

m.k ENZIM (S2)

**IMOBILISASI ENZIM**

PROGRAM STUDI TIP IPB  
2008

Dosen : Liesbetini Hartoto

# TEKNIK IMOBILISASI ENZIM

## DEFINISI (Chibata, 1978)

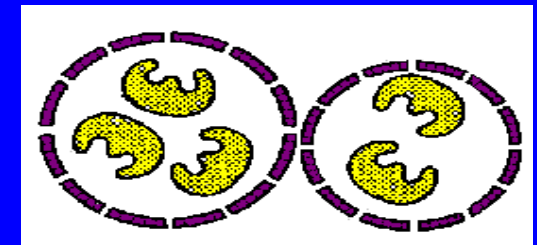
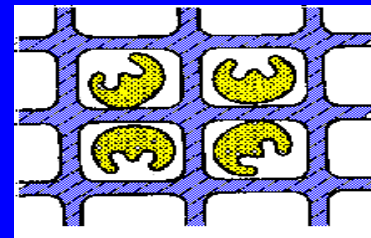
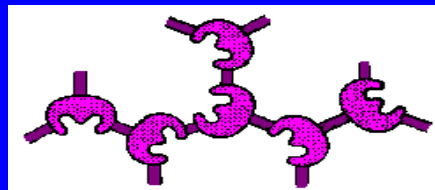
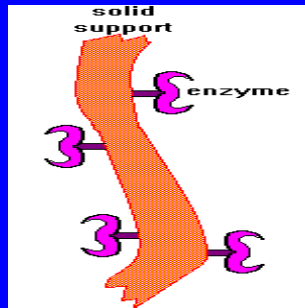
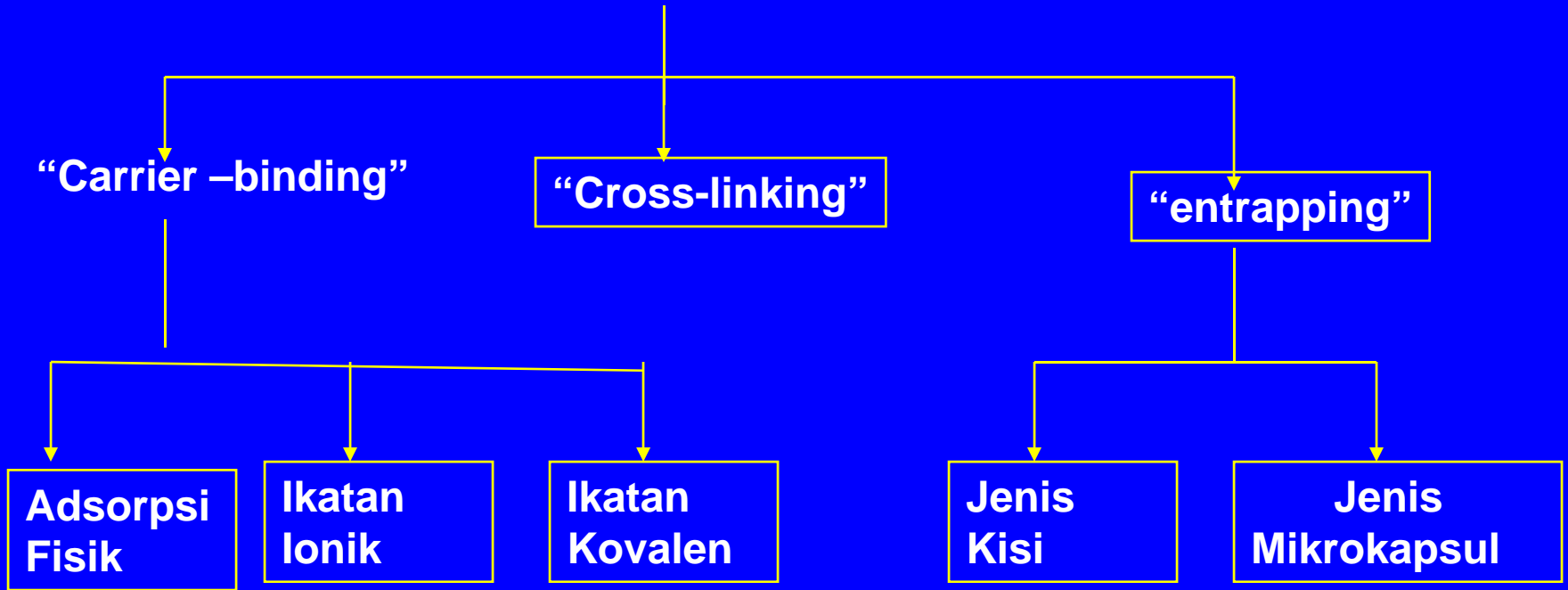
Enzim yang secara fisik ditempatkan di dalam suatu daerah/ruang tertentu, sehingga dapat menahan aktivitas katalitiknya serta dapat digunakan secara berulang-ulang dan kontinyu.



## 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

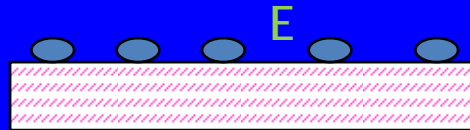
# Metode Imobilisasi :

## 1. "Carrier Binding

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



luas permukaan diemeter pori → muatan enzim



- Jenis :

### a. Adsorpsi fisik

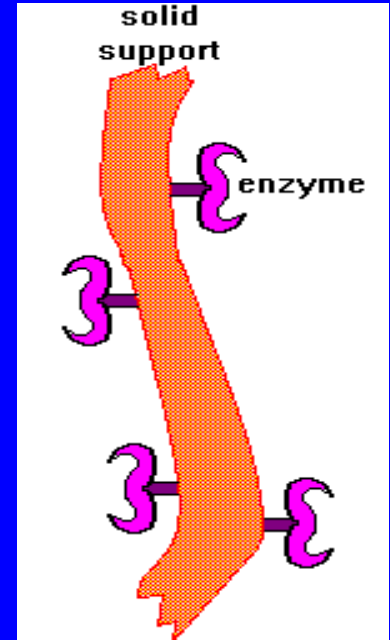
- ~ Mudah dilakukan dan ekonomis
- ~ Enzim diadsorpsi pada permukaan "carrier"

