کاربرد فناوری اصلاح سطح پلاسما برای تثبیت آنزیم

ناهید سلطانی فیروز، رضا پناهی*، بابک مختارانی، فرشاد یزدانی
پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران
پیام نگار: Panahi@ccerci.ac.ir

چکیده:
فناوری پلاسما در کاربردهای متفاوتی نظیر بهبود سطح، پوشاندن سطح و استریل کردن سطح استفاده می‌شود. پلاسما نسبت به روشهای شیمیایی بسیار سبزتر و پایدارتر بوده و به همین دلیل بسیاری از فرایندهای یادشده با سرعت بالایی در حال صنعتی‌شدن هستند. با اعمال تیمار پلاسما، می‌توان گروه‌های عاملی جدیدی مانند NH_2، OH و COOH- بر روی سطوح بوجود آورد. در سال های اخیر استفاده از سطوح عامل‌دار شده با پلاسما، برای کاربردهای زیست فناوری نظیر تثبیت آنزیم‌ها گسترش یافته است. تثبیت آنزیم‌ها سبب افزایش طول عمر آنها می‌شود که در فرایندهای صنعتی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تاکنون چندین آنزیم و انواع دیگر پروتئین نظیر کلاژن، ژلاتین، آنتی بادی‌ها و هورمون‌ها با موفقیت بر روی سطوح مختلف با استفاده از تیمار پلاسما تثبیت شده‌اند. اگرچه استفاده از تیمار پلاسما برای تثبیت آنزیم‌ها در مقیاس صنعتی با چالش‌هایی همراه است، این فناوری به دلیل مزایای زیست محیطی می‌تواند نوید بخش یک راهکار سبز در مقایسه با روشهای سنتی باشد.

کلیدواژه‌ها: اصلاح سطح پلاسما، فعال‌سازی سطح، تثبیت آنزیم، گروه‌های عاملی

Application of plasma surface modification techniques for enzyme immobilization

Nahid Soltani-Firooz, Reza Panahi*, Babak Mokhtarani, Farsahd Yazdani

Chemistry & Chemical Engineering Research Center of Iran, Tehran, Iran

E-mail: Panahi@ccerci.ac.ir

Abstract:

Plasma technology is used in different applications such as surface improvement, surface coating and sterilization. Many of the related processes are rapidly being industrialized since plasma is known as a green technology. By applying plasma treatment, it is possible to create new functional groups for instance $-NH_2$, -OH, and -COOH on surfaces. In recent years, the use of plasma functionalized surfaces for biotechnology applications like enzyme immobilization has been expanded. Immobilization increases shelf life of enzymes, which has a particular importance in industrial processes. So far, several enzymes and the other types of proteins such as collagen, gelatin, antibodies and hormones have been successfully immobilized on various surfaces using plasma treatments. Although using plasma treatment for enzyme immobilization in industrial scales is challenging, it is a promising green alternative technology in comparison with conventional methods due to environmental benefits.

Keywords: Plasma surface modification, Surface activation, Enzyme immobilization, Functional groups

۱. مقدمه

پلاسما اغلب به حالت چهارم ماده اتلاق می‌شود. تقریبا ۹۹٪ از فضای قابل مشاهده جهان در حالت پلاسما است. پلاسما متشکل از ذرات باردار هستند به همین دلیل تحت تاثیر میدان الکتریکی یا مغناطیسی قرار می‌گیرند. وقتی انرژی زیادی به یک گاز وارد شود، ان گاز یونیزه می‌شود. در اثر برهم کنش ذرات گاز یونیزه شده تحت میدان الکترومغناطیسی، حالت پلاسما ایجاد می‌شود. به همین دلیل رفتار پلاسمایی تحت تاثیر برهم کنش مابین ذرات باردار آن است. پلاسما بدون شک یک محیط فعال از نظر شیمیایی است. اگر کاربرد پلاسما منجر به تولید دمای پایین شود به آن پلاسمای سرد اتلاق می‌شود، در مقابل چنانچه دمای بالایی ایجاد شود نوع پلاسما حرارتی خواهد بود. به دلیل این محدوده دمایی متغیر، پلاسما می‌تواند برای کاربردهای متفاوتی نظیر بهبود سطح، پوشاندن سطح، حذف ضایعات جامد، خالص سازی هوا، استریل کردن سطح و ... به کاربرده شود. بسیاری از این فرایندها با سرعت بالایی به سمت کاربردهای صنعتی در حال حرکت می‌باشند. زیرا پلاسما نسبت به روشهای شیمیایی بسیار سبزتر و پایدارتر است[۱]. گازهایی که به طور معمول برای ایجاد حالت پلاسمایی استفاده می‌شود شامل گازهای بی اثر (مانند هلیوم و آرگون)، گازهای فعال و غیرقابل بسپارش (به عنوان مثال آمونیاک، هوا، و نیتروژن) و گازهای فعال و قابل بسپارش (نظیر تترافلوئورواتیلن) است. گازها پس از رسیدن به حالت پلاسمایی مخلوطی از ذرات فعال نظیر یون‌ها، الکترون، نوترون، پروتون، فوتون، رادیکال‌های آزاد و گونه‌های برانگیخته هستند. به همین دلیل مواد در حالت پلاسما فعالیت بالایی دارند و می‌توانند برای فعال‌سازی سطوح، آماده سازی سطح، حکاکی و ... مورد استفاده قرار گیرند. در ادامه برخی کاربردهای فناوری پلاسما توضیح داده می‌شود [۲].

آماده سازی سطح

در بسیاری از فرایندهای صنعتی و علمی، سطوح مورد نیاز باید بی نهایت تمیز باشد. منظور از عبارت "تمیز" این است که مواد موجود در توده جسم با موادی که سطح آن را تشکیل می‌دهند، یکسان است و هیچگونه ماده خارجی ناشناخته یا آلودگی‌های ناپایدار مکانیکی وجود ندارد. برای سطوح فلزی، آماده‌سازی پلاسما می‌تواند سطوح را عاری از هرگونه چربی سطحی و آلودگی سازد و آن را در حد فلز اصلی "تمیز" کند. این پدیده به این دلیل امکان‌پذیر است که فلزات در برابر آسیب‌های مواد شیمیایی پلاسما کاملاً مقاوم هستند. در مورد پلیمرها، استفاده از عبارت تمیز کردن مفهوم کاملاً متفاوتی دارد، زیرا پلیمرها به راحتی مورد هجوم محیط‌های پلاسما قرار می‌گیرند. بنابراین سطوح پلیمری تنها ساییده نمی‌شوند بلکه در واقع از نظر شیمیایی و توپوگرافیکی تغییر می‌کنند. روش پلاسما به طور گسترده با ترکیبی از روش‌های کاتدپرانی با یون‌های پرانرژی و نورکافت فرابنفش پیوندهای کووالانسی، سطوح را از مواد نامطلوب پاک میکند. برای مثال، سطح پلی‌اتیلن معمولاً با چندپارهای اتیلن، تکپار پلی‌اتیلن، مواد با وزن مولکولی کم شبیه واکس آلوده میباشد. از آنجایی‌که آلودگی‌ها روی سطح هستند ، نسبت به ساختار اصلی بسیار راحت و سریع با تبدیل به ترکیبات فرار، تخریب میشوند. بنابراین ساختار بسپاری اصلی ضرورتاً دست نخورده و سالم و با حداقل حکاکی باقی میماند. در عملیات آماده‌سازی سطح معمولا از گازهای بی اثر مانند آرگون استفاده می‌شود، زیرا بدون اتصال به سطح آغاز به تخریب می‌نمایند. برای کاهش تغییرات نامطلوب ساختار شیمیایی زمان فرایندهای آماده‌سازی معمولاً کوتاه هستند. اگر عملیات آماده‌سازی بیش از حد مورد نیاز ادامه یابد، منجر به حمله به ساختار اصلی میشود که بستر پلیمری کاملاً تخریب شده و خاکستر میشود. زمانی‌که آلودگی‌ها از بین رفتند، یک سطح بسپاری پایدارتر در تماس با محیط پلاسما قرار میگیرد، بنابراین واکنش‌های بیشتر مانند حکاکی، اتصال یا اعمال مستقیم پوشش سطحی مطلوب، آسان‌تر میشود.

