زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورۀ 4، شمارۀ 1، بهار و تابستان 1392

تأثیر حلال‌های آلی بر روی فعالیت و پایداری آنزیم تریپسین و پایدارسازی آن با ساکارز

محمد پاژنگ[1,2*]، فرامرز مهرنژاد[3]، نادر چاپارزاده[2,4]، آرزو رحمن‌پور[1]

1- استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
2- عضو گروه پژوهشی بیوتکنولوژی گیاهان شورپسند، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
3- استادیار گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
4- دانشیار گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
5- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

* کدپستی 5375171379، تبریز، ایران
mpazhang@yahoo.com
(دریافت مقاله: 92/5/1، پذیرش: 92/6/4)

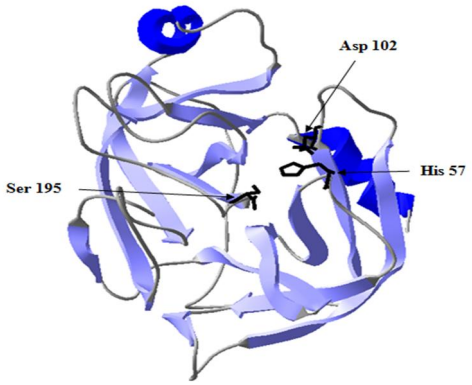
چکیده - به‌کارگیری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی به لحاظ بیوتکنولوژی و صنعتی حایز اهمیت است. یکی از مشکلات موجود در استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی، کاهش پایداری آنزیم‌ها است. جهت رفع این مشکل از روش‌های پایدارسازی پروتئین‌ها همچون استفاده از افزودنی‌ها بهره گرفته می‌شود. در این تحقیق فعالیت و پایداری آنزیم تریپسین در درصدهای مختلف از حلال‌های آلی مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از ساکارز پایداری آنزیم در حلال‌های آلی ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که فعالیت تریپسین در غلظت‌های مختلف از حلال‌های آلی کاهش می‌یابد. میزان کاهش در مورد DMF کمتر از سایر حلال‌ها است. با بررسی پایداری آنزیم مشاهده شد که پایداری آنزیم در حلال‌های آلی کاهش می‌یابد. این کاهش با افزایش Log P حلال‌ها رابطه مستقیم دارد. پایداری آنزیم در حضور DMF در مقایسه با سایر حلال‌ها بیشتر بود. با افزودن ساکارز، تریپسین در مقابل حلال‌ها پایدار گردید که میزان پایدار شدن در حلال DMF بیشتر از حلال‌های دیگر بود. در آخر با توجه به نتایج، جهت به‌کارگیری تریپسین در حلال‌های آلی، مخلوط DMF و ساکارز پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پایدارسازی آنزیم، حلال‌آلی، تریپسین، افزودنی، ساکارز.

1- مقدمه

آنزیم‌ها کاتالیزورهایی می‌باشند که عمل خویش را با کارایی و اختصاصیت بالایی به انجام می‌رسانند. این خصوصیت آن‌ها باعث شده تا این بیوکاتالیزورها جهت استفاده در فرآیندهای صنعتی مورد توجه ویژه‌ای قرار گیرند که دید نسبتا جدیدی در بیوتکنولوژی آنزیم‌ها است [1- 4]. در فرآیندهای صنعتی