### 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

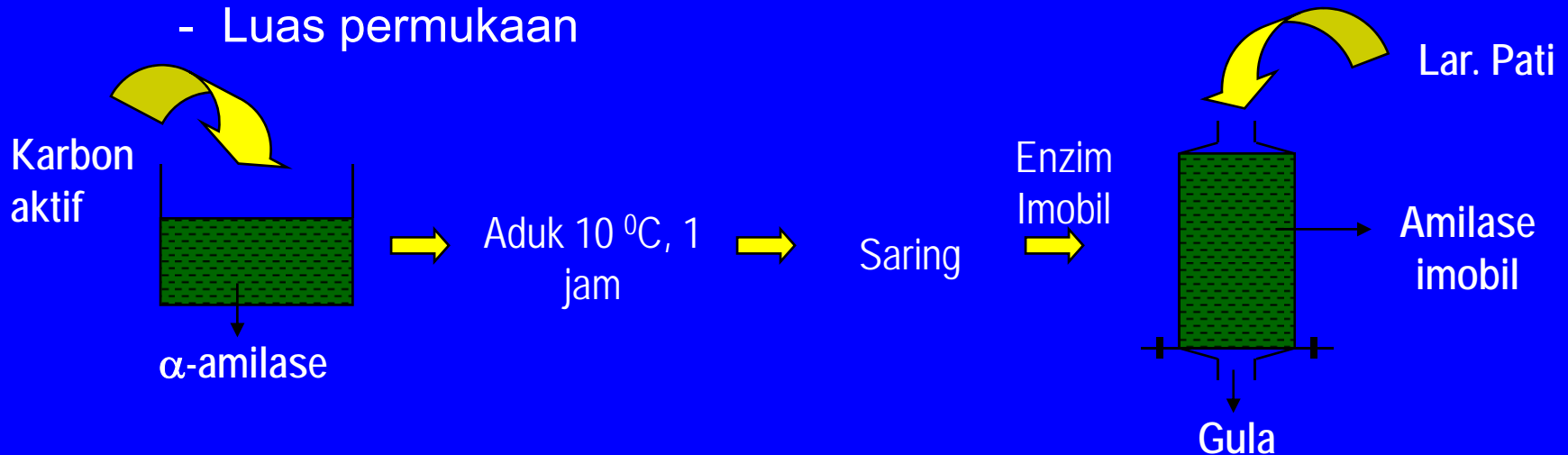


## Contoh “Carrier” untuk adsorpsi fisik :

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

## Faktor pemilihan carrier :

- Ukuran partikel
- Diameter pori
- Luas permukaan

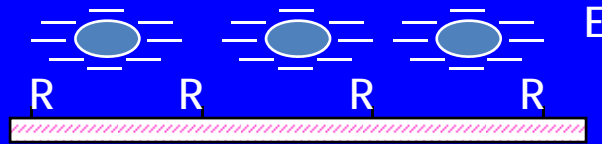


**Table 11.14** Adsorption carriers for immobilization of enzymes

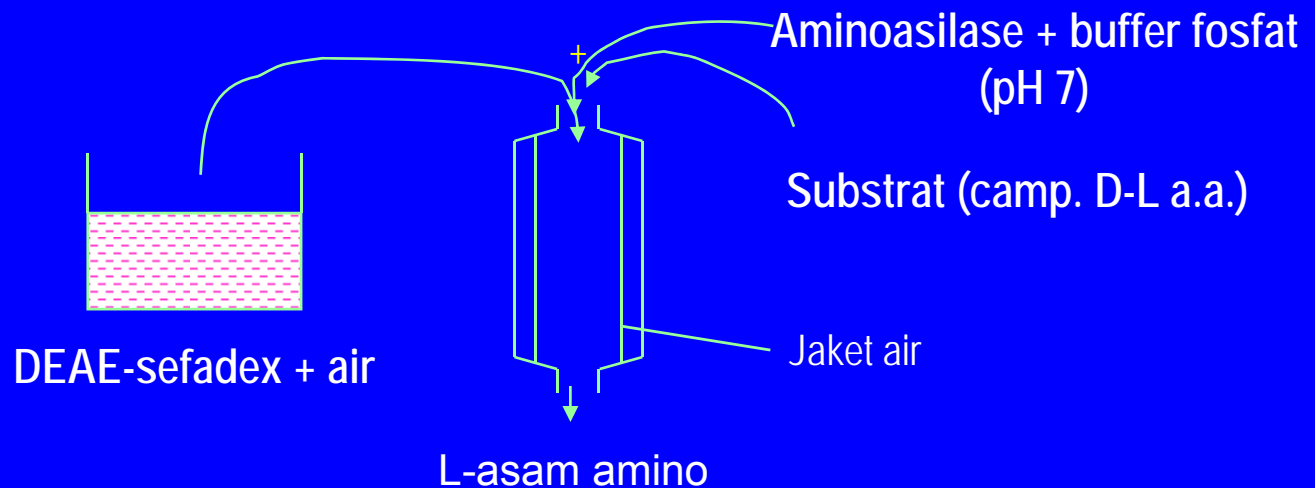
Type of carrier	Carrier	Enzyme used
Inorganic	Aluminium oxide	Glucoamylase
	Bentonite	Invertase
	Glass	Lipase
	Ca phosphate gel	Aspartase
Organic	Activated carbon	Glucose oxidase
		$\alpha$ -Amylase
		$\beta$ -Amylase
		Glucoamylase
	Starch	Invertase
		$\alpha$ -Amylase
Tannin aminoethyl cellulose	Glucose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

## b. Ikatan Ionik

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



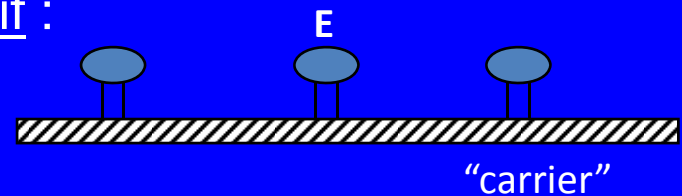
- Kelebihan dan kekurangan sama dengan cara adsorpsi
- Cara immobilisasi :



