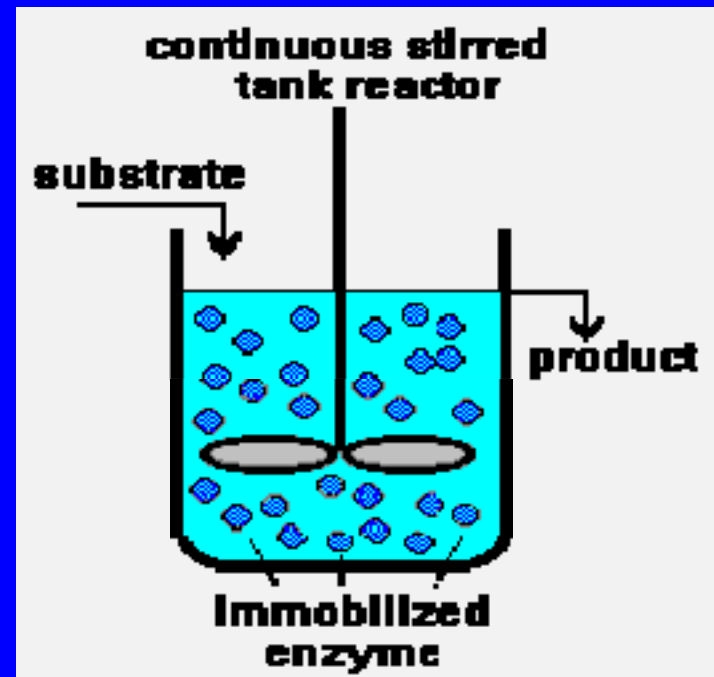
- ❖ Biaya pembuatan enzim imobil → “carrier” sering mahal & sulit diperoleh
- ❖ Aktivitas enzim imobil → penurunan aktivitas dpt menyebabkan konversi rendah
- ❖ Kestabilan enzim imobil → penting untuk menjaga keseragaman produk & tingkat konversi yang tinggi karena dapat menyebabkan rendemen rendah & waktu lbh lama
- ❖ Kemudahan regenerasi enzim

Bioreaktor Enzim Imobil



Reaktor Batch :