(صنایع داروسازی و شیمیایی پیشرفته) اغلب از حلال‌های آلی استفاده می‌شود؛ به این دلیل برای به‌کارگیری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی لازم است که آن‌ها را به حلال‌های آلی منتقل نمود [1، 3]. یکی از مشکلاتی که در این انتقال مطرح است، کاهش چشمگیر پایداری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی است. جهت رفع یا تقلیل این مشکل می‌توان از روش‌های پایدارسازی مختلفی همچون مهندسی پروتئین [5، 6]، تغییر شیمیایی آنزیم‌ها [7] و استفاده از افزودنی‌ها [8-12] بهره برد. از میان روش‌های ذکر شده شاید استفاده از افزودنی‌ها یکی از روش‌های مفید و زود بازده در پایدارسازی باشد. این مواد معمولاً از طریق آبپوشی ترجیحی باعث پایدارشدن پروتئین‌ها می‌شوند [8، 9]. معمولاً برای پایدارسازی آنزیم‌ها از افزودنی‌هایی همچون گلیسرول، سوربیتول و ساکارز استفاده می‌شود [8، 9، 12، 13، 14]. ساکارز دی ساکارید غیراحیا کننده بوده و به لحاظ بیوشیمیایی، صنعتی و دارویی اهمیت دارد. از این ترکیب به وفور در جهت پایدارسازی پروتئین‌ها و مخصوصا پروتئین‌های دارویی استفاده می‌شود [13]. در حلال‌های آلی از پروتئازها جهت سنتز پپتیدها و شیرین کننده مصنوعی آسپارتام استفاده می‌گردد [11، 15]. به این دلیل نیز مطالعات زیادی برای بررسی پایداری و پایدارسازی پروتئازها در حلال‌های آلی صورت گرفته است [6، 11، 15، 16]. در یک تحقیق، پایداری آنزیم کیموتریپسین (یک سرین پروتئاز) در اتانول و اثر پایدارکنندگی پلی اتیلن گلیکول در حضور اتانول بر روی آنزیم بررسی شده است [16]. در تحقیقی دیگر ساختار و پایداری آنزیم ترمولیزین (یک متالوپروتئاز) در حلال‌های آلی بررسی شده و با استفاده از افزودنی‌ها، آنزیم در حضور حلال‌ها پایدار شده است [11]. آنزیم مورد استفاده در این تحقیق، تریپسین است. این آنزیم معمولاً در موجودات عالی دیده می‌شود و به‌طور محدودی در باکتری‌ها (به‌عنوان مثال تریپسین از *Streptomyces griseus* [17]) یافت می‌گردد. به‌طور معمول در تحقیق بر روی آنزیم تریپسین از نوع گاوی و یا خوکی استفاده می‌شود (گزارشی از به‌کارگیری تریپسین باکتریایی در حلال آلی وجود ندارد). با توجه به اینکه در مطالعات کمتر به تریپسین خوکی پرداخته شده است، در این تحقیق از آنزیم تریپسین خوکی استفاده شد. شکل 1 ساختار این آنزیم و رزیدوهای درگیر در کاتالیز را نشان می‌دهد. آنزیم تریپسین یک سرین پروتئاز بوده و در حلال‌های آلی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است [15]. از این آنزیم در حلال‌های آلی جهت سنتز پپتید استفاده می‌شود [18] و از طرفی دیگر دیده شده است تریپسین در حلال‌های آلی پایداری خود را از دست می‌دهد [15]. بنابراین افزایش پایداری این آنزیم در حلال‌های آلی می‌تواند علاوه‌بر دید علمی، دید صنعتی نیز داشته باشد. در این تحقیق فعالیت و پایداری آنزیم تریپسین خوکی در حضور حلال‌های آلی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته سپس با استفاده از ساکارز سعی شده است تا این آنزیم پایدار گردیده و مکانیسم پایدارسازی آن مورد بررسی قرار گیرد.



شکل 1 ساختار سه بعدی تریپسین خوکی. فایل اطلاعات ساختاری تریپسین خوکی با کد PDB: 1FNI از سایت www.pdb.org گرفته شده و با استفاده از این فایل، شکل توسط نرم افزار SPDBV تهیه گردید. رزیدوهای هیستیدین 57، آسپاتیک اسید 102 و سرین 195 نشان داده شده در شکل، رزیدوهای کاتالیزی آنزیم‌اند.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

در این تحقیق از تریپسین خوکی استفاده شد. این آنزیم به همراه همه مواد مورد استفاده از شرکت مرک تهیه گردید.

2-1-1- تعیین فعالیت آنزیم تریپسین

برای تعیین فعالیت آنزیم غلظت 100 µg/ml از آنزیم در بافر 20mM تریس (pH=8) تهیه و 40 میکرولیتر از آن به محیط واکنش آنزیمی حاوی460 میکرولیتر از محلول 1% کازئین در بافر تریس 20mM (pH=8) افزوده شد تا حجم نهایی 500 میکرولیتر گردد. واکنش آنزیمی در دمای آزمایشگاه (25 درجه سانتیگراد) انجام گرفته و بعد از گذشت 5 دقیقه با افزودن 500 میکرولیتر از محلول 10% تری کلرواستیک اسید (TCA) واکنش آنزیمی متوقف گردید. در اینجا قابل ذکر می باشد که تری کلرواستیک اسید هم باعث متوقف شدن فعالیت آنزیم شده و هم قطعات بزرگ پپتیدی را که در محیط موجود می باشند را رسوب می دهد (در این حالت قطعات پپتیدی کوتاه که حاصل عمل آنزیم می‌باشند در محلول روئی مانده و میزان جذب نوری آن‌ها در 280 نانومتر نشاندهنده مقدار فعالیت آنزیم می‌باشد). سپس رسوب حاصله توسط سانتریفوژ در دور 20000 g و به مدت 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد ته نشین گردیده و مقدار جذب محلول روئی توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج 280 نانومتر اندازه‌گیری گردید [11]. یک واحد آنزیمی، مقدار آنزیمی است که بتواند باعث ایجاد قطعات پپتیدی محلول معادل با 0/001 جذب در طول موج 280 نانومتر گردد.