⇒ 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

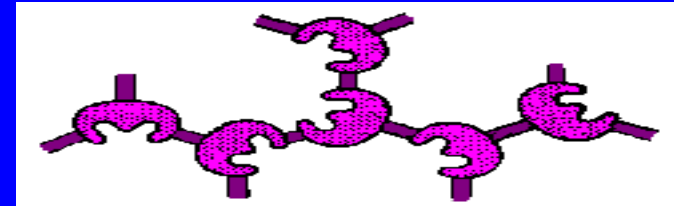
- Terbentuk ikatan kovalen antara enzim dengan “carrier” tidak larut dalam air  $\Rightarrow$  ikatan kuat & tdk bocor
- Gugus fungsional enzim yang berperan :
  - 1)  $\alpha$  atau  $\beta$ -amino
  - 2)  $\alpha$ ,  $\beta$ , atau  $\gamma$ -karboksil
  - 3) Sulfohidril
  - 4) Hidroksil
  - 5) Imidazol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



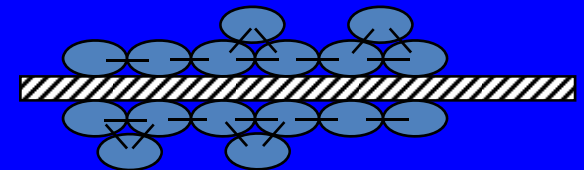


## 2. Cross Linking (Ikatan Silang)

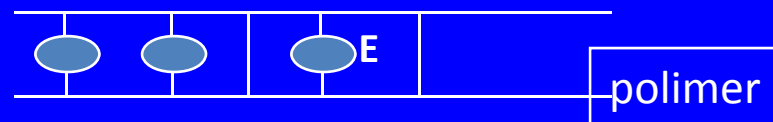
- Terjadi ikatan kimia, tetapi tidak digunakan *carrier* tidak larut air  
⇒ Pembentukan ikatan melintang inter molekuler antara molekul enzim dengan pereaksi bifungsional atau multifungsional.
- Perekasi :
  - ✓ glutaraldehid ⇒ paling banyak digunakan
  - ✓ diazobenzidine (atau turunannya)
  - ✓ Etil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