حکاکی

برای به دست آوردن پوشش‌های بسیار چسبنده روی سطوح پلیمری، معمولاً چیزی بیش از تمیزکردن سطح نیاز است. پلاسما می‌تواند توپوگرافی‌های سطحی "میکروزبر" ارائه دهد که با روش‌های سایشی فیزیکی قابل بدست آمدن نیست. یک عامل دخیل در بهبود چسبندگی ایجاد شده بعد از آماده‌سازی پلاسما، افزایش مساحت سطح پلیمر می‌باشد که سطح مشترک بیشتری

در تماس با پوشش ارائه می‌دهد. این افزایش سطح تماس می‌تواند با باز کردن میکروحفره‌ها توسط از بین بردن آلودگی‌هایی که روی سطح را پوشانده بودند و یا حفره‌ها را مسدود کرده بودند بدست بیاید. مواد گازی یونیده شده تنها عامل تعیین‌کننده پارامترهای حکاکی نیست بلکه ترکیب پلیمر و میکروساختار آن نیز نقش کلیدی ایفا می‌کنند. در عملیات حکاکی از گازهای فعال معمولی مانند O_2, CF_4, SF_6 و مخلوطی از آن‌ها با هم یا گازهای بی‌اثر استفاده می‌شود.

پلیمریزاسیون و رسوب‌دهی پوشش‌های سطحی

پلیمریزاسیون یا بسپارش، ایجاد مولکول‌های بسیار بزرگ با اتصال مولکول های بسیار کوچک و قابل اتصال به نام تکپار می‌باشد. تکپارهای کلاسیک که در بسپارش شیمیایی به کار می روند، ساختارهای فعالی مانند پیوند دوگانه دارند که به آنها اجازه می‌دهند در صورت وجود در شرایط مناسب تبدیل به یک پیوند شوند. نور فرابنفش، که همان رادیکال‌های آزاد یا یون‌های پرانرژی در پلاسما هستند، فرایند بسپارش را با اتصال مکرر شروع کرده و وزن مولکولی خود را تا چند برابر افزایش می‌دهد که این فرایند معمولا با آنالیز (FTIR/ATR) بررسی می‌شود. عملیات پلاسمای پلیمریزاسیون با استفاده از واکنشگرهای کمکی یا استفاده ازO_2 ، N_2، یا NH_3 در محفظه واکنش، هنگام بسپارش می‌تواند متفاوت باشد. ازآمونیاک یا آکریلونیتریل به عنوان واکنشگر کمکی و از پلاسمای متان جهت به کارگیری نیتروژن و ایجاد گروه آمین استفاده می‌شود.

فعال‌سازی سطح با ایجاد گروه‌های عاملی

استفاده از حالت پلاسمایی مواد برای تغییر ویژگی‌های سطوح با جایگزینی یا افزودن گروه‌های شیمیایی سطح، فعال‌سازی پلاسما نامیده می‌شود. به عبارت دیگر در اثر فعال‌سازی پلاسمایی گروه‌های جدید بر روی سطح ایجاد می‌شوند که طبیعتا باعث ایجاد خواص جدید در سطح می‌شوند. برای مثال، اضافه شدن گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل به سطح آب‌گریز پلی‌اتیلن سبب آب‌دوستی آن خواهد شد. در اثر اتصال گروه‌های آمید و آمین به سطوح، قابلیت رنگ پذیری افزایش می‌یابد. در فعال‌سازی پلاسمایی از گازهای مانند O_2، N_2، He، Ar، NH_3، N_2O، CO_2، CF_4 و هوا یا مخلوط آنها استفاده می‌شود. در این فرایند، در اثر برخورد ذرات فعال پلاسما به سطح، رادیکال‌های آزاد روی مولکول‌های سطحی مواد ایجاد می‌شوند که سبب فعال شدن سطح می‌گردند. بر اساس گاز عملیاتی مورد استفاده، امکان ایجاد گروه‌های شیمیایی مختلفی نظیر گروه‌های هیدروکسیل، کربونیل، کربوکسیل، آمین و یا پروکسیل روی سطح وجود دارد. ایجاد گروه‌های عاملی بر روی سطوح توسط تیمار پلاسمایی در صنعت نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در تیمار پلاسما، تغییرات شیمیایی و فیزیکی در لایه‌های سطحی ایجاد می‌شود. در این روش، به دلیل برخورد الکترون‌های ناشی از پلاسمایی نمودن گاز به سطح، چگالی بالایی از رادیکالهای آزاد روی سطح بوجود می‌آیند. این رادیکالهای ایجاد شده بر روی سطح، در پیوندهای شیمیایی سطح اختلال ایجاد می‌کنند و سبب تشکیل گونه‌های شیمیایی جدید می‌شوند. در این حالت شیمی سطح و توپوگرافی سطح تغییر نموده و سطح ویژه به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. با اعمال روش پلاسما، می‌توان گروه‌های عاملی جدیدی مانند $-NH_2$، -OH و -COOH بر روی سطح بوجود آورد [۲, ۳]. در سال های اخیر استفاده از پلاسمای سرد در فرایندهای عامل‌دارکردن سطوح، خصوصا برای کاربردهای زیست فناوری نظیر اتصال آنزیم‌ها به سطح به دلیل مزایای زیست محیطی افزایش یافته است. در ادامه در مورد اهمیت آنزیم‌ها و نحوه تثبیت انها با استفاده از فناوری پلاسما توضیح داده می‌شود.

آنزیم‌ها و تثبیت

پروتئین ها مواد آلی بزرگ و یکی از فراوان ترین انواع ملکول‌های زیستی هستند که از زیرواحدهایی به نام اسید آمینه ساخته شده‌اند. آنزیم‌ها از مهمترین دسته پروتئین ها هستند که به عنوان کاتالیزگر در فرایندهای شیمیایی و بیوشیمیایی حضور دارند. آنزیم‌ها به طور موثر و قابل توجهی در واکنش زیستی شرکت می‌کنند و همانند یک کاتالیزور معدنی، میزان انرژی فعال سازی برای شروع واکنش را پایین می‌آورند و در نتیجه بر سرعت واکنش می‌افزایند. آنزیم‌ها در شرایط معمولی محیط توانایی تسریع بسیاری از واکنش‌های شیمیایی را دارند. مزایای استفاده از آنزیم‌ها در مقایسه با کاتالیست های شیمیایی شامل انتخابگری بالا، خلوص بالای محصولات و عدم

تولید محصول جانبی، شرایط ملایم واکنش، و هزینه تولید پایین محصول است[۴]. استفاده از آنزیم‌ها در زمینه های مختلف نظیر صنایع شیمیایی، صنایع غذایی، صنایع دارویی و ... رایج است. به عنوان مثال شرکت نیتو کمیکال ایندااستری[1] از یک فرایند آنزیمی برای افزایش آب به آکریلونیتریل و تولید آکریلامید استفاده می‌نماید. مقایسه فرایندهای آنزیمی و شیمیایی برای تولید آکریلامید در جدول ۱ آورده شده است. مثال دیگر در این زمینه تولید صنعتی ۶-آمینوپنیسیلانیک اسید[2] از پنیسیلین جی توسط آنزیم پنیسیلین آسیلاز[3] است که به وفور در صنایع دارویی دیده می‌شود. از کاربردهای متداول فرایندهای آنزیمی در صنایع غذایی می‌توان به تولید فروکتوز از توسط آنزیم گلوکز ایزومراز اشاره نمود[۵ , ۶]. پایدار سازی آنزیم‌ها به منظور افزایش طول عمر آنها، در فرایندهای صنعتی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تثبیت[4] آنزیم، یکی از متداولترین روش ها برای پایدار کردن آنزیم‌ها است که از دیدگاه مهندسان شیمی نیز از اهمیت ویژه ای برخوردار است. عملیات تثبیت آنزیم‌ها به روش های مختلفی انجام می‌شود که رایج‌ترین آنها شامل جذب سطحی، اتصال عرضی و به دام انداختن[5] یا پوشینه دار کردن[6] است [۷].

در روش جذب سطحی، پروتئین و سطح جامد به صورت غیرکووالانسی و برگشت پذیر پیوند می‌دهند. این پیوندها شامل پیوندهای قوی یونی و هیدروژنی تا پیوندهای ضعیف واندروالسی و برهمکنش های آب‌گریز می‌باشند. در این روش می‌توان آنزیم غیرفعال روی بستر را با آنزیم فعال تعویض نمود که یک مزیت به شمار می‌آید[۸]. معایب روش جذب سطحی شامل ضعیف بودن اتصال بین آنزیم و سطح، و شسته شدن آنزیم از روی سطح با گذشت زمان، اشاره نمود[۹].