2-1-2- تعیین فعالیت آنزیم در حضور حلال‌های آلی

فعالیت آنزیم درحضور حلال‌های آلی با تهیه درصدهای مورد نظر از حلال‌های آلی n- پروپانول، اتانول، متانول و N,N دی متیل فورمامید (DMF) در محیط واکنش آنزیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که حلال‌های مذکور به‌ترتیب افزایش Log P و قابل امتزاج بودن با آب و همچنین میزان بالای استفاده آن‌ها در زمینه‌های صنعتی و تحقیقاتی، انتخاب شدند [5،6،11]. بعد از اضافه نمودن حلال باید pH محیط واکنش بررسی گردد تا pH=8 باشد. درصدهای تهیه شده از حلال‌های آلی عبارتند از: 0، 5، 10، 15، 20، 25، 30، 35 و 40 درصد حجمی به حجمی. درصد فعالیت باقیمانده آنزیم با در نظر گرفتن فعالیت آنزیم در محیط واکنش بدون حلال به‌عنوان کنترل (فعالیت 100%)، محاسبه گردید.

2-1-3- بررسی پایداری آنزیم در حضور و عدم حضور حلال‌ها

برای بررسی پایداری آنزیم نسبت به دما مقدار غلظت 100 µg/ml از آنزیم در بافر 20 میلی مولار تریس تهیه و به مقدار 100 میکرو لیتر در میکروتیوب‌ها منتقل گردید. سپس میکروتیوب‌ها به مدت 0، 5، 10، 15، 20 و 30 دقیقه در دمای 40 درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار داده شده و بعد از آن حدود 30 دقیقه در یخ قرار گرفته و در آخر فعالیت باقی مانده آنزیم مورد بررسی قرارگرفت. برای بررسی پایداری آنزیم در حلال‌های آلی نسبت به دما غلظت 50% از حلال‌های آلی n- پروپانول، اتانول، متانول و DMF در بافر تریس20 میلی مولار تهیه گردید. سپس محلول‌ها روی pH = 8 تنظیم شده و مقدار غلظت مورد نیاز از آنزیم (100 µg/ml) در هر کدام از حلال‌ها تهیه و به حجم 100 میکرو لیتر در میکروتیوب‌ها تزریق گردید. سپس میکروتیوب‌ها در زمان مشخص تحت تأثیر دمای مورد نظر قرار گرفته و بعد از آن به مدت 30 دقیقه در یخ گذاشته شده و نهایتاً مقدار فعالیت

باقی مانده آنزیم در آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. قابل ذکر است با توجه به اینکه جهت سنجش فعالیت تریپسین، 40 میکرولیتر از محلول آنزیمی حاوی 50% حلال آلی بعد از انکوباسیون دمایی به حجم 460 میکرولیتر محلول 1% کازئین در بافر تریس 20mM (pH=8) افزوده می‌شد، بنابراین غلظت حلال آلی در حجم سنجش 4 % بود.

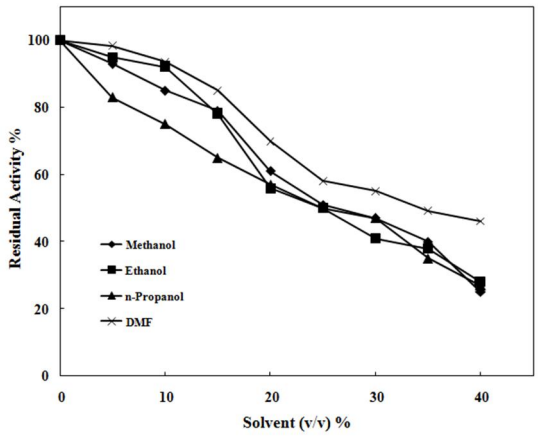
2-1-4- پایدارسازی آنزیم به‌وسیله افزودنی‌ها