Untuk meningkatkan stabilitas ⇒ *cross linking* + adsorpsi

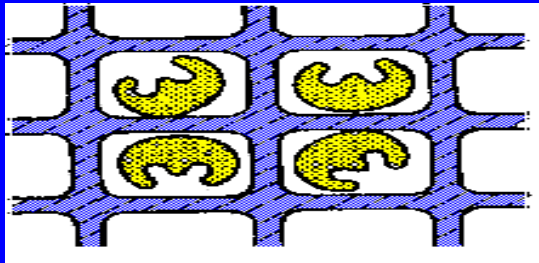


**Kopolimerisasi**

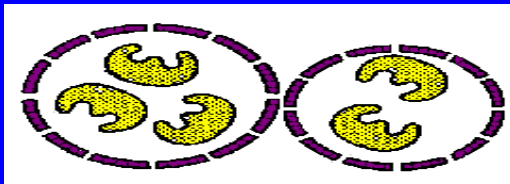


### 3. Entrapping (penjeratan)

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



⇒ tipe kisi



⇒ tipe mikrokapsul

1 – 300 mμ

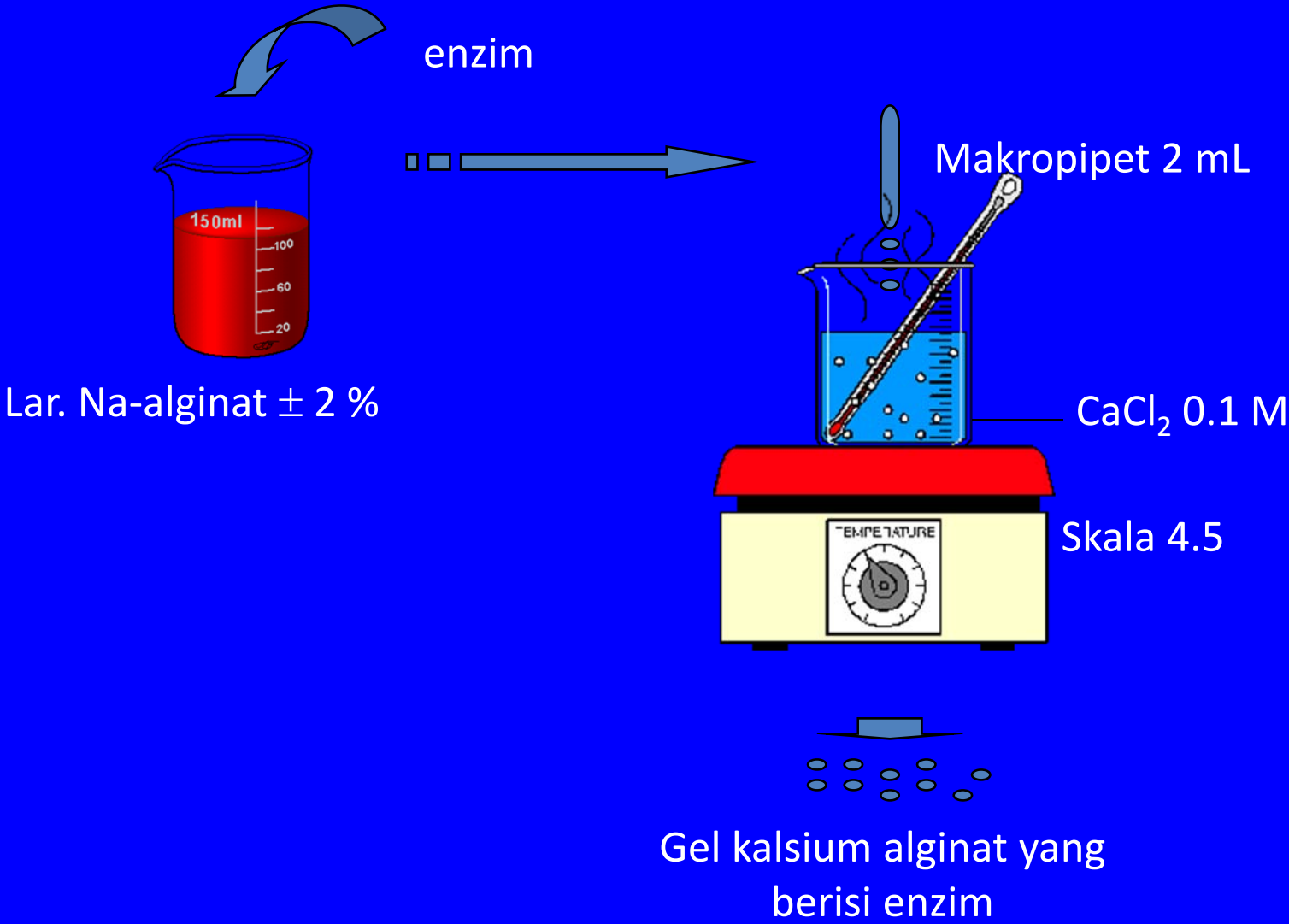
Membran polimer permanen

Mikrokapsul tidak permanen

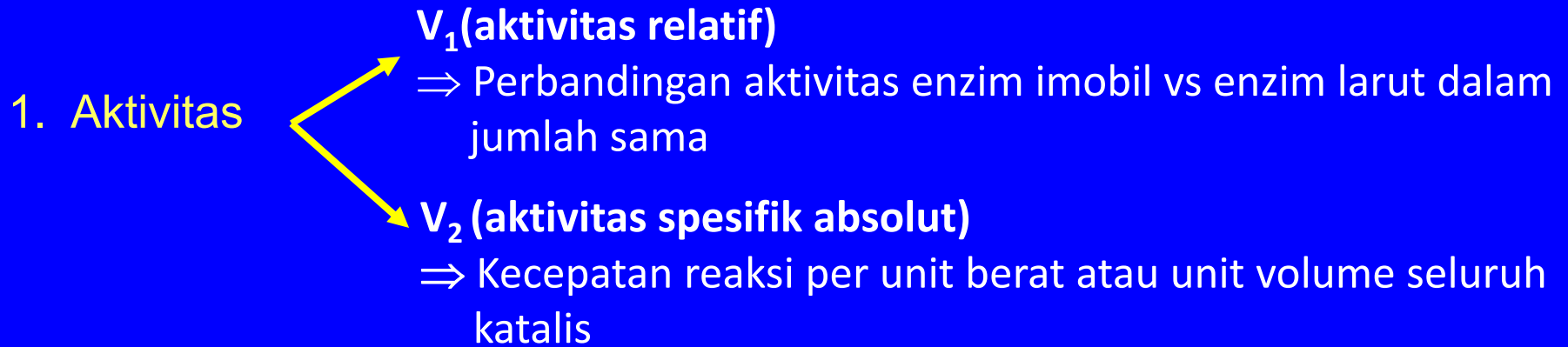
Bahan :

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

# Cara Penjeratan Tipe Kisi



# Perubahan Sifat Enzim Terimobilisasi



V<sub>1</sub> ⇒ tidak deaktivasi enzim akibat imobilisasi

V<sub>2</sub> ⇒ kemungkinan untuk mengimobilisasi enzim lebih banyak/sedikit per unit volume katalis

Penyebab penurunan aktivitas :

- Konfigurasi ⇒ menghalangi substrat
- Grup reaktif pada sisi aktif ikut terikat pada matriks
- Terbentuk konfigurasi tidak aktif
- Kondisi reaksi ⇒ 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

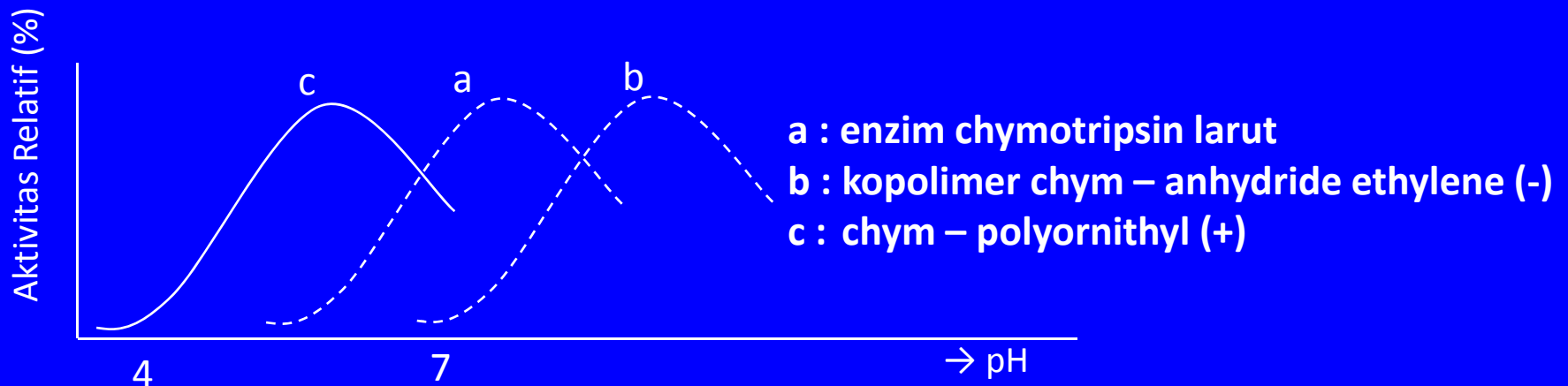
Asam galakturonat

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

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

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 :  $40 \times 591 = 23600$  U
  - Berat Penyangga : 11 gram  
↓  
Setelah mobilisasi  
→ Aktifitas enzim terimobilisasi : 381 U/g penyangga  
∴ Total aktifitas enzim yang teradsorbsi pada penyangga  
=  $11 \times 381$  U = 4191 U
- ∴ Persentase aktifitas enzim teradsorbsi =  $\frac{4191}{23600} \times 100\%$   
= 17,8 %