در روش جذب کوالانسی، آنزیم مورد نظر با سطح پیوند کوالانسی برقرار می‌کند که ممکن است سبب کاهش فعالیت آنزیم گردد، اما میزان پایداری آن را به میزان زیادی افزایش می‌دهد. پیوند کووالانسی بین گروه‌های فعال در زنجیره جانبی آنزیم (مانند آمین و کربوکسیل) و گروه های فعال سطح بستر انجام می‌شود و ماهیت این پیوند سبب پایداری آنزیم خواهد شد. روش دیگر تثبیت آنزیم به دام انداختن و یا به تله انداختن آن در یک شبکه[7] پلیمری می‌باشد. در این روش مونومرها[8] و یا پلیمرهایی با وزن مولکولی کم، در اطراف پروتئین قرار می‌گیرند و آن را روی یک سطح به صورت فیزیکی به دام می‌اندازند. در روش به دام انداختن پس از عملیات تثبیت، فعالیت آنزیم چندان کاهش نمی‌یابد. روش پوشینه‌دار سازی روشی مشابه با روش به دام انداختن است، با این تفاوت که در این روش، شبکه پلیمری دارای حفراتی برای تثبیت آنزیم است. ژل های آبدوست پلی آکریل آمید و پلی آکریلات در روش به دام اندازی آنزیم‌ها استفاده می‌شوند. در این روش اتصال متقاطع[9] بدون حضور پایه انجام می‌شود و معمولا یک جامد بی‌شکل با کارایی مکانیکی و فعالیت پایین از آنزیم تولید می‌گردد. به همین دلیل استفاده از این روش چندان متداول نیست[۹]. هرچند در طی سالهای اخیر روش های زیادی برای تثبیت آنزیم گزارش شده، اما دستیابی به روش های منطبق بر اصول زیست‌محیطی همچنان بعنوان یک چالش مطرح است. فناوری پلاسما به عنوان یک روش سبز می‌تواند در تثبیت آنزیم و سایر پروتئین‌ها به کار گرفته شود.

تثبیت پروتئین ها با روش پلاسما

تاکنون پروتئین‌های متعددی نظیر آنزیم‌ها، کلاژن، ژلاتین، آنتی بادی‌ها، هورمون‌ها و ... بر روی سطوح مختلف با روش پلاسما تثبیت شده‌اند. به این منظور، ابتدا سطح موردنظر در دستگاه پلاسما قرار داده می‌شود و با استفاده از شرایط عملیاتی و نوع گاز مورد استفاده، اصلاح سطح پلاسمایی صورت می‌پذیرد. در طی فرایند ذرات گاز یونیزه شده به سطح برخورد می‌نمایند و سبب ایجاد گروه‌های فعال رادیکالی روی سطح می‌گردند. بدین ترتیب سطح بستر به شکل کاملا فعال تبدیل می‌شود.

---

[1] Nitto Chemical Industries (Mitsubishi Rayon)
[2] 6-Aminopenicillanic acid
[3] Penicillin acylase
[4] Immobilization
[5] Entrapment
[6] Encapsulation
[7] Matrix
[8] Monomers
[9] Crosslinking

جدول ۱ - مقایسه فرآیندهای کاتالیستی و آنزیمی برای تبدیل اکریلونیتریل به آکریلامید [۵]

ویژگی	فرایند کاتالیستی	فرایند آنزیمی
دمای واکنش	۷۰ درجه سانتیگراد	۵-۰ درجه سانتیگراد
بازده واکنش یک طرفه	٪۷۰-۸۰	٪۹۹,۹۹
غلظت محصول	~ ٪ ۳۰	٪ ۴۸-۵۰
اکریلونیتریل باقیمانده	< ٪ ۳۰	مقدار ناچیز
محصول جانبی	متعدد	هیچ
مصرف انرژی بر حسب مگاژول بر کیلوگرم آکریلامید:		
بخار	۱,۶	۰,۳
توان الکتریکی	۰,۳	۰,۱

در ادامه با قرار دادن سطح در معرض مواد شیمیایی، گروه های عاملی جدید بر روی سطح ظاهر می‌گردد. سپس آنزیم از طریق جذب سطحی یا پیوند کووالانسی به گروه‌های عاملی متصل می‌شود[۱۰]. معمولا تغییراتی که روی سطح در تماس با پلاسما اتفاق می‌افتد تابع نوع گاز فرایند، زمان تماس با پلاسما، توان و انرژی پلاسما و گروه‌های اصلی روی سطح است[۲]. شناسایی کمی و کیفی گروه‌های شیمیایی می‌تواند با استفاده از روش طیف سنجی فوتوالکترون اشعه ایکس[۱۰] یا طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز[۱۱] انجام گردد.

گروه های عاملی برای تثبیت آنزیم

ایجاد گروه‌های آمین، کربوکسیل، هیدروکسیل و آلدهید بر روی سطوح به دلیل سازگاری و توانایی بالا برای پیوند با مولکول‌های زیستی مانند انواع پروتئین‌ها بویژه آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها بسیار مورد توجه است. در برخی موارد برای جلوگیری از تغییر ماهیت[۱۲] مولکول‌های زیست فعال، می‌توان از مولکول های فاصله‌انداز[۱۳] (مانند پلی اتیلن گلایکول[۱۴] و پلی آمین[۱۵]) مابین پروتئین و سطح استفاده کرد.

گروه آمین

سطوح حاوی گروه آمین عمدتا توسط پلاسمای آمونیاک و یا توسط پلاسمای پلیمریزاسیون مونومر آلکیل‌آمین[۱۶] تهیه می‌شوند. واکنش بین گروه‌های آمین روی سطح و گروه کربوکسیل در مولکول پروتئین، منجر به تشکیل پیوندی آمیدی و اتصال می‌شود. واکنش دیگری که در عملیات تثبیت می‌تواند رخ دهد واکنش بین گروه آمین روی سطح و گروه آلدهید در مولکول زیستی است. البته گروه آلدهید شاید به طور معمول در مولکول زیستی وجود نداشته باشد اما با اکسیداسیون می‌توان آنها را ایجاد کرد. تاکنون نمونه های متفاوتی از پروتئین ها برروی سطوح آمین دارشده با روش پلاسما تثبیت شده‌اند[۱۰-۱۹]. در ساختار پروتئین‌ها گروه‌های زیادی از کربوکسیل و آمین وجود دارند و این احتمال وجود دارد که گروه کربوکسیل موجود در ساختار پروتئین به جای پیوند با گروه آمین در سطح، با گروه آمین موجود در ساختار همان پروتئین و یا پروتئین دیگر واکنش دهد و پیوند برقرار کند. چنین توده‌ای حلالیت کمتری خواهد داشت و پس از تشکیل می‌تواند بر روی سطح جذب شود. در این صورت ممکن است عملکرد زیستی پروتئین مورد نظر تغییر کند. ساده‌ترین روش برای ایجاد گروه آمین بر روی بستر ایجاد شرایط پلاسمایی با استفاده از گازهای آمونیاک، ترکیب NH_3 با H_2 یا Ar، ترکیبی از N_2 با H_2 یا C_2H_4 و یا N_2 به تنهایی است. هر چه تراکم گروه های واکنش پذیر مانند آمین در سطح بیشتر باشد محتملا پروتئین بیشتری بر روی آن تثبیت خواهد شد.

[10] X-Ray photoelectron spectroscopy
[11] Fourier transform infrared spectroscopy
[12] Denature
[13] Spacer molecules
[14] Poly Ethylene Glycol
[15] Polyamine
[16] Alkyl amine

گروه کربوکسیل

سطوح شامل گروه کربوکسیل که با روش پلاسما ایجاد شده‌اند، می‌توانند برای تثبیت پروتئین استفاده شوند. فرایند هم‌بسپارش[17] دو مونومر از روش‌های مناسب برای تنظیم چگالی گروه کربوکسیل روی سطح است. تا کنون پروتئین های متعددی با موفقیت به گروه کربوکسیل روی سطوح متصل شده‌اند[۲۰-۲۷]. برخی از روشهای ایجاد گروه های کربوکسیل بر روی بسترهای در جدول ۲ نشان داده شده که ساده ترین آنها تیمار با پلاسمای CO_2 یا CO است. به طور کلی، تیمار با پلاسمای CO_2 نه تنها منجر به تولید گروه کربوکسیل می‌شود، بلکه سایر گروه های شامل C و O مانند آلدهید، کتون و استر را نیز ایجاد می‌کند.

