زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 8، شماره 1، بهار و تابستان 1396

بررسی پایداری آنزیم اوریکاز از *آسپرژیلوس فلاووس* و پایدارسازی آن با گلوکز

سمیه میرزائی‌نیا[1]، محمد پاژنگ[2*]، مهدی ایمانی[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