برای پایدارسازی آنزیم مقدار 20% از ساکارز در بافر 20mM تریس و50% از حلال‌های آلی n- پروپانول، اتانول، متانول و DMF در بافرتریس 20 میلی مولار تهیه و pH محلول‌ها در نهایت روی pH=8 تنظیم شد. سپس غلظت 100 µg/ml از آنزیم در این محلول‌ها تهیه و به حجم 100 میکرو لیتر در میکروتیوب‌ها منتقل شده و بعد به‌مدت 0، 5، 10، 15، 20 و 30 دقیقه تحت‌تأثیر دمای 40 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. میکروتیوپ‌ها بعد از انکوباسیون دمایی به‌مدت 30 دقیقه در یخ گذاشته شده و فعالیت آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

3- یافته‌ها

3-1- فعالیت آنزیم تریپسین در حضور حلال‌های آلی

فعالیت آنزیم‌ها در حلال‌های آلی بنا به دلایلی همچون مهار، تخریب ساختار و کاهش میزان فعالیت آب کاهش می‌یابد[9]. جهت بررسی فعالیت آنزیم تریپسین در حلال‌های آلی، در صدهای مختلفی از حلال‌های DMF، متانول، اتانول و n- پروپانول تهیه شده و فعالیت آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. چنانچه در شکل 2 مشاهده می‌شود، از بین حلال‌های آلی، DMF نسبت به بقیه تأثیر کمتری روی فعالیت آنزیم دارد. به‌عنوان مثال فعالیت باقیمانده آنزیم در غلظت 20% از حلال‌های آلی DMF، متانول، اتانول و n- پروپانول به‌ترتیب 69، 61، 56 و 57 درصد است.

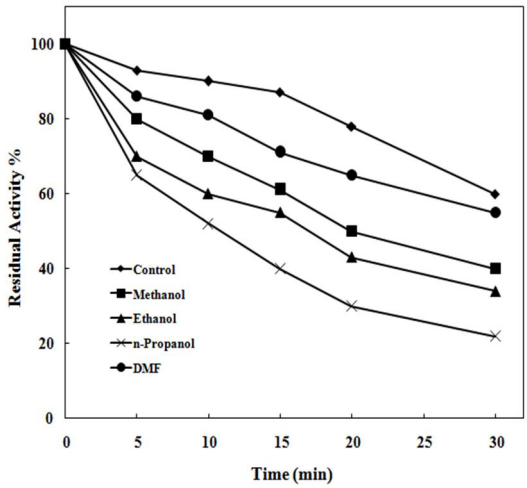


شکل 2 فعالیت تریپسین در درصدهای مختلف از حلال‌ها. همان‌طوری‌که دیده می‌شود در حضور درصدهای مختلف از حلال‌ها، فعالیت تریپسین کاهش می‌یابد. میزان کاهش در حلال DMF کمتر از بقیه حلال‌ها است. انحراف معیار نمودار تا 5% است.

3-2- پایداری حرارتی تریپسین در حضور حلال‌های آلی

کاهش پایداری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی یکی از مشکلاتی است که استفاده آن‌ها را در صنایع محدود می‌کند [1-3]. دیده شده است که پایداری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی با افزایش Log P حلال‌ها کاهش می‌یابد [۶،11]. Log P یک ماده، لگاریتم بر مبنای 10 ثابت تفکیک (P) آن است. ثابت تفکیک نیز برابر با مقدار حلالیت یک ترکیب در n- اکتانول نسبت به حلالیت آن در آب است. بنابراین با افزایش میزان Log P، آب‌گریزی حلال نیز افزایش می‌یابد که این امر باعث تخریب ساختار