گروه‌های هیدروکسیل و آلدهید

ایجاد گروه‌های هیدروکسیل و آلدهید بر روی سطوح در مقایسه با گروه‌های عاملی آمین و کربوکسیل با اقبال کمتری مواجه بوده است. برای تثبیت کووالانسی مولکولهای فعال زیستی، سطوح هیدروکسیل جذابیت کمتری نسبت به آمین و کربوکسیل دارند زیرا هسته دوستی[18] کمتری نسبت به دو گروه قبل دارند و در نتیجه فعالیت آنها کمتر است. اتصال گروه‌های هیدروکسیل معمولا از نوع جذب فیزیکی[19] هستند و منشا کوالانسی ندارند درنتیجه از پایداری مناسبی برخوردار نمی‌باشند. از گروه هیدروکسیل نیز برای تثبیت پروتئین ها استفاده شده است [۱۸, ۲۸]. دو راه اصلی برای تولید گروه هیدروکسیل بر روی بسترهای متفاوت انجام تیمار پلاسما و پلیمریزاسیون پلاسما می‌باشد. در روش اول شامل به کارگیری پلاسمای آرگون و اکسیژن است. در روش پلاسمای پلیمریزاسیون برای ایجاد گروه هیدروکسیل از مونومرهای مختلفی مانند متانول و متانول با هیدروژن، اتانول، ایزوپروپیل الکل و آلیل الکل استفاده می‌شود که متداول‌تر از روش قبل است. به هر حال روش تیمار پلاسما در ایجاد گروه‌های آلدهیدی بازده مناسبی ندارد، هرچند تاکنون پروتئین‌هایی نظیر کلاژن و آلبومین با موفقیت بر روی سطوح حاوی گروه آلدهید تثبیت شده اند[۲۰].

تثبیت آنزیم‌ها با روش پلاسما

آنزیم‌های متعددی بر روی سطوح اصلاح شده با روش پلاسما تثبیت شده اند (جدول ۳). آنزیم گلوکز اکسیداز از دسته اکسیدوردوکتازها می‌باشد که منجر به تسریع اکسیداسیون گلوکز می‌شود[۲۹]. در سال ۱۹۸۷، آنزیم گلوکزاکسیداز بر روی چند نمونه غشای پلیمری با استفاده از پلاسمای دمای پایین تثبیت شد. این فرایند بر روی پلی‌پروپیلن، پلی‌وینیلیدین‌فلوراید و پلی‌ترافلوئورواتیلن که توسط پلاسمای آمونیاک و نیتروژن فعال شده‌بودند، با به کارگیری گلوتارالدهید به عنوان اتصال دهنده، انجام شد[۳۰].

تریپسین[20] یکی از آنزیم‌های پرکاربرد است که به هضم پروتئینها کمک می‌کند[۳۱]. در سال ۲۰۱۱، با استفاده از پلاسمای آمونیاک سطح پلی‌اتیلن عامل دار شد و آنزیم تریپسین را بر روی ان تثبیت گردید. در این پژوهش، برای اتصال بهتر آنزیم، از اتصال‌دهنده عرضی گلوتارالدهید استفاده شد. آنزیم تثبیت شده پس از گذشت چندماه همچنان فعالیت بوده است[۳۲]. در سال ۲۰۱۵، ذرات نقره با استفاده از تیمار پلاسما روی فیلم پلیمری نشانده شدند. سپس، آنزیم تریپسین برروی بستر تیمارشده با ایجاد پیوند کووالانسی متصل شد. آزمایش ها نشان داد آنزیم تثبیت شده روی شبکه ظرفیت بالاتری نسبت به نمونه شاهد دارد[۳۳]. در سال ۲۰۱۵، نمونه‌ای از آنزیم استیل کولین استراز بر روی سطح نانوالیاف کیتوسان تثبیت شد. در این پژوهش از پلاسما در فشار اتمسفری به عنوان یک روش مقرون به صرفه و ایمن برای اصلاح سطح نانوالیاف استفاده شد. نتایج نشان داد سطح به خوبی آب‌دوست شده است[۳۴]. لاکاز و تایروزیناز از جمله آنزیم‌های مهم و پرکاربرد در زمینه‌های مختلف صنعتی می‌باشند. لاکاز یک آنزیم اکسید کننده حاوی مس می‌باشد از که در بسیاری از گیاهان، قارچ ها و میکروارگانیسم ها یافت می‌شود و در صنایع مختلفی مانند نساجی، رنگرزی، صنایع غذایی و. . . کاربرد دارد[۳۵].

---

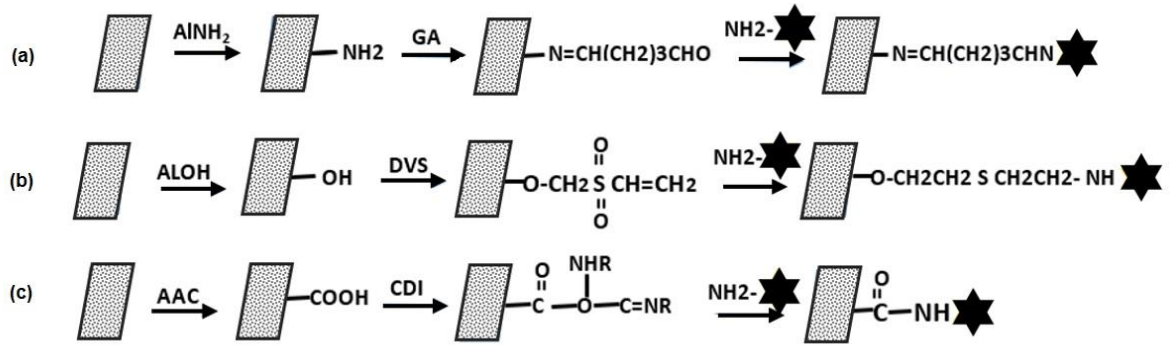
[17] Copolymerization
[18] Nucleophilic character
[19] Physisorption
[20] Trypsin

جدول ۲- روشهای مبتنی بر پلاسما برای تولید گروه کربوکسیل بر روی بسترهای مختلف[۲۰]

نوع اصلاح سطح پلاسمایی	توضیحات
پیوند پلاسما(تابش مستقیم)	اصلاح سطح به وسیله گاز آرگون بر روی سطوح تیمارشده با سدیم دودکانات
پیوند پلاسما(پس از تابش)	تیمار با اکریلیک اسید بعد از پلاسما پلیمرازسیون نرمال هپتیل آمین
	تیمار با سوسینیک انهیدرین بعد از تیمار پلاسمای آمونیاک
	تیمار با اکریلیک اسید بعد از تیمار پلاسمای اکسیژن/ آرگون/ کربن دی اکسید
	تیمار با اکریل امید بعد از پلاسمای آرگون
پلاسمای پلیمرازسیون	اکریلیک اسید، پروپانویک اسید و غیره
تیمار پلاسما	CO_2 و CO