- Sederhana
- Viskositas tinggi & aktivitas enzim rendah

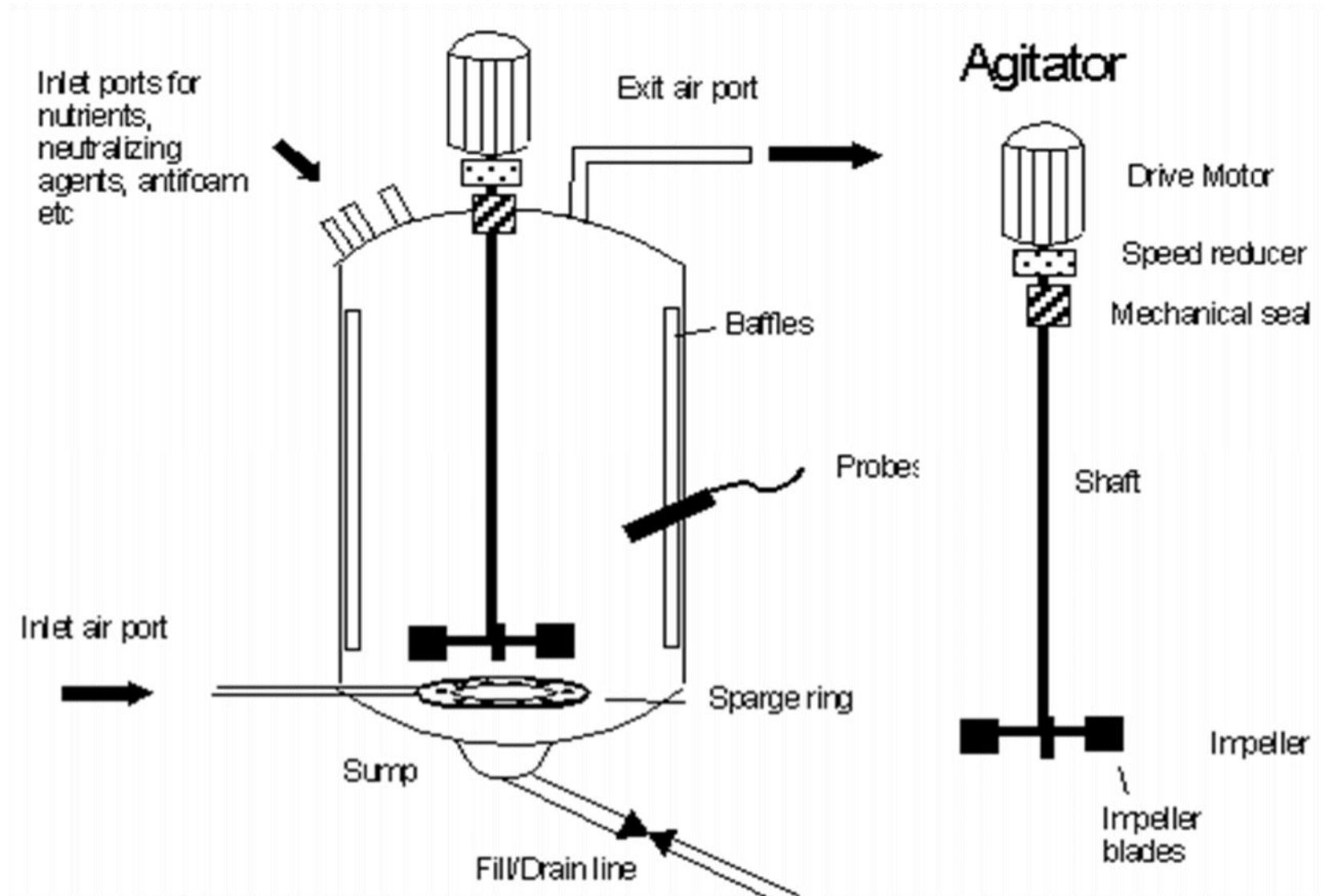


CSTR :

- Pengontrolan lbh mudah
- Cocok untuk kasus inhibisi substrat
- Menghindari kontaminasi enzim oleh substrat dan produk yang terlalu lama

Bioreaktor Tangki Berpengaduk

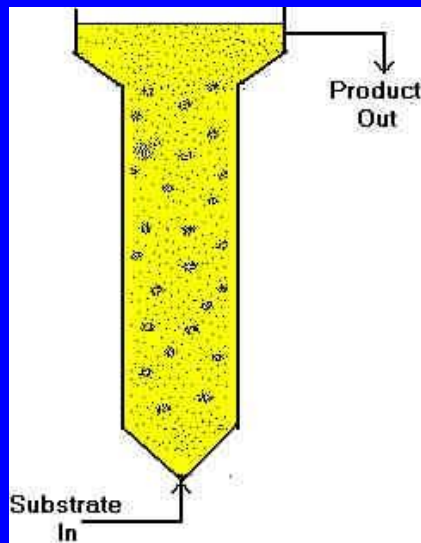
(stirred tank bioreactor = STR)





Fixed-bed PFR (Unggun Diam/Terkemas) :

- Sinambung → paling sering digunakan
- Aliran substrat dpt dari atas, bawah atau daur-ulang