## Faktor Pemilihan Metode Imobilisasi

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

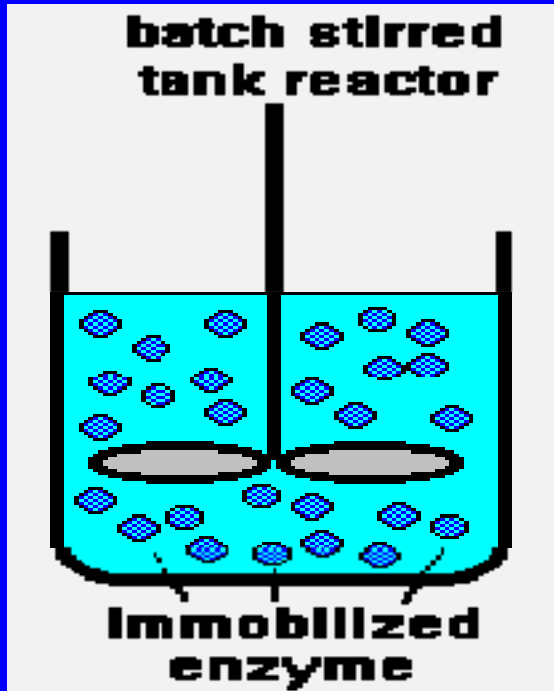
- ❑ Adsorpsi fisik dan ikatan ionik → stabilitas lebih rendah dgn adanya perubahan lingkungan
- ❑ Metode ikatan kovalen pada “carrier” organik sulit diregenerasi  
→ tdk sesuai untuk industri
- ❑ Metode ikatan kovalen & cross-linking → perubahan bentuk mol enzim dpt menyebabkan penurunan aktivitas enzim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



## Pertimbangan Penggunaan Enzim Imobil untuk Industri

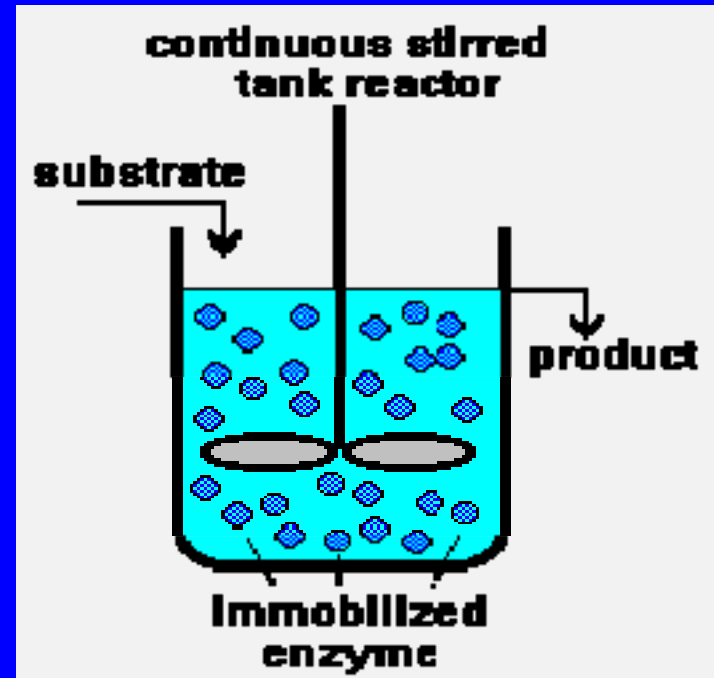
- ❖ Biaya pembuatan enzim imobil → “carrier” sering mahal & sulit diperoleh
- ❖ Aktivitas enzim imobil → penurunan aktivitas dpt menyebabkan konversi rendah
- ❖ Kestabilan enzim imobil → penting untuk menjaga keseragaman produk & tingkat konversi yang tinggi karena dapat menyebabkan rendemen rendah &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