پلی‌امیدی و یک غشای سلولزی صورت گرفت. هر یک از این سطوح با استفاده از پلاسمای آرگون و در حضور واکنشگرهای تایروزیناز، نیز از دسته آنزیم‌های اکسیداز است که در قارچ‌های خوراکی یافت می‌شود و فرایند تولید ساده‌ای دارد. کاربرد عمده این دو آنزیم، حذف فنل از پساب‌های صنعتی است[۳۶]. در سال ۲۰۱۲، عملیات تثبیت آنزیم‌های لاکاز و تایروزیناز بر روی غشای آلیل آمین، آلیل الکل و اکریلیک اسید عامل‌دار شدند. با استفاده از این واکنشگرها، گروه‌های آمین، کربوکسیل و هیدروکسیل روی سطوح ایجاد شد (شکل۱). سطوح عامل‌دار شده در تماس با محلول‌های آنزیمی قرار گرفتند. از اتصال دهنده گلوتارالدهید برای تسهیل تثبیت آنزیم‌ها روی سطح استفاده شد. آنالیز سطوح و بررسی ویژگی‌های آنزیم‌های تثبیت شده نشان داد که بستر پلیمری عملکرد بهتری ارائه می‌دهد[۲۸]. نمونه دیگری از تثبیت آنزیم لاکاز، در سال ۲۰۱۱ انجام شده است. در این تحقیق، لاکاز با دو روش متفاوت تثبیت گردید. در روش اول، مولکول‌های آنزیم درون ژلاتین محبوس شدند و در روش دوم با اتصال کوالانسی بر روی بستر پلیمری پلی‌تترافلوئورواتیلن تثبیت گردید. غشای پلیمری ابتدا در معرض پلاسمای آرگون قرار گرفت. سپس از واکنشگرهای پلی اکریل آمید و پلی آکریلیک اسید به منظور عامل‌دار کردن سطح استفاده شد[۳۷]. همچنین در سال ۲۰۱۳، از الکترود کربنی عامل دار به منظور تثبیت موثر لاکاز استفاده شد. سطح الکترود کربنی تحت شرایط پلاسمای قرار گرفت و با استفاده از آلیل‌آمین عامل آمین با چگالی بالایی رو سطح قرار گرفت. پس از فعال شدن سطح، با قرار گرفتن درون محلول آنزیم، عملیات تثبیت با راندمان بالایی انجام شد[۳۸]. آنزیم بتا -گالاکتوزیداز[۲۱] یک آنزیم هیدرولاز[۲۲] است که عملیات هیدرولیز بتا-گالاکتوزیدها به مونوساکاریدها را انجام می‌دهد. بتا –گالاکتوزیداز برای هیدرولیز لاکتوز در صنعت مواد غذایی و لبنی به دو صورت محلول و تثبیت شده استفاده می شود. آنزیم به شکل محلول فقط می تواند در یک فرایند غیر مداوم شرکت کند اما آنزیم های تثبیت شده را می توان در فرایند های مداوم و غیر مداوم استفاده نمود [۳۸, ۳۹]. در سال ۲۰۱۲، پژوهشی در زمینه تثبیت این آنزیم انجام شد. در این مطالعه، سطح سلولز استات[۲۳]، با استفاده از پلاسمای اکسیژن آماده‌سازی شد. سپس، از پلاسمای پلیمرازسیون اتیلن دی‌امین برای بهبود سطح غشا استفاده شد. در مرحله بعد، آنزیم با استفاده از دو روش جذب سطحی و پیوند کوالانسی به سطح از پیش آماده شده متصل گشت. نتایج نشان داد میزان آب‌دوستی تا میزان ۴۲ درصد افزایش یافته است. آنزیم متصل شده با روش اتصال کوالانسی پایداری بیشتری نشان داد، بطوریکه در ۵ تا ۸ چرخه‌ی فرایندی قابل استفاده بود[۴۰]. در سال ۲۰۱۴، آنزیم بتا–گالاکتوزیداز را بر روی بستر از پیش فعال شده‌ی سیلیکونی و پلیمری با استفاده از پلاسما تثبیت نمودند[۴۱]. لیپاز، آنزیمی است که توانایی هیدرولیز استرها را دارد و نقش اختصاصی تبدیل تری‌گلیسرید به گلیسرول و اسیدچرب را ایفا می‌کند[۴۲]. از نمونه های تثبیت آنزیم لیپاز با روش پلاسما، می‌توان به پژوهش انجام‌شده در سال ۲۰۱۴ اشاره کرد. در این مطالعه، گروه‌های عاملی آمین و کربوکسیل بر روی نانو لوله‌های کربنی ایجاد شدند.

[21] β-Galactosidase
[22] Hydrolase enzyme
[23] Cellulose acetate



شکل ۱ -ایجاد گروه‌های عاملی (a) آمین، (b) هیدروکسیل و (c) کربوکسیل به منظور تثبیت آنزیم. $AlNH_2$: آلیل آمین، ALOH: آلیل الکل، AAC: اکریلیک اسید، GA: گلوتارالدهید، DVS: دی وینیل سولفون، CDI:کربودیامید [۲۸]

تثبیت موفقیت‌آمیز آنزیم روی سطح، با استفاده از آنالیزهای TEM، AFM, XPS وFTIR تایید شد. همچنین امکان استفاده مجدد لیپاز تثبیت شده اثبات شد[۴۳]. نمونه دیگری از تثبیت آنزیم لیپاز در سال ۲۰۱۱ برروی سطح متخلخل کربنی با بهره‌گیری از پلاسمای اکسیژن انجام شد[۴۴]. همچنین در سال ۲۰۰۴، پس از بهبود سطح غشای میکروفیلتراسیون پلی‌پروپیلن، آنزیم لیپاز با روش جذب سطحی تثبیت شد. نتایج نشان داد میزان فعالیت آنزیم و پایداری حرارتی آن افزایش پیدا کرده است[۴۵]. از نمونه‌های دیگر تثبیت آنزیم لیپاز روی سطح غشای پلی پروپلین میتوان به تحقیقات انجام شده در سال ۲۰۰۵ اشاره نمود. در این پژوهش نیز غشاء میکروفیلتراسیون از جنس الیاف پلی پروپیلن توخالی[۲۴] با بهبود خواص آب‌دوستی و زیست سازگاری توسط پلاسما پلیمریزاسیون آماده شد و از آن برای تثبیت لیپاز استفاده شد. نتایج نشان داد که پس از به کارگیری لیپاز تثبیت شده در ۱۰ چرخه فرایندی، آنزیم حدود ۸۲٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کند[۴۶]. درسال ۲۰۰۶ نیز تثبیت لیپاز بر روی غشای پلی‌پروپیلن، گزارش شده است. در این مطالعه به منظور آماده‌سازی سطح برای تثبیت آنزیم، از پلیمریزاسیون گلایسیدل‌متاکریلات[۲۵] استفاده شد. نمونه تیمارشده زبری سطح و آب‌دوستی بالاتری نسبت به غشای اولیه نشان داد. لیپاز تثبیت شده پس از ده چرخه استفاده همچنان فعالیت داشت و ۶۸٪ فعالیت باقی مانده پس از ۱۲ هفته از ذخیره سازی نشان داد[۴۷]. در سال ۲۰۰۶، برای نخستین بار تثبیت آنزیم هورس‌ردیش پراکسیداز[۲۶] با روش پلاسما انجام شد. در این مطالعه غشای آب‌گریز میکروفیلتراسیون پلی‌پروپیلن به عنوان بستر برای عملیات تثبیت آنزیم با روش جذب سطحی استفاده شد. نتایج نشان داد که اصلاح سطح پایداری آنزیم را افزایش می‌دهد[۴۸]. سوپراکسید دیسموتازها[۲۷] آنزیم‌هایی هستند که وظیفه تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-) را به سایر مولکول‌های معمولی اکسیژن‌دار مانند O_2 و هیدروژن‌پراکسید بر عهده‌دارند[۴۹]. کاتالاز آنزیمی است که هیدروژن پراکسید را به اکسیژن و آب تجزیه می‌کند[۵۰]. در سال ۲۰۱۵، دو آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز بر روی سطح غشای پلی سولفون بهبود یافته برای بهبود سازگاری غشای همودیالیز پلی‌سولفونی با خون تثبیت شدند. عملیات تثبیت، به دو صورت یونی و کووالانسی بر روی غشای پلی‌اتیلن‌ایمین[۲۸] فعال‌شده با پلاسما انجام شد. غشای حاوی آنزیم قادر به کاهش سطح گونه های اکسیژن فعال در خون بود و ویژگی های مناسبی برای استفاده در فرایند همودیالیز داشت[۵۱]. گلیکوزید هیدرولازها[۲۹] پیوندهای گلیکوزیدی را در کربوهیدراتها هیدرولیز می‌کنند[۵۲].

[24] Polypropylene hollow fiber microfiltration membranes
[25] Glycidyl methacrylate (GMA)
[26] Horseradish peroxidase
[27] Superoxide dismutase
[28] Polyethyleneimine
[29] Glycoside hydrolase

در سال ۲۰۰۰، آنزیم گلایکوآمیلاز[30] بر روی سطح غشای سرامیکی بهبودیافته با پلاسما آرگون تثبیت شد. در این مطالعه، گروه آمینوپروپیل به عنوان یک گروه عاملی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان گروه آمین ایجاد شده با شرایط اصلاح سطح پلاسما مانند زمان و تعداد دفعات اصلاح سطح مرتبط است. اتصال آنزیم به سطح از طریق جذب سطحی‌شده فعالیت بیشتری نسبت به اتصال کووالانسی نشان داد[۵۳]. در سال ۲۰۰۹، آنزیم کموتریپسین[31] را برروی بستر سلولزی تثبیت شد. در این مطالعه، ابتدا سطح نمونه‌های بستر سلولزی در معرض پلاسمای اکسیژن و آرگون (به طور جداگانه) قرار گرفت. در مرحله دوم با استفاده از ترکیبات هیدرازین، اتیلن‌دی‌آمین و پروپیلن‌دی‌آمین گروه‌های عاملی روی سطح ایجاد شدند و در مرحله‌ی بعد با استفاده از اتصال دهنده‌های اگزالیل‌کلراید و گلوتارالدهید آنزیم مورد نظر روی سطح تثبیت شد. نتایج نشان داد متغییرهای زمان، توان دستگاه و دبی گاز در فرایند مهم هستند[۱۰].