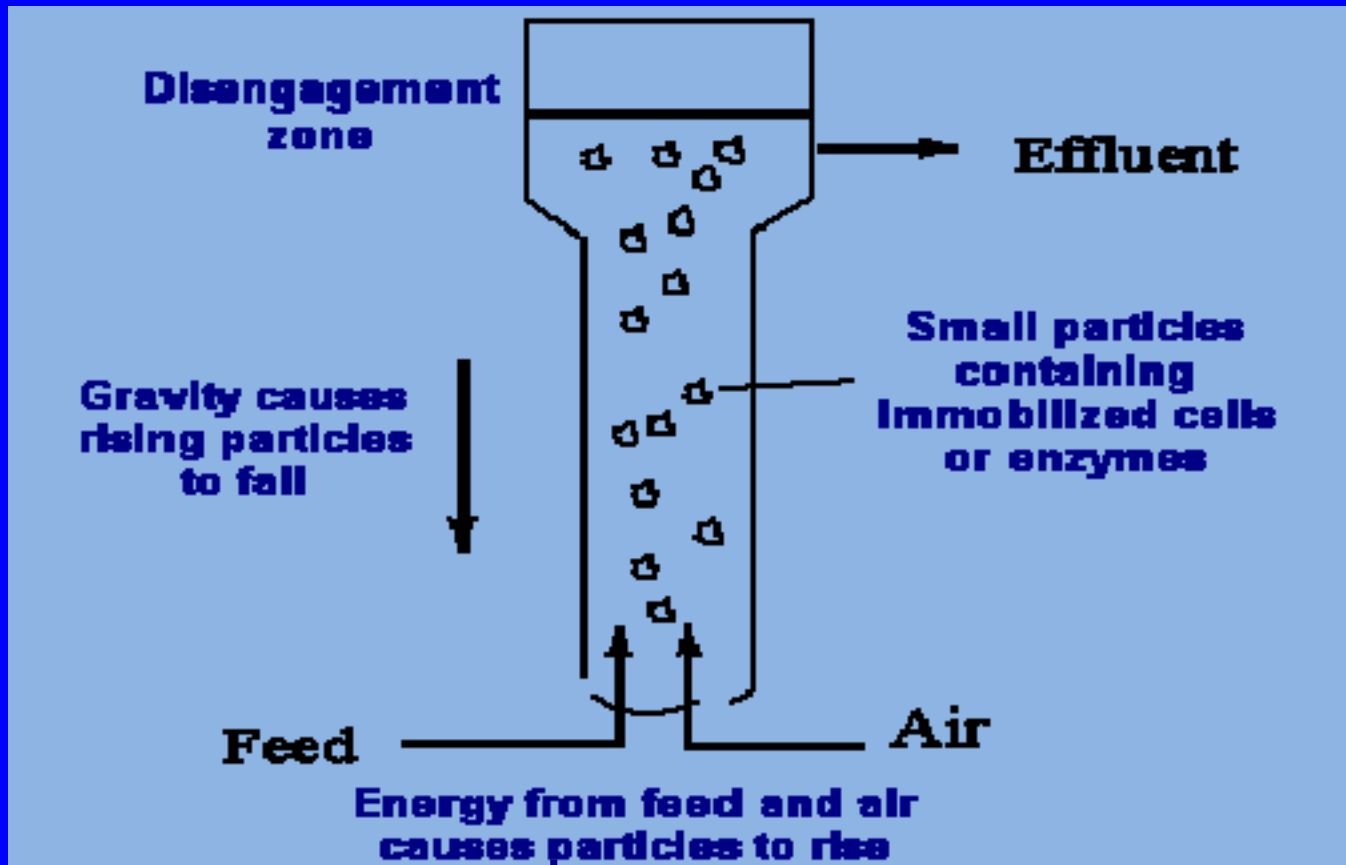


Fluidized-bed (Unggun Terfluidisasi) :

- Untuk viskositas tinggi & terbentuk gas
- Laju fluidisasi perlu diatur agar enzim imobil tak rusak

Fluidized Bed Reactors

- ↗ Laju transfer massa & panas yang lebih baik
- ↗ Digunakan sel imobil atau enzim imobil
- ↗ Pencampuran dibantu dengan pompa pada bagian dasar tangki, sehingga katalis yang telah diimobilisasi bergerak bersama cairan



Reaktor Packed bed/Fixed bed

Faktor Pola Aliran

- Aliran ke bawah tidak banyak digunakan karena pada penggunaannya, enzim imobil berada pada bagian bawah reaktor yang akan menyebabkan pemampatan reaktor oleh manik.
- Aliran ke atas banyak digunakan karena enzim tidak menghalangi pengeluaran produk dan dapat langsung kontak dengan substrat

Faktor Kecepatan alir substrat :

➔ mempengaruhi kecepatan penurunan aktivitas enzim.

Penyebab :

- Kestabilan enzim yang semakin melemah

Faktor Pemilihan Bioreaktor :

- Bentuk enzim imobil (partikel/manik, membran atau serat)

Tipe manik :

dapat menggunakan bioreaktor berimpeler namun dengan agitasi yang tidak terlalu besar karena dapat merusak *carrier*.

- Enzim imobil kebanyakan dibuat dalam bentuk manik karena mudah ditangani dan *carrier*-nya tersedia secara komersial
- Ukuran manik akan mempengaruhi laju reaksi antara enzim dengan substrat.
- Penggunaan manik berukuran kecil akan lebih efektif karena :
Memperluas bidang kontak enzim dengan substrat dan menurunkan tahanan difusi manik terhadap substrat.