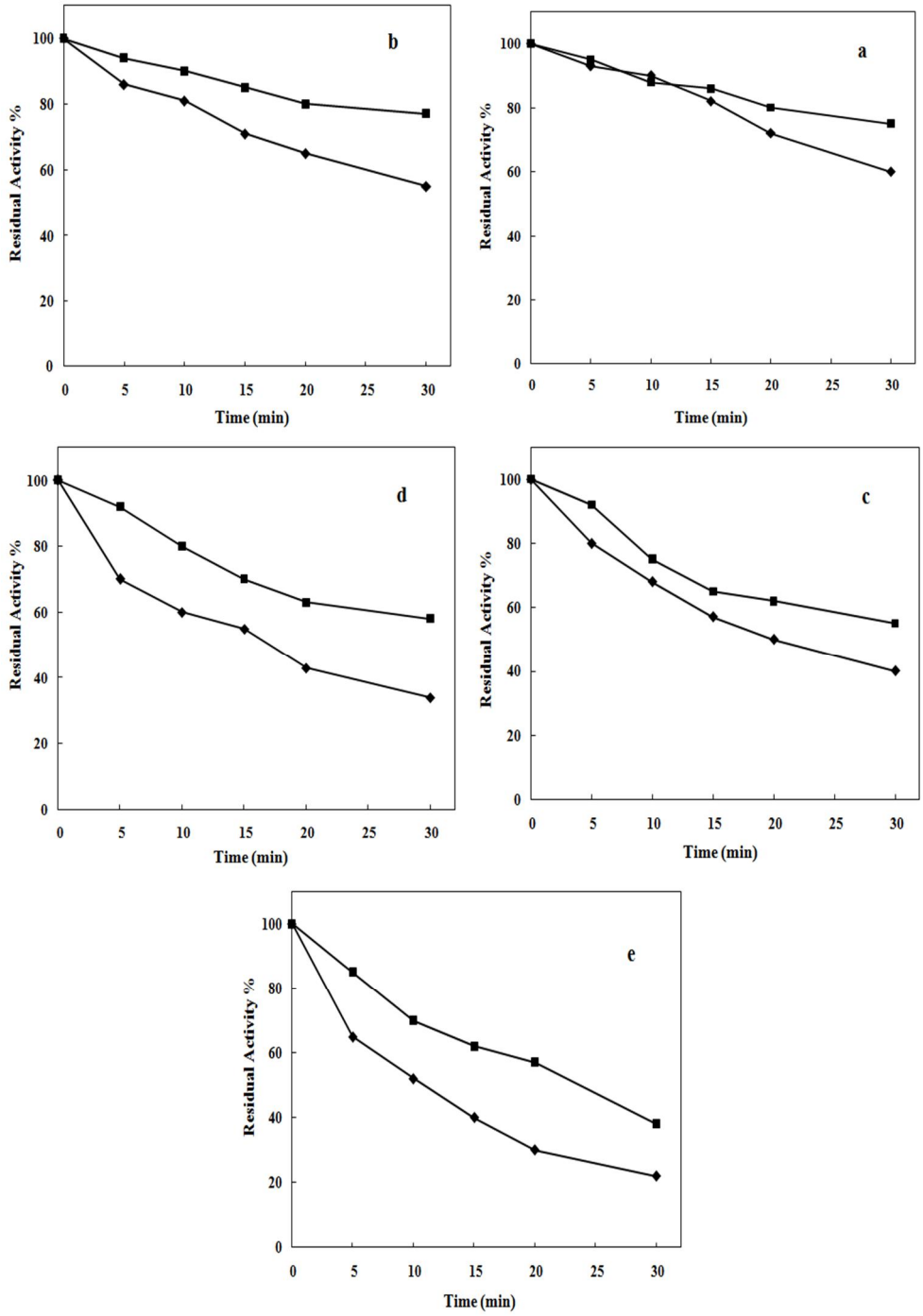
پروتئین‌ها می‌شود. با بررسی پایداری تریپسین در دماهای مختلف دمای 40 درجه سانتی‌گراد انتخاب گردید، چون در این دما پایداری آنزیم در حضور و بدون حضور حلال‌ها کاهش نشان می‌داد (کاهش پایداری در مورد حلال‌ها بیشتر است) و بنابراین اثر پایدار کنندگی ساکارز در حضور و بدون حضور حلال بیشتر مشخص می‌شود. در دماهای پائین تراز 40 درجه سانتی‌گراد، آنزیم در بدون حضور حلال افت پایداری چندانی در زمان آزمایش (30 دقیقه) ندارد بنابراین نمی‌توان اثر پایدارکنندگی ساکارز را روی آنزیم بررسی کرد (نتایج نشان داده نشده است). در بالاتر از دمای 40 درجه سانتی‌گراد، پایداری آنزیم در حضور حلال‌ها در دقایق اولیه به شدت افت می‌کند بنابراین نمی‌توان اطلاعات دقیقی را در مورد اثر هر کدام از حلال‌ها روی پایداری آنزیم به‌دست آورد (نتایج نشان داده نشده است). با توجه به مطالب ذکر شده، پایداری تریپسین در دمای 40 درجه سانتی‌گراد در حضور و عدم حضور حلال‌های آلی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که در حضور و بدون حضور حلال‌های آلی پایداری آنزیم کاهش می‌یابد که میزان کاهش پایداری در حضور حلال‌های آلی بیشتر است (شکل 3 و جدول 1). همان‌طوری‌که در جدول 1 آورده شده است نیمه عمر آنزیم در بدون حضور حلال 43/3 دقیقه است. همچنین دیده می‌شود که از بین حلال‌های مورد استفاده DMF و n- پروپانول به‌ترتیب با نیمه عمرهای 36/4 و 14/1 کمترین و بیشترین تأثیر را روی پایداری آنزیم دارند. همچنین با بررسی ثابت سرعت تخریب (k_{in}) و نیمه عمر آنزیم در حلال‌های آلی مشاهده گردید که پایداری آنزیم با افزایش Log P کاهش می‌یابد (جدول 1).