تثبیت سایر پروتئین ها

کلاژن فراوانترین پروتئین بدن محسوب می‌گردد و از ٪۲۵ تا ٪۳۵ از پروتئین کل بدن را شامل می‌شود[۵۴]. در سال ۱۹۹۳، برای تثبیت کلاژن، ابتدا سطح با استفاده از پلاسمای اکسیژن فعال شد. سپس گروه‌های پلی‌متیل متاکریلات[32] و متعاقبا آکریلیک‌اسید به عنوان عامل کربوکسیل بر روی سطح ایجاد شد. در ادامه کلاژن، و همچنین ژلاتین و آلبومین روی سطح تثبیت شدند[۵۵]. در سال ۲۰۰۶، تثبیت کلاژن با استفاده از پلاسمای اکسیژن برروی پلی اورتان[33] نیز انجام شده است. محاسبه زاویه تماس با سطح نشان داد که تثبیت کلاژن، میزان آب‌دوستی و ترشوندگی سطح را افزایش می‌دهد. تغییرات ایجاد شده روی سطح سبب سازگاری پلی اورتان برای کاربردهای پزشکی می‌گردد[۵۶]. تثبیت ژلاتین بر روی سایر سطوح با بکارگیری انواع مختلف پلاسما نیزانجام شده است [۵۷-۵۹].

ترومبومودولین[34] یکی از پروتئین‌های مهم در بدن انسان است که مانع از انعقاد خون می‌شود. در سال ۱۹۹۷ از پلاسمای دی اکسیدکربن برای تثبیت ترومبومودولین بر روی پلی‌تترافلوئورواتیلن استفاده شد. پس از فرایند پلاسما، اکریلیک‌اسید بر روی سطحی فعال نشانده شد و به این ترتیب سطح پلیمر فعال شد[۶۰]. در هنگام ساخت تراشه‌های پروتئینی، بی‌حرکتی پروتئین در سطح شیشه ای ضروری است. به همین دلیل در سال ۲۰۰۳، ایجاد گروه آمین روی تیغه شیشه‌ای آغشته به پلی‌اتیلن‌دی‌امین با روش پلاسما انجام شد. سپس ایمونوگلوبولین به خوبی و با راندمان بالایی بر روی سطح آماده شده با پلاسما تثبیت شد[۶۱]. در سال ۲۰۱۴، با استفاده از تکنیک پلاسمای نیتروژن، سطح آب گریز پلی‌ونیلدن‌فلورید فعال شد و عملیات تثبیت ایمونوگلوبین جی روی آن انجام شد. پس از تثبیت، آنتی بادی کارایی بالاتری نسبت به روش های رایج نشان داد[۶۲]. تثبیت فاکتور رشد فیبروبلاست[35] بر روی بستر پلیمری پلی لاکتیدکوگلایکولید با استفاده از پلاسمای دی اکسیدکربن نیز انجام شده است. پلاسمای دی اکسیدکربن گروه کربوکسیلیک اسید روی سطح ایجاد می‌نماید[۶۳]. تثبیت انواع آنتی بادی و پروتیین ها با استفاده از پلاسمای اکسیژن[۶۴– ۶۷]. پلاسمای آمونیاک[۶۸] پلاسمای آرگون [۶۹] نیز گزارش شده است.

۲. نتیجه گیری

فناوری پلاسما به عنوان روشی سبز در صنایع مختلف مورد استفاده است. یکی از مهمترین کاربردهای پلاسما عامل دار کردن سطوح است که از آن می‌توان برای تثبیت آنزیم‌ها استفاده نمود. تثبیت آنزیم‌ها در صنایع شیمیایی، غذایی و داوریی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با استفاده از اصلاح سطح پلاسما می‌توان آنزیم‌ها را بر روی سطوح از جنس های مختلف تثبیت نمود. بدین منظور گروههای عاملی مناسبی بر روی سطح ایجاد کرد. ایجاد انواع گروهها در سطح با استفاده از گازهای مختلف و به کارگیری مواد شیمیایی خاص امکانپذیر است. تاکنون گروه‌های آمین و کربوکسیل بیشتر برای تثبیت آنزیم‌ها استفاده شده اند.

---

[30] Glucoamylase
[31] α-Chymotrypsin
[32] Polymethyl methacrylate
[33] Polyurethane
[34] Thrombomodulin
[35] Fibroblast growth factor

جدول ۳- مطالعات انجام شده در زمینه تثبیت پروتئین ها با استفاده از فناوری پلاسما

ردیف	نمونه تثبیت شده	بستر	شماره مرجع
۱	گلوکزاکسیداز	پلی‌پروپیلن، پلی‌وینیلدن‌فلوراید و پلی‌تترافلوئورواتیلن	۳۰
۲	کلاژن	پلی‌متیل متاکریلات	۵۵
۳	ترومبومودولین	پلی‌تترافلوئورواتیلن	۶۰
۴	آنتی‌بادی	فیلم سیلیکون دی اکسید	۷۳
۵	گلایکوآمیلاز	غشای سرامیکی	۵۳
۶	ایمونوگلوبین‌جی	تیغه شیشه‌ای پوشیده شده با پلی‌اتیلن‌دی‌امین	۶۱
۷	لیپاز	غشای میکروفیلتراسیون پلی‌پروپیلن	۴۵
۸	لیپاز	غشاء میکروفیلتراسیون الیاف پلی پروپیلن توخالی	۴۶
۹	کلاژن	پلی اورئتان	۵۶
۱۰	هورس ردیش پراکسیداز	غشای آب‌گریز میکروفیلتراسیون پلی‌پروپیلن	۴۸
۱۱	لیپاز	غشای پلی‌پروپیلن	۴۷
۱۲	فاکتور رشد فیبروبلاست	پلی لاکتیدگلایکولید	۶۳
۱۳	کمو تریپسین	بستر سلولزی	۱۰
۱۴	ژلاتین	نانوالیاف الکتروریسی شده‌ی پلی‌لاکتیک اسید	۷۲
۱۵	تریپسین	پلی‌اتیلن	۳۲
۱۶	لاکاز	پلی‌تترافلوئورواتیلن	۳۷
۱۷	لیپاز	سطح مزوحفره کربن	۴۴
۱۸	آنتی‌بادی	پلی‌متیل‌متاکریلات	۶۶
۱۹	آنتی‌بادی	بستر شامل هافنیم‌اکسید	۶۸
۲۰	پروتئین استرپتاودین	پلی‌استایرن	۶۴
۲۱	پروتئین استرپتاودین	پلی‌متیل‌متاکریلات	۶۵
۲۲	لاکاز و تایروزیناز	غشای پلی‌امیدی و یک غشای سلولزی	۲۸
۲۳	بتا –گالاکتوزیداز	سلولز استات	۴۰
۲۴	کلاژن	پلی اتیلن ترفتالات	۵۶
۲۵	پروتئین اِی	سیلیکون متخلخل	۷۰
۲۶	لاکاز	الکترود کربنی عامل دار	۷۰
۲۷	ژلاتین	پلی لاکتید گلایکولید	۵۸
۲۸	سرم بوین‌آلبومین	سطح آب گریز و متخلخل پلی‌وینیلدن‌فلوراید	۶۹
۲۹	بتا –گالاکتوزیداز	بستر از پیش فعال شده‌ی سیلیکونی و پلیمری	۴۱
۳۰	ایمونوگلوبولین	سطح آب گریز پلی‌ونیلدن‌فلورید	۶۲
۳۱	لیپاز	سطح چند جداره کربن نانو لوله	۴۴
۳۲	کلاژن	پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان	۵۹
۳۳	آنتی‌بادی	پلی متیل متاکریلات-متاکریلیک اسید	۷۱
۳۴	پروتئین واکنشی	فیلم پاریلن	۱۵
۳۵	تریپسین	فیلم پلیمرایز شده ی آنیلین	۳۳
۳۶	استیل کولین استراز	نانوالیاف کیتوسان	۳۴
۳۷	سوپراکسید دیسموتازها- کاتالاز	غشای پلی سولفون	۵۱
۳۸	بتا –گالاکتوزیداز	غشای پلی اتیلن ترفتالات	۷۴
۳۹	آنتی‌بادی	بستر کاغذی	۷۵
۴۰	آنتی‌بادی	پلی‌متیل‌متاکریلات	۷۶
۴۱	لیپوپروتئین	ورقه فولادی ضدزنگ	۷۷

به نظر می‌رسد مهمترین چالش‌ها در زمینه بکارگیری فناوری پلاسما برای تثبیت آنزیم‌های صنعتی در مقایسه با روشهای سنتی، شامل هزینه بالاتر و عدم سهولت فرایند، و در دسترس نبودن راکتورهای مناسب باشد. استفاده از این فناوری برای تثبیت آنزیم می‌تواند به عنوان یک راهکار برای حل مشکلات زیست محیطی روش های سنتی مطرح باشد.