# Bioreaktor Enzim Imobil



## Reaktor Batch :

- Sederhana
- Viskositas tinggi & aktivitas enzim rendah

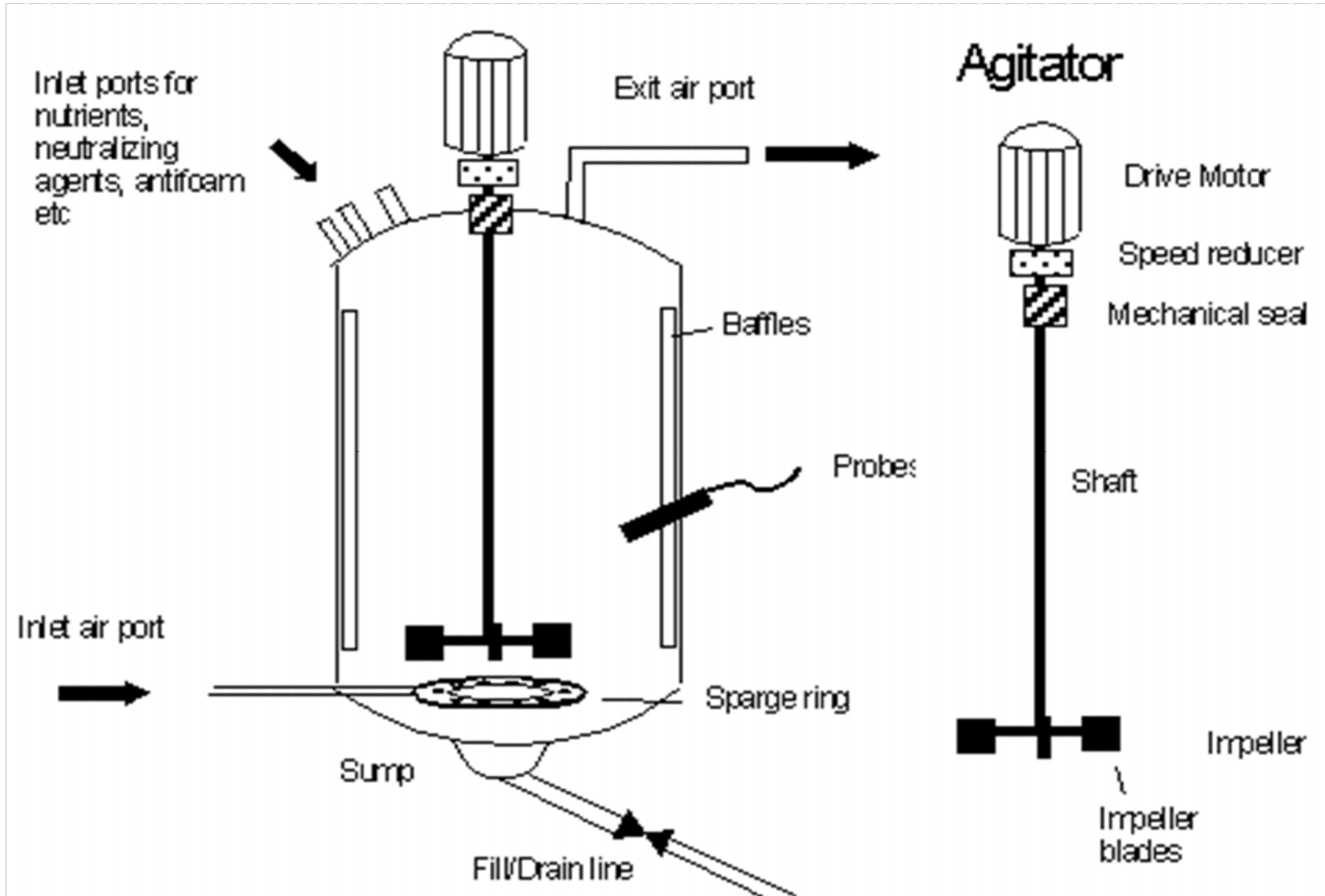


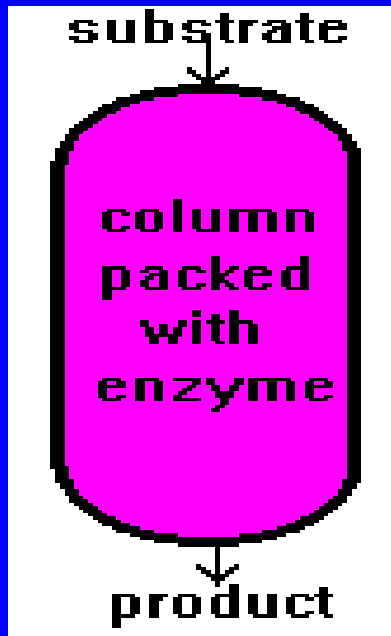
## CSTR :

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

# Bioreaktor Tangki Berpengaduk

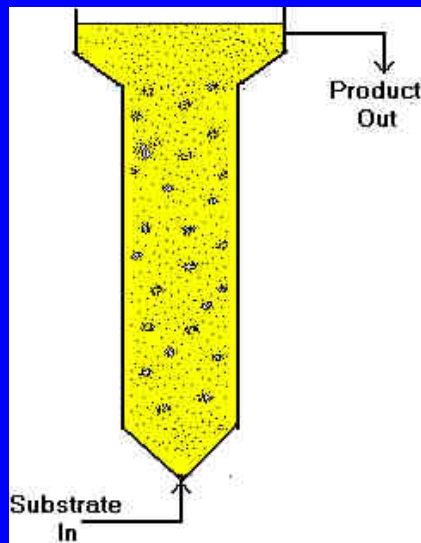
(stirred tank bioreactor = STR)