شکل 3 پایداری تریپسین در عدم حضور (Control) و حضور 50% از حلال‌ها در دمای 40 درجه سانتی‌گراد. نتایج نشان می‌دهد، میزان کاهش پایداری در n- پروپانول و DMF به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را دارد. انحراف معیار نمودار تا 4% است.

3-3- پایدارسازی تریپسین با ساکارز

افزودنی‌ها به میزان زیادی در آزمایشگاه و صنعت جهت پایدارسازی پروتئین‌ها استفاده می‌شوند [19]. ساکارز یکی از افزودنی‌هایی است که به میزان زیادی جهت پایدارسازی بکار برده می‌شود [13، 19]. برای بررسی اثر ساکارز بر روی آنزیم تریپسین، تأثیر آن بر روی پایداری تریپسین در حضور حلال‌های مختلف بررسی گردید. نتایج نشان می‌دهد که ساکارز در حضور و بدون حضور حلال‌ها باعث پایدار سازی آنزیم شد (شکل 4). همچنین با بررسی نیمه عمر نسبی آنزیم دیده می‌شود که ساکارز با افزایش 2 برابری (211 درصدی) نیمه عمر آنزیم بیشترین اثر پایدارسازی خود را در حضور حلال DMF نشان می‌دهد (جدول 1).



شکل 4 اثر ساکارز روی پایداری تریپسین. تأثیر ساکارز (■) در عدم حضور حلال (a) و حضور 50% از حلال‌های DMF (b)، متانول (c)، اتانول (d) و n- پروپانول (e). با توجه به نمودارها مشخص می‌شود که ساکارز در همه شرایط موجود اثر پایدار کنندگی دارد. این اثر در مورد حلال DMF بیشتر و در متانول کمتر از حلال‌های دیگر است. انحراف معیار نمودارها تا 6% است.

جدول 1 ارتباط ثابت سرعت غیرفعال شدن (k_{in}) و نیمه عمر آنزیم با Log P حلال‌ها

حلال	Log P	افزودنی	K_{in} $(min^{-1})^a$	نیمه عمر $(min)^b$	نیمه عمر نسبی $(\%)^c$
بدون حضور حلال	-	-	0/016	43/3	100
		ساکارز	0/009	77	177
DMF	-1/01	-	0/019	36/4	100
		ساکارز	0/009	77	211
متانول	-0/74	-	0/030	23/1	100
		ساکارز	0/020	34/6	150
اتانول	-0/32	-	0/034	20/3	100
		ساکارز	0/019	36/4	179
n- پروپانول	0/34	-	0/049	14/1	100
		ساکارز	0/031	22	156

[a] ثابت سرعت غیر فعال شدن بر اساس معادله $Ln[A]= \ln [A_0]-k_{in}t$ محاسبه شده است. A درصد فعالیت باقیمانده آنزیم، A_0 درصد فعالیت آنزیم در زمان صفر دقیقه از انکوباسیون و t مدت زمان انکوباسیون آنزیم می‌باشد.

[b] نیمه عمر آنزیم از معادله $\frac{0.693}{k_{in}}$ = نیمه عمر ، محاسبه شده است.