Tipe membran dan serat :

rawan untuk menggunakan bioreaktor dengan agitasi ,namun bisa digunakan reaktor *packed bed/fixed bed* (unggun terkemas)

- Sifat alami substrat (larut, mengandung partikel dll)
- Kebutuhan operasi reaksi, misalnya pengeturan pH
- Kinetika Reaksi
- Kapasitas muatan “carrier”
- Perbandingan permukaan katalis
- Karakteristik pindah massa & panas → difusi
- Kemudahan pergantian katalis & regenerasi
- Kemudahan fabrikasinya
- Biaya pembuatan bioreaktor

Contoh Aplikasi

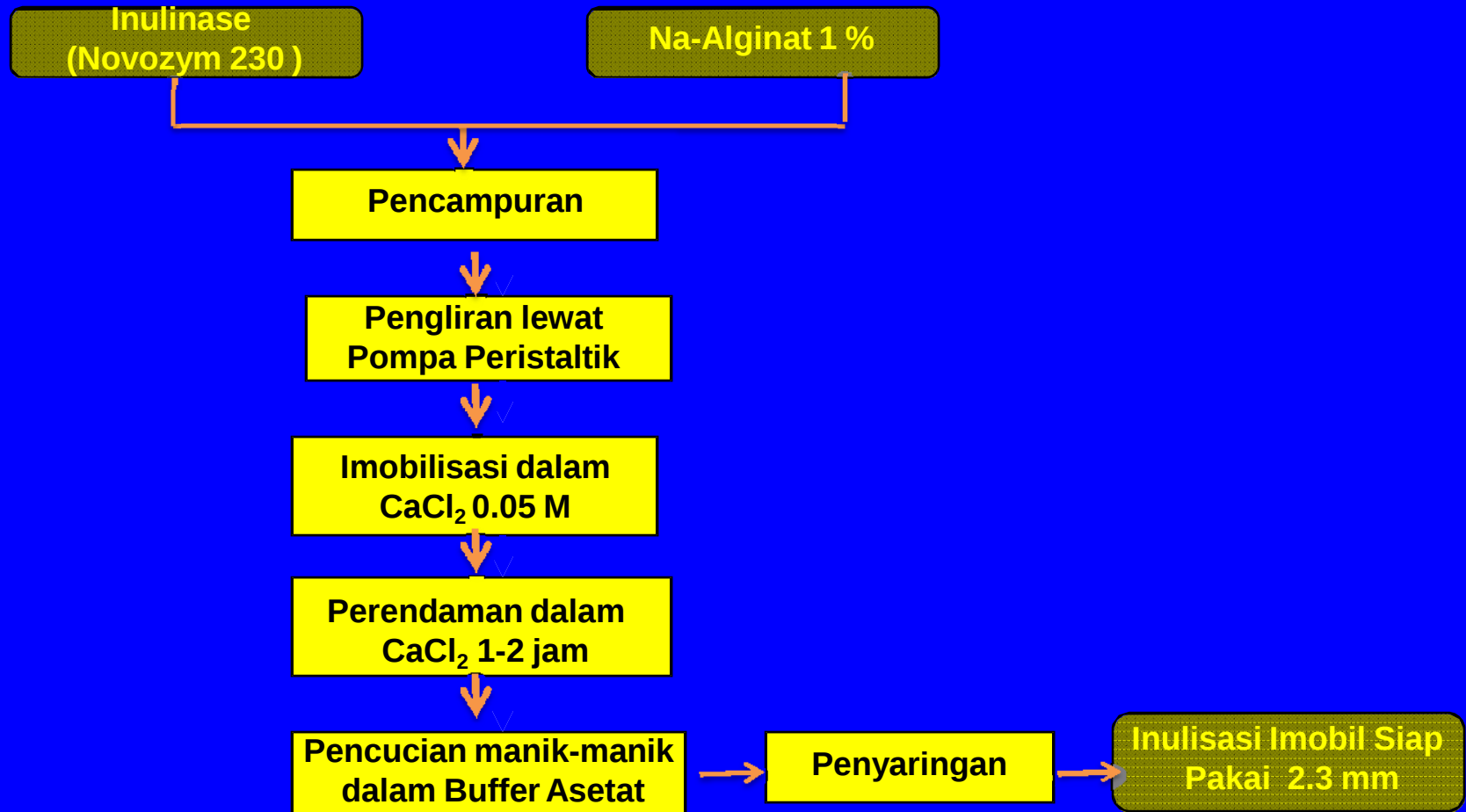
- Produksi sirup Fruktosa dari Inulin Umbi Dahlia Dalam Reaktor Sinambung Unggun Terkemas Menggunakan Enzim Inulinase Imobil