### Fixed-bed PFR (Unggun Diam/Terkemas) :

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

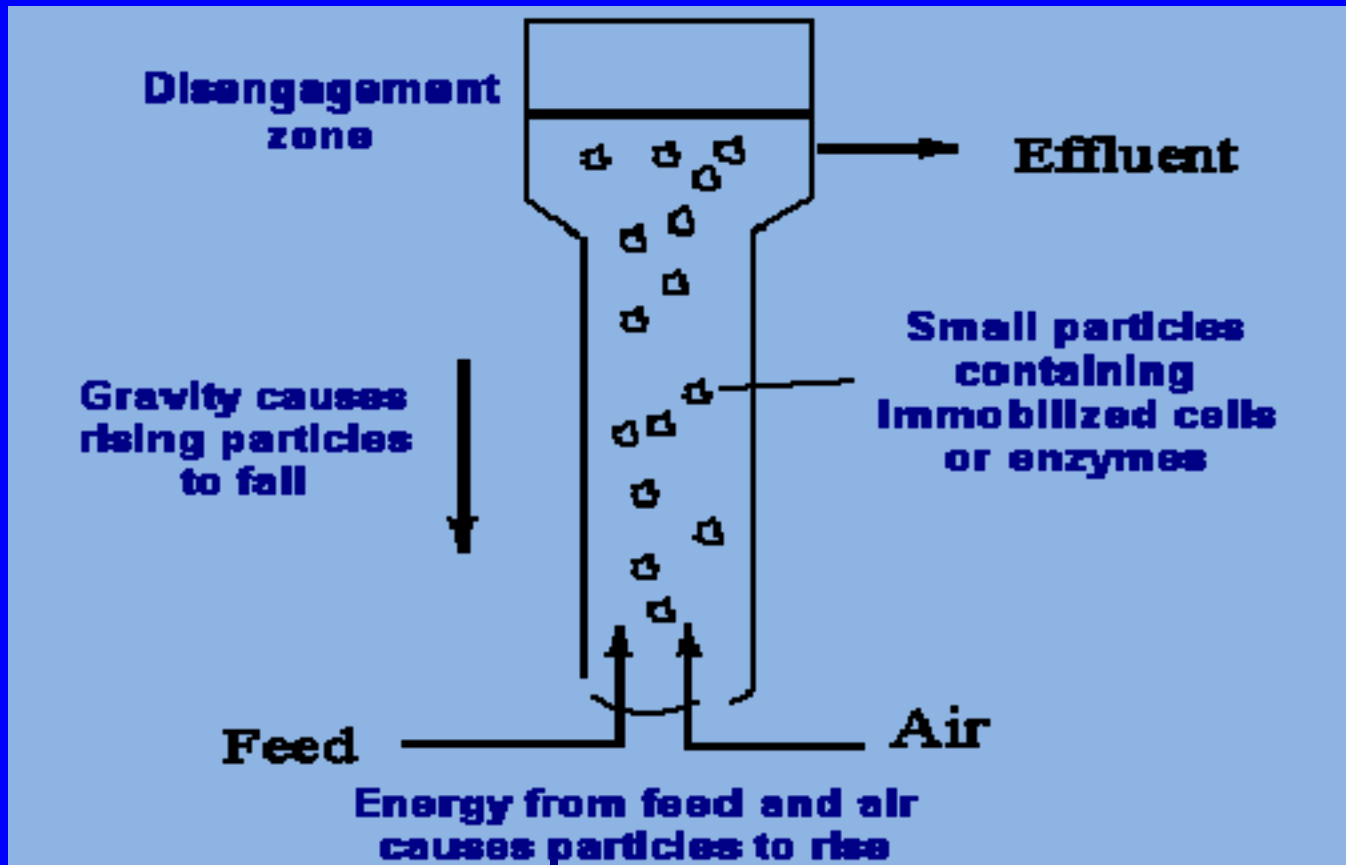


### Fluidized-bed (Unggun Terfluidisasi) :

- 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

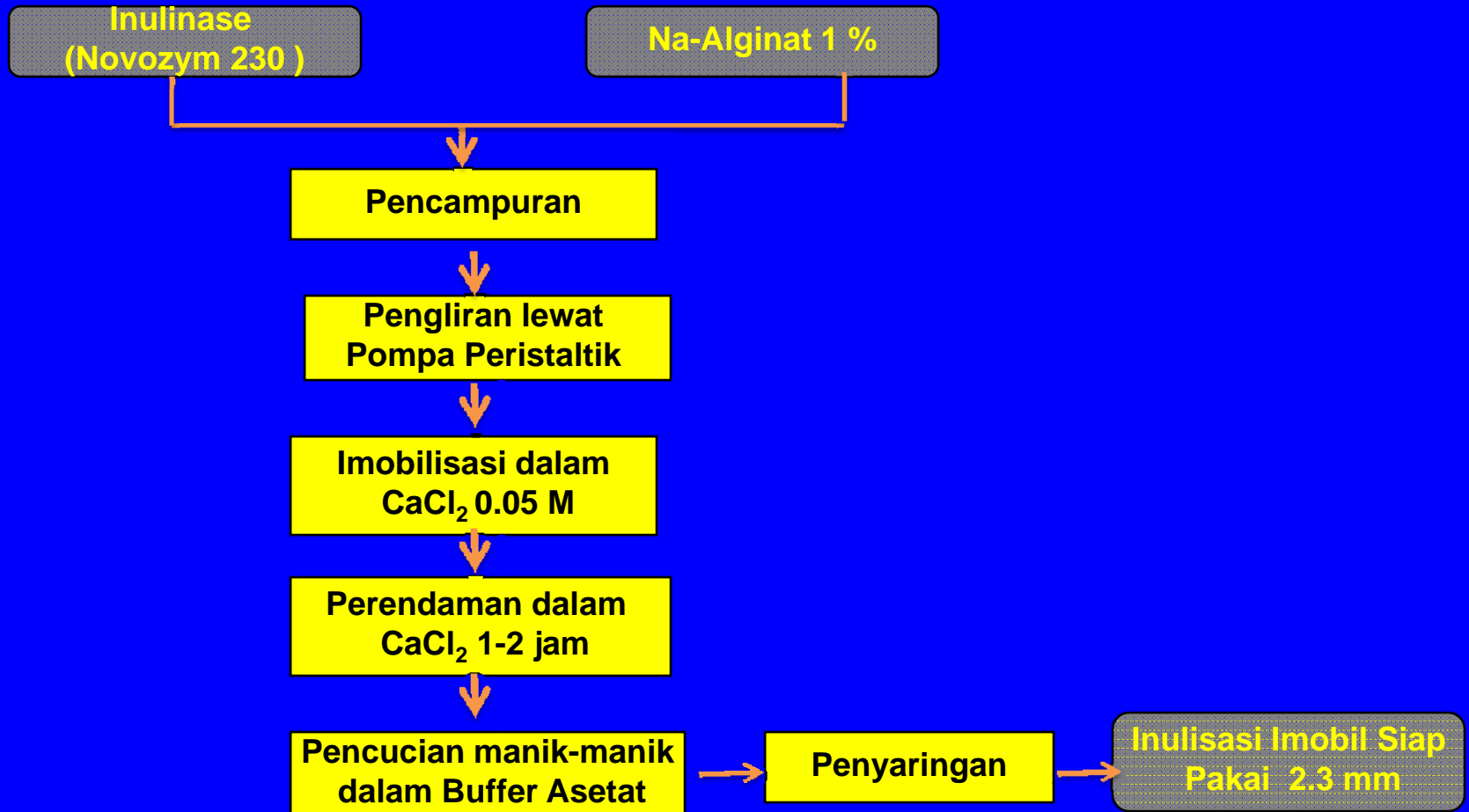
- Produksi sirup Fruktosa dari Inulin Umbi Dahlia Dalam Reaktor Sinambung Unggun Terkemas Menggunakan Enzim Inulinase Imobil

( Skripsi Sujatmono , T.S, 1992)