[c] نیمه عمر در حضور ساکارز نسبت به عدم حضور ساکارز

4- بحث

فعالیت آنزیم‌ها در حضور حلال‌ها کاهش می‌یابد که می‌تواند در اثر تخریب ساختار آنزیم و مهار آنزیم باشد [2]. در این تحقیق نیز فعالیت آنزیم تریپسین در حضور حلال‌ها کاهش یافت. مهار آنزیم اغلب در درصدهای پایین از حلال (کمتر از 5 درصد) به وضوح باعث کاهش چشمگیر فعالیت آنزیم (30 الی 40 درصد) می‌گردد (زیرا میانکنش مهار کننده با آنزیم یک میانکنش اختصاصی است) و در درصدهای بالاتر کاهش فعالیت به‌طور توأم در اثر تخریب ساختار و مهار می‌باشد [2، 6، 11]. با توجه به اینکه بیشترین مقدار کاهش فعالیت در این تحقیق و آن هم در مورد n- پروپانول است (کمتر از 20 درصد)، می‌توان گفت که کاهش فعالیت آنزیم در حلال‌های به‌کار رفته بیشتر به‌دلیل تخریب ساختاری بوده است تا مهار. با بررسی پایداری آنزیم مشاهده می‌شود که پایداری آنزیم با افزایش Log P حلال‌ها کاهش می‌یابد. این امر با افزایش آب‌گریزی محیط و در نتیجه میل به باز شدن ساختار پروتئین در ارتباط است. با توجه به کاهش پایداری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی از افزودنی ساکارز برای پایدارسازی استفاده شد. ساکارز با افزایش کشش سطحی محلول و در نتیجه دور شدن ترجیحی از سطح پروتئین باعث افزایش پایداری پروتئین می‌شود [8، 9، 12، 19]. تحقیقات شبیه‌سازی مولکولی نیز نشان می‌دهند که ساکارز باعث کاهش نوسانات ساختار پروتئین و در نتیجه افزایش پایداری می‌شود [13]. در این مطالعه دیده می‌شود که ساکارز در حضور و بدون حضور حلال باعث افزایش پایداری شده است. این افزایش در مورد DMF بیشتر (حدود دوبرابر) و در مورد متانول و n- پروپانول کمتر (حدود یک ونیم برابر) است (جدول 1). می‌توان چنین گفت که DMF با داشتن Log P=-1/01 از بقیه حلال‌های مورد استفاده در این تحقیق قطبی‌تر بوده و همچنین توانایی ایجاد پیوند هیدروژنی را دارد. بنابراین این حلال می‌تواند با جدا کردن آب ضروری موجود در اطراف پروتئین و ایجاد پیوند هیدروژنی با مولکول‌های پروتئین باعث کاهش پایداری آنزیم شود [20]. در اثر افزایش کشش سطحی توسط ساکارز، وابستگی مولکول‌های آب اطراف پروتئین نسبت به هم افزایش پیدا کرده (به‌دلیل افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین یکدیگر) و بنابراین توانایی DMF در جدا کردن آب ضروری از پروتئین کاهش یافته و به این دلیل ساکارز بهترین اثر پایدارسازی خود را در حضور DMF نشان می‌دهد. حلال‌های دیگر مورد استفاده در این تحقیق الکل

بوده و نسبت به DMF قطبیت کمتری دارند. الکل‌ها از طریق میانکنش با پاکت‌های آب‌گریز سطحی موجود در پروتئین‌ها باعث کاهش پایداری آن‌ها می‌شوند [21، 22]. بنابراین با توجه به مکانیسم متفاوت تخریب ساختار پروتئین در الکل‌ها نسبت به DMF، اثر پایدارسازی ساکارز در الکل‌ها نسبت به DMF کمتر است. گفتنی است که بررسی مکانیسم پایدارکنندگی ساکارز روی تریپسین در حلال‌های آلی مختلف برای اولین بار در این تحقیق انجام گرفته است. به این دلیل برای بررسی دقیق مکانیسم پایدارسازی آنزیم توسط ساکارز در حضور حلال‌های آلی ذکر شده، نیاز به شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است که خارج از دید این تحقیق می‌باشد. در آخر بنا به نتایج و بحث انجام شده، برای استفاده از تریپسین در صنایع، ترکیب DMF با ساکارز پیشنهاد می‌شود چون در DMF فعالیت آنزیم نسبت به حلال‌های دیگر مورد استفاده، به میزان کمی کاهش می‌یابد و همچنین پایداری آنزیم در مخلوط DMF و ساکارز از بقیه موارد بیشتر است.

5- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله کمال تشکر را از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان ابراز می‌دارند. همچنین قابل ذکر است که هزینه این تحقیق از طرف دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تامین شده است.