۳. منابع

[1] Wolf R. A., "Atmospheric pressure plasma for surface modification". John Wiley & Sons, (2012).

[2] Shishoo R.,"Plasma technologies for textiles". Elsevier, (2007).

[3] Dohyun Kim A. E. H., "Protein immobilization techniques for microfluidic assays", Biomicrofluidics, 2013, 7(4).

[4] Drauz K., "Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive handbook", John Wiley & Sons, (2012).

[5] Alexander H. N., Glazer N., "Microbial biotechnology", Cambridge University Press, (2007).

[6] Aehle W., "Enzymes in industry", Wiley Bicentennial Logo, (2007).

[7] Minteer S. D., “Enzyme stabilization and immobilization: Methods and protocols”, Springer Protocols-Humana Press (2011).

[8] Kim J., Grate J. W., and Wang P., "Nanobiocatalysis and its potential applications", Trends Biotechnol., 2008, 26(11) 639–646.

[9] Guisan J. M.,"Immobilization of enzymes and cells", Springer, (2013).

[10] Martínez-Gómez A. de J., Manolache S. O., Gónzalez-Álvarez V., Young R. A., and Denes F. S., "Surface functionalization via in situ interaction of plasma-generated free radicals with stable precursor-molecules on cellulose", Cellulose, 2009, 16(3) 501–517.

[11] Nelson D. L, Lehninger A. L, and Cox M. M., "Lehninger principles of biochemistry", Macmillan, (2008).

[12] Zhang Z., Chen Q., Knoll W., Foerch R., Holcomb R., and Roitman D., "Plasma polymer film structure and DNA probe immobilization", Macromolecules, 2003, 36(20) 7689–7694.

[13] Z. Zhang, W. Knoll, and R. Förch, "Amino-functionalized plasma polymer films for DNA immobilization and hybridization", Surface Coatings Technology, 2005, 200(1) 993–995.

[14] Coad B. R., Jasieniak M., Griesser S. S., and Griesser H. J.,"Controlled covalent surface immobilisation of proteins and peptides using plasma methods", Surface and Coatings Technology, 2013, 233, 169–177.

[15] Choi Y.H., Ko H., Lee G.Y., Chang S.Y., Chang Y. W., Kang M.J., and Pyun J.C., "Development of a sensitive SPR biosensor for C-reactive protein (CRP) using plasma-treated parylene-N film", Sensors Actuators B: Chemical. 2015, 207 133–138.

[16] Rivolo P., Severino S. M., Ricciardi S., Frascella F., and Geobaldo F., "Protein immobilization on nanoporous silicon functionalized by RF activated plasma polymerization of acrylic acid", J. Colloid Interface Science, 2014, 416 73–80.

[17] Sano S., Kato K., and Ikada Y., "Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization", Biomaterials, 1993, 14(11) 817–822.

[18] Gancarz I., Bryjak J., Poźniak G., and Tylus W., "Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization II. Amines plasma", European Polymer Journal, 2003, 39(11) 2217–2224.

[19] Puleo D. A., Kissling R. A., and Sheu M.S.,"A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy", Biomaterials, 2002, 23(9) 2079–2087.

[20] Siow K. S., Britcher L., Kumar S., and Griesser H. J., "Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization - A review", Plasma Processes and Polymers, 2006, 3 (6–7) 392–418.

[21] Daw R., O’Leary T., Kelly J., Short R. D., Cambray-Deakin M., Devlin A. J., Brook I. M., Scutt A., and Kothari S.,"Molecular engineering of surfaces by plasma copolymerization and enhanced cell attachment and spreading", Plasmas and Polymers, 1999, 4(2–3) 113–132.

[22] Haddow D. B., France R. M., Short R. D., MacNeil S., Dawson R. A., Leggett G. J., and Cooper E., "Comparison of

"Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements", Protein Science, 2004, 13(4) 1056–1070.

[32] Ghasemi M., Minier M. J. G., Tatoulian M., Chehimi M. M., and Arefi-Khonsari F., "Ammonia plasma treated polyethylene films for adsorption or covalent immobilization of trypsin: Quantitative correlation between X-ray photoelectron spectroscopy data and enzyme activity", Journal of Physical Chemistry B, 2011, 115(34) 10228–10238.

[33] Gogoi D., Barman T., Choudhury B., Khan M., Chaudhari Y., Dehingia M., Pal A. R., Bailung H., and Chutia J., "Immobilization of trypsin on plasma prepared Ag/PPAni nanocomposite film for efficient digestion of protein", Materials Science and Engineering: C, 2014, 43 237–242.

[34] Dorraki N., Safa N. N., Jahanfar M., Ghomi H., and Ranaei-Siadat S.-O., "Surface modification of chitosan/PEO nanofibers by air dielectric barrier discharge plasma for acetylcholinesterase immobilization", Applied Surface Science, 2015, 349 940–947.

[35] Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., and Gianfreda, L, "Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review", Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31(7) 907-931,().

[36] Dinçer A., Becerik S., and Aydemir T., "Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads", International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 50(3) 815–820.

[37] Tastan E., Önder S., and Kok F. N., "Immobilization of laccase on polymer grafted polytetrafluoroethylene membranes for biosensor construction", Talanta, 2011, 84(2) 524–530,().

[38] Ardhaoui M., Bhatt S., Zheng M., Dowling D., Jolivalt C., and Khonsari F. A., "Biosensor based on laccase immobilized on plasma polymerized allylamine/carbon electrode", Materials Science and Engineering: C, 2013, 33(6) 3197–3205.

[39] Ardhaoui M., Bhatt S., Zheng M., Dowling D., Jolivalt C., and Khonsari F. A., "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo", Materials Science and proliferation and growth of human keratinocytes on plasma copolymers of acrylic acid/1, 7-octadiene and self-assembled monolayers", Journal of Biomedical Materials Research, 1999, 47(3) 379–387.

[23] Bisson I., Kosinski M., Ruault S., Gupta B., Hilborn J., Wurm F., and Frey P., "Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly (ethylene terephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells",Biomaterials, 2002, 23(15) 3149–3158.

[24] Kinoshita Y., Kuzuhara T., Kirigakubo M., Kobayashi M., Shimura K., and Ikada Y., "Reduction in tumour formation on porous polyethylene by collagen immobilization", Biomaterials, 1993, 14(7) 546–550.

[25] Kinoshita Y., Kuzuhara T., Kirigakubo M., Kobayashi M., Shimura K., and Ikada Y., "Soft tissue reaction to collagen-immobilized porous polyethylene: subcutaneous implantation in rats for 20 wk",Biomaterials, 1993, 14(3) 209–215.

[26] Ito Y., Kajihara M., and Imanishi Y., "Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell-adhesive peptide", Journal of Biomedical Materials Research, 1991, 25(11) 1325–1337.

[27] Sun H.-X., Zhang L., Chai H., and Chen H.-L., "Surface modification of poly (tetrafluoroethylene) films via plasma treatment and graft copolymerization of acrylic acid", Desalination, 2006, 192(1) 271–279,.

[28] Labus K., Gancarz I., and Bryjak J.,"Immobilization of laccase and tyrosinase on untreated and plasma-treated cellulosic and polyamide membranes", Materials Science and Engineering: C, 2012, 32(2) 228–235, () .

[29] Wong C. M., Wong K. H., and Chen X. D., "Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications", Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(6) 927–938.

[30] Kawakami M., Koya H., and Gondo S., "Immobilization of glucose oxidase on polymer membranes treated by low-temperature plasma", Biotechnology and Bioengineering, 1988, 32(3) 369–373.

[31] Leiros H. S., Brandsdal B. O., Andersen O. A., Os V., Leiros I., Helland R., Otlewski J., Willassen N. P., and Smalås A. O.,

[48] Liu Z. M., Tingry S., Innocent C., Durand J., Xu Z. K., and Seta P., "Modification of microfiltration polypropylene membranes by allylamine plasma treatment. Influence of the attachment route on peroxidase immobilization and enzyme efficiency", Enzyme and Microbial Technology 2006, 39(4) 868–876.

[49] McCord J. M. and Fridovich I., "Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988)," Free Radical Biology and Medicine, 1988, 5(5) 363–369.

[50] Chelikani P., Fita I., and Loewen P. C., "Diversity of structures and properties among catalases", Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2004, 61(2) 192–208.

[51] Mahlicli F. Y., Şen Y., Mutlu M., and Altinkaya S. A., "Immobilization of superoxide dismutase/catalase onto polysulfone membranes to suppress hemodialysis-induced oxidative stress: A comparison of two immobilization methods", Journal of Membrane Science, 2015, 479 175–189.