(Skripsi Sujatmono , T.S, 1992)

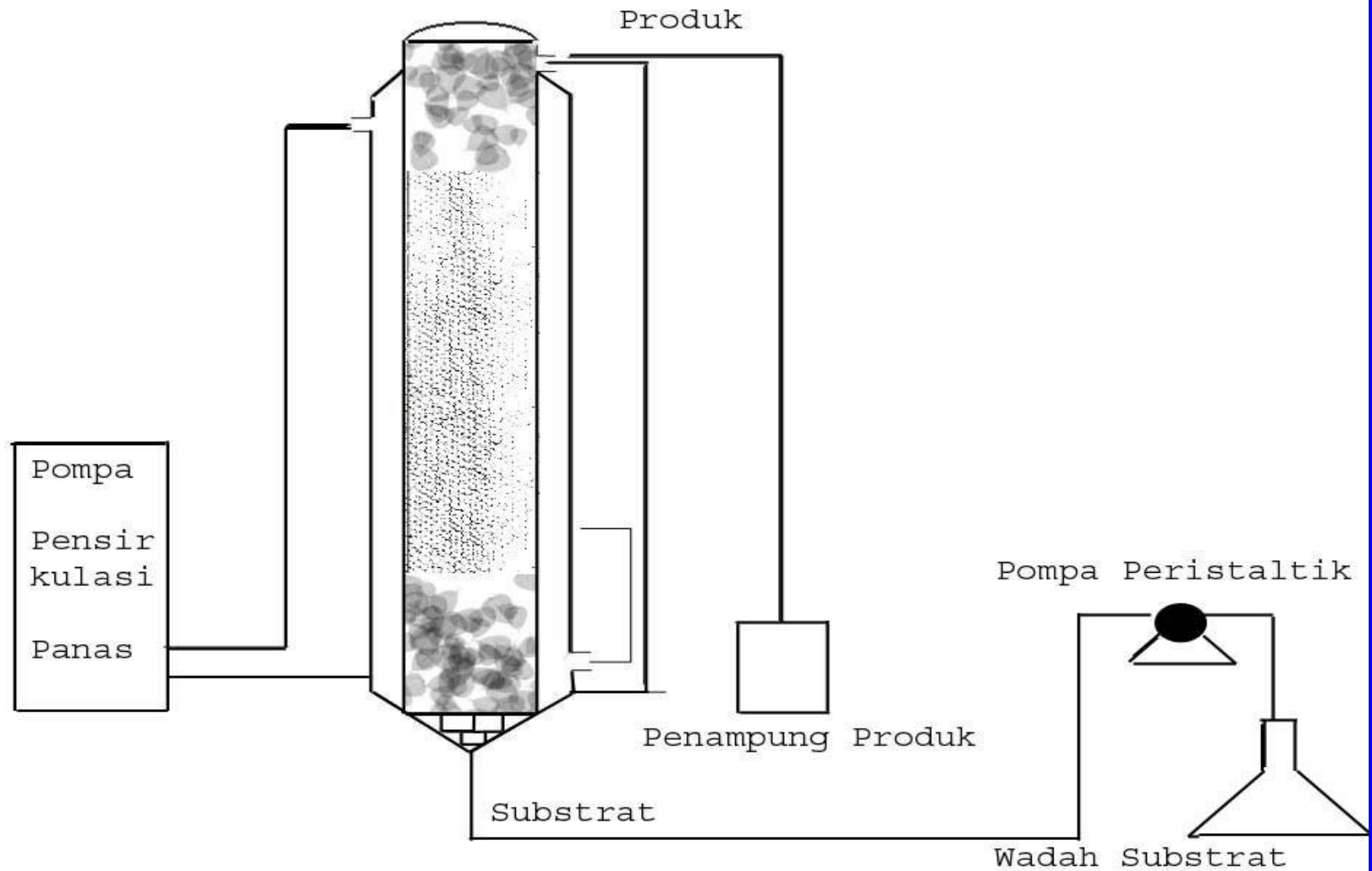
Pembuatan Substrat Inulin



Pembuatan Enzim Inulinase Imobil



Bioreaktor yang digunakan