6- منابع

[1] Gupta, M. N., and Roy, I. (2004) Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. *Eur J Biochem.* 271, 2575-2583.

[2] Klibanov, A. M. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water?, *Trends Biotechnol.* 15, 97-101.

[3] Klibanov, A. M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature.* 409, 241-246.

[4] Mattos, C., and Ringe, D. (2001) Proteins in organic solvents. *Curr Opin Struct Biol.* 11, 761-764.

[5] Asghari, S. M., Khajeh, K., Dalfard, A. B., Pazhang, M., and Karbalaei-Heidari, H. R. (2011) Temperature, organic solvent and pH stabilization of the neutral protease from Salinovibrio proteolyticus: significance of the structural calcium. *BMB Rep.* 44, 665-668.

[6] Badoei-Dalfard, A., Khajeh, K., Asghari, S. M., Ranjbar, B., and Karbalaei-Heidari, H. R. (2010) Enhanced activity and stability in the presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. *J Biochem.* 148, 231-238.

[7] Khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., Ebrahim Habibi, A., and Nemat-Gorgani, M. (2001) Chemical modification of bacterial alpha-amylases: changes in tertiary structures and the effect of additional calcium. *Biochim Biophys Acta.* 1548, 229-237.

[8] Arakawa, T., and Timasheff, S. N. (1982) Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry.* 21, 6536-6544.

[9] Kumar, V., Chari, R., Sharma, V. K., and Kalonia, D. S. (2011) Modulation of the thermodynamic stability of proteins by polyols: significance of polyol hydrophobicity

and impact on the chemical potential of water. *Int J Pharm.* 413, 19-28.

[10] Nazari-Robati, M., Khajeh, K., Aminian, M., Fathi-Roudsari, M., and Golestani, A. (2012) Co-solvent mediated thermal stabilization of chondroitinase ABC I form Proteus vulgaris. *Int J Biol Macromol.* 50, 487-492.

[11] Pazhang, M., Khajeh, K., Ranjbar, B., and Hosseinkhani, S. (2006) Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. *J Biotechnol.* 127, 45-53.

[12] Street, T. O., Bolen, D. W., and Rose, G. D. (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 13997-14002.

[13] Cioni, P., Bramanti, E., and Strambini, G. B. (2005) Effects of sucrose on the internal dynamics of azurin. *Biophys J.* 88, 4213-4222.

[14] Devaraneni, P. K., Mishra, N., and Bhat, R. (2012) Polyol osmolytes stabilize native-like cooperative intermediate state of yeast hexokinase A at low pH. *Biochimie.* 94, 947-952.

[15] Simon, L. M., Kotorman, M., Garab, G., and Laczko, I. (2001) Structure and activity of alpha-chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. *Biochem Biophys Res Commun.* 280, 1367-1371.

[16] Simon, L. M., Kotorman, M., Szabo, A., Garab, G., and Laczko, I. (2004) Effects of polyethylene glycol on stability of alpha-chymotrypsin in aqueous ethanol solvent. *Biochem Biophys Res Commun.* 317, 610-613.

[17] Lee, W. S., Park, C. H., and Byun, S. M. (2004) Streptomyces griseus trypsin is stabilized against autolysis by the cooperation of a salt bridge and cation-pi interaction. *J Biochem. 135*, 93-99.

[18] Ito, Y., Fujii, H., and Imanishi, Y. (1993) Catalytic peptide synthesis by trypsin modified with polystyrene in chloroform. *Biotechnol Prog.* 9, 128-130.

[19] Ohtake, S., Kita, Y., and Arakawa, T. (2011) Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv Drug Deliv Rev.* 63, 1053-1073.

[20] Knubovets, T., Osterhout, J. J., and Klibanov, A. M. (1999) Structure of lysozyme dissolved in neat organic solvents as assessed by NMR and CD spectroscopies. *Biotechnol Bioeng.* 63, 242-248.

[21] Herskovits, T. T., Gadegbeku, B., and Jaillet, H. (1970) On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. *J Biol Chem.* 245, 2588-2598.

[22] Avdulov, N. A., Chochina, S. V., Daragan, V. A., Schroeder, F., Mayo, K. H., and Wood, W. G. (1996) Direct binding of ethanol to bovine serum albumin: a fluorescent and 13C NMR multiplet relaxation study. *Biochemistry.* 35, 340-347.