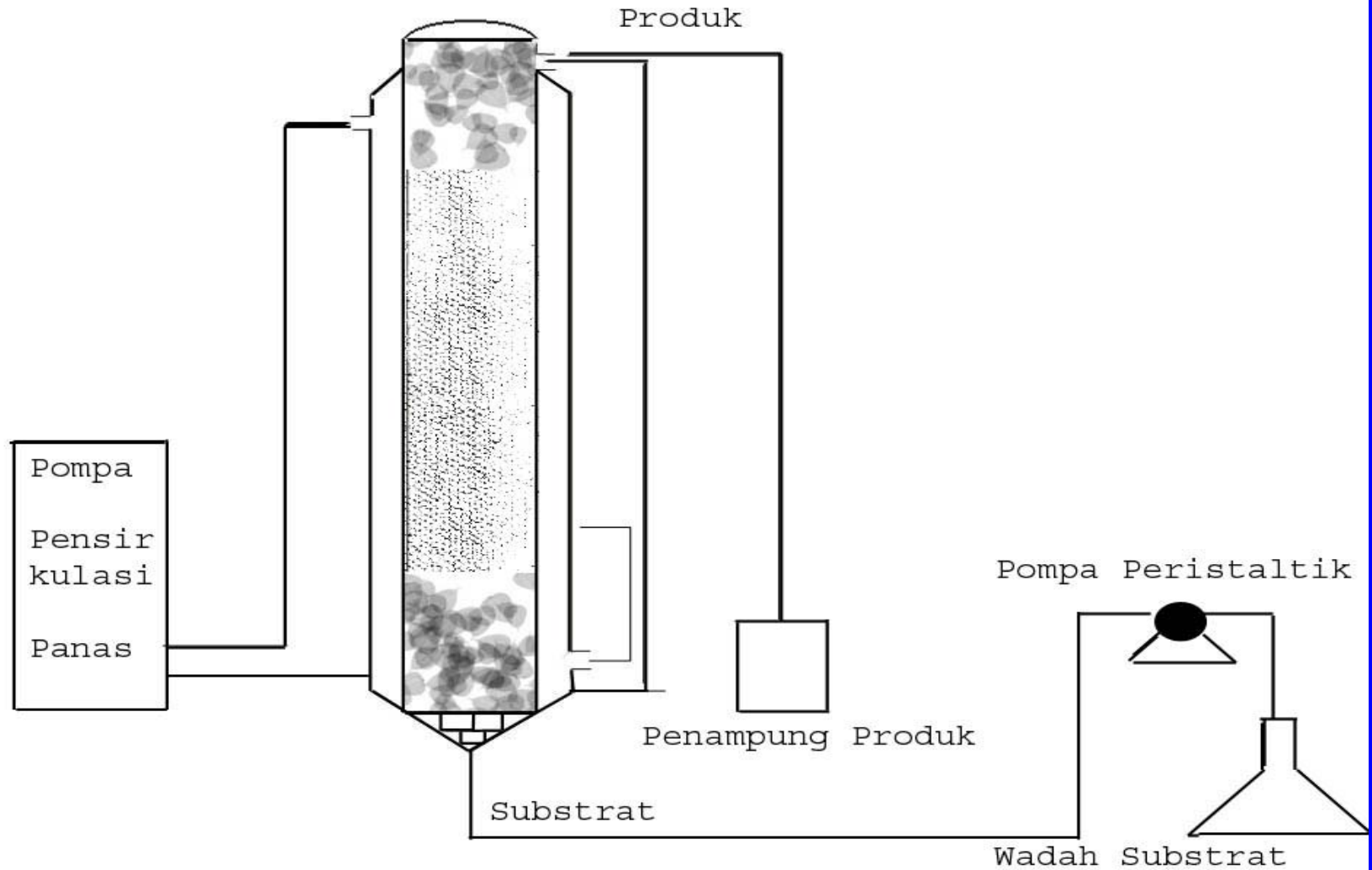
# Pembuatan Substrat Inulin



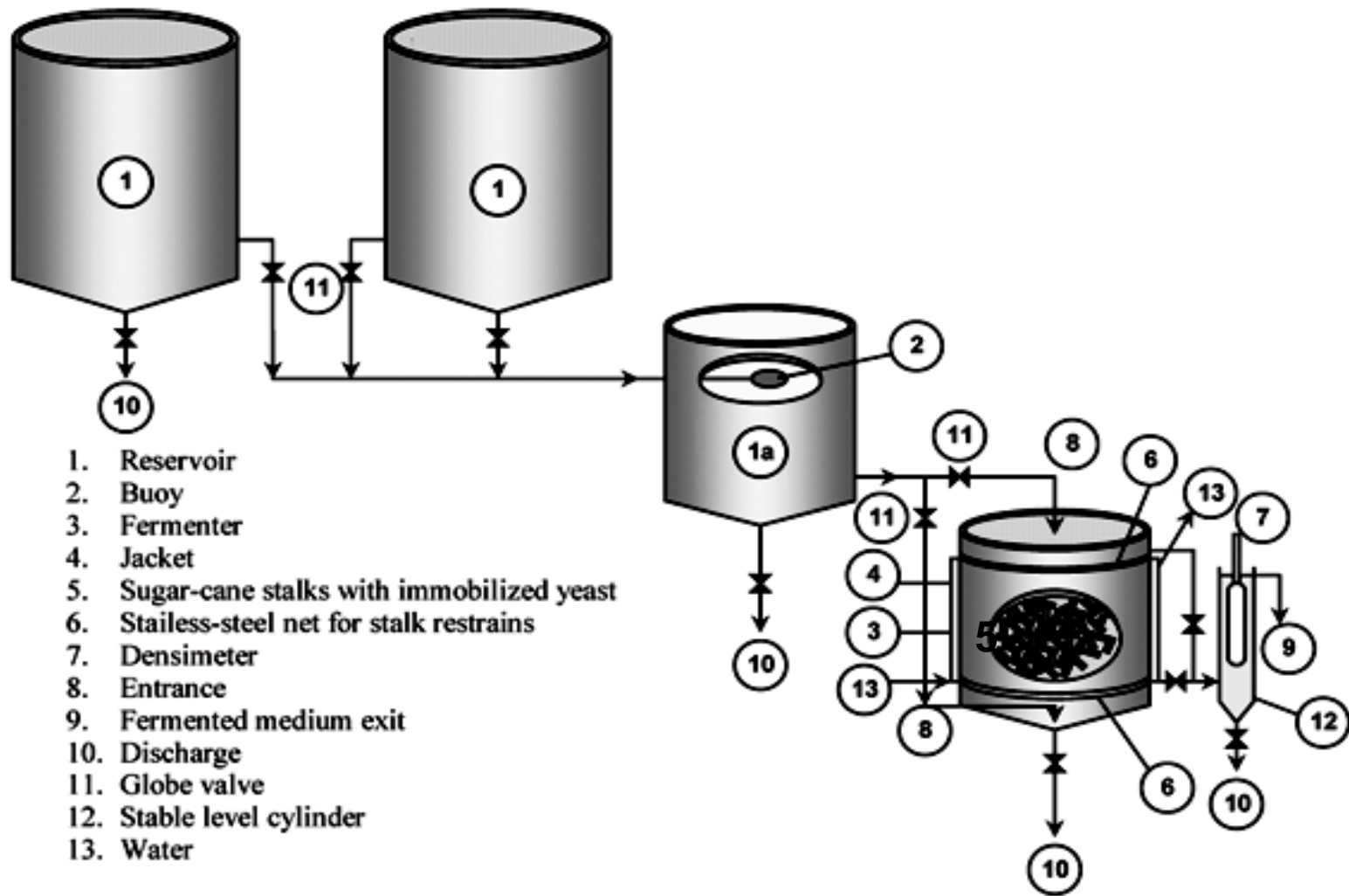
# Pembuatan Enzim Inulinase Imobil



# 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.