Fermentasi Etanol Sinambung menggunakan Sel Khamir Imobil

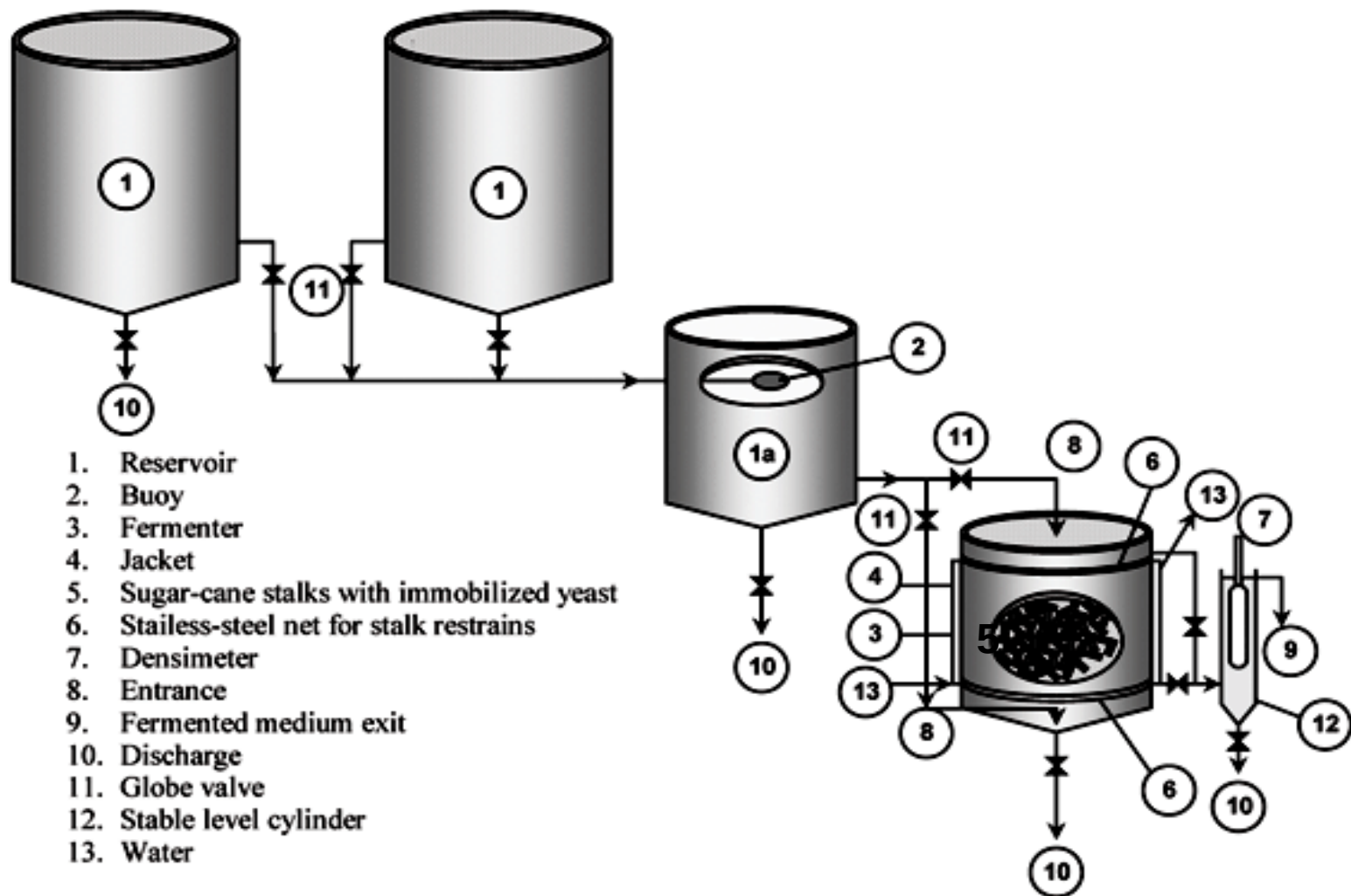


Figure 1: Flow of the continuous alcoholic fermentation process with yeast immobilized on sugar-cane stalks.