[52] Jeffrey P. L., Brown D. H., and Brown B. I., "Lysosomal α-glucosidase. I. Purification and properties of the rat liver enzyme", Biochemistry, 1970, 9(6) 1403–1415.

[53] Ida J., Matsuyama T., and Yamamoto H.,"Surface modification of a ceramic membrane by the SPCP-CVD method suitable for enzyme immobilization", Journal of Electrostatics 2000, 49 71–82.

[54] Di Lullo G. A., Sweeney S. M., Körkkö J., Ala-Kokko L., and San Antonio J. D., "Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen", Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(6) 4223–4231.

[55] Kang I.-K., Kwon B. K., Lee J. H., and Lee H. B.,"Immobilization of proteins on poly(methyl methacrylate) films", Biomaterials, 1993, 4(10) 787–792.

[56] Li Y. H. and Huang Y. D., "The study of collagen immobilization on polyurethane by oxygen plasma treatment to enhance cell adhesion and growth",Surface Coatings Technology, 2007, 201(9–11) 5124–5127.

[57] Aflori M., Drobota M., Dimitriu D. G., Stoica I., Simionescu B., and Harabagiu V., "Collagen immobilization on polyethylene terephthalate surface after helium plasma Engineering: C, 2013, 33(6) 3197–3205.

[40] Güleç H. A., "Immobilization of β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: effect of surface characteristics", Colloids and Surfaces B: Biointerfaces., 2013, 104 83–90.

[41] Elagli A., Belhacene K., Vivien C., Dhulster P., Froidevaux R., and Supiot P., "Facile immobilization of enzyme by entrapment using a plasma-deposited organosilicon thin film", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 110 77–86.

[42] Svendsen A., "Lipase protein engineering", Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology 2000, 1543(2) 223–238.

[43] Rastian Z., Khodadadi A. A., Vahabzadeh F., Bortolini C., Dong M., Mortazavi Y., Mogharei A., Naseh M. V., and Guo Z., "Facile surface functionalization of multiwalled carbon nanotubes by soft dielectric barrier discharge plasma: Generate compatible interface for lipase immobilization", Biochemical Engineering Journal, 2014, 90 16–26.

[44] Quirós M., García A. B., and Montes-Morán M. A., "Influence of the support surface properties on the protein loading and activity of lipase/mesoporous carbon biocatalysts", Carbon, 2011, 49(2) 406–415,().

[45] Deng H.-T., Xu Z.-K., Wu J., Ye P., Liu Z.-M., and Seta P.,"A comparative study on lipase immobilized polypropylene microfiltration membranes modified by sugar-containing polymer and polypeptide", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 28(2–3) 95–100.

[46] Deng H.-T., Xu Z.-K., Dai Z.-W., Wu J., and Seta P.,"Immobilization of Candida rugosa lipase on polypropylene microfiltration membrane modified by glycopolymer: hydrolysis of olive oil in biphasic bioreactor", Enzyme and Microbial Technology 2005, 36(7) 996–1002.

[47] Abrol K., Qazi G. N., and Ghosh A. K., "Characterization of an anion-exchange porous polypropylene hollow fiber membrane for immobilization of ABL lipase", Journal of Biotechnology 2007, 128(4) 838–848,().

antibody immobilization for microfluidic enzyme-linked immunosorbent assay", Analytical Letters, 2012, 45(17) 2569–2579.

[67] Choi Y.-H., Lee G.-Y., Ko H., Chang Y. W., Kang M.-J., and Pyun J.-C., "Development of SPR biosensor for the detection of human hepatitis B virus using plasma-treated parylene-N film", Biosensors and Bioelectronics, 2014, 56 286–294,().

[68] Wang I.-S., Lin Y.-T., Huang C.-H., Lu T.-F., Lue C.-E., Yang P., Pijanswska D. G., Yang C.-M., Wang J.-C., Yu J.-S., Chang Y.-S., Chou C., and Lai C.-S., "Immobilization of enzyme and antibody on ALD-HfO2-EIS structure by NH3 plasma treatment", Nanoscale Research Letters, 2012, 7(1) 1-6.

[69] Akashi N. and Kuroda S., "Protein immobilization onto poly (vinylidene fluoride) microporous membranes activated by the atmospheric pressure low temperature plasma", Polymer, 2014, 55(12) 2780–2791.

[70] Ardhaoui M., Bhatt S., Zheng M., Dowling D., Jolivalt C., and Khonsari F. A., "Methods to detect biomarkers of cellular senescence", Material Science Engineering C, 2013, 33(6) 3197–3205.

[71] Hosseini S., Ibrahim F., Rothan H. A., Yusof R., Van Der Marel C., Djordjevic I., and Koole L. H.,"Aging effect and antibody immobilization on surfaces designed for dengue virus detection COOH exposed", Biochemical Engineering Journal, 2015, 99 183–192.

[72] Chen J.P., and Su C.H.,"Surface modification of electrospun PLLA nanofibers by plasma treatment and cationized gelatin immobilization for cartilage tissue engineering",Acta Biomaterialia, 2011, 7(1) 234-243.

[73] Flounders, A. W., Brandon D. L., and Bates A. H., "Patterning of immobilized antibody layers via photolithography and oxygen plasma exposure", Biosensors and Bioelectronics, 1997, 12(6) 447-456.

[74] Mohamed, A., Nemeshwaree, B., Brigitte, M., Anne, P., Kalim, B., Pascal, D., Anne-Sophie, M., and Rénato, F., " Activity of enzymes immobilized on plasma treated polyester", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2016, 134, 261-272,.

treatment", Materials Science and Engineering: B, 2013, 178(19) 1303–1310.

[58] Krok-Borkowicz M., Musial O., Kruczala P., Dobrzynski P., Douglas T. E. L., Van Vlierberghe S., Dubruel P., and Pamula E.,"Biofunctionalization of poly (L-lactide-co-glycolide) by post-plasma grafting of 2-aminoethyl methacrylate and gelatin immobilization", Materials Letters, 2015, 139 344–347.

[59] Juárez-Moreno J. A., Ávila-Ortega A., Oliva A. I., Avilés F., and Cauich-Rodríguez J. V, "Effect of wettability and surface roughness on the adhesion properties of collagen on PDMS films treated by capacitively coupled oxygen plasma", Applied Surface Science, 2015, 349 763–773.

[60] Vasilets V. N., Hermel G., König U., Werner C., Müller M., Simon F., Grundke K., Ikada Y., and Jacobasch H. J., "Microwave CO2 plasma-initiated vapour phase graft polymerization of acrylic acid onto polytetrafluoroethylene for immobilization of human thrombomodulin", Biomaterials, 1997, 18(17) 1139–1145.

[61] Kim J., Park H., Jung D., and Kim S., "Protein immobilization on plasma-polymerized ethylenediamine-coated glass slides", Analytical Biochemistry, 2003, 313(1) 41–45.

[62] Pâslaru E., Baican M. C., Hitruc E. G., Nistor M. T., Poncin-Epaillard F., and Vasile C., "Immunoglobulin G immobilization on PVDF surface", Colloids Surfaces B Biointerfaces, 2014, 115 139–149.

[63] Shen H., Hu X., Bei J., and Wang S., "The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasma-treated poly(lactide-co-glycolide)", Biomaterials, 2008, 29(15) 2388–2399.

[64] Vesel A. and Elersic K., "Adsorption of protein streptavidin to the plasma treated surface of polystyrene", Applied Surface Science, 2012, 258(15) 5558–5560.

[65] Vesel A., Elersic K., and Mozetic M., "Immobilization of protein streptavidin to the surface of PMMA polymer", Vacuum, 2012, 86(6) 773–775.

[66] Darain F., Wahab M. A., and Tjin S. C., "Surface activation of poly(methyl methacrylate) by plasma treatment: stable

[75] Zhao, M., Li, H., Liu, W., Guo, Y., and Chu, W., "Plasma treatment of paper for protein immobilization on paper-based chemiluminescence immunodevice", Biosensors and Bioelectronics 2016, 79, 581-588,.

[76] Grimaldi, IA., Testa, G., Persichetti, G., Loffredo, F., Villani, F., Bernini, R., "Plasma functionalization procedure for antibody immobilization for SU-8 based sensor", Biosensors and Bioelectronics 2016, 86, 827-833,.

[77] Vanags L.Z., Tan J.T.M., Santos M., Michael P.S., Ali Z., Bilek M.M.M., Wise S.G., Bursill C.A., Plasma activated coating immobilizes apolipoprotein A-I to stainless steel surfaces in its bioactive form and enhances biocompatibility, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2017, 13, 2141-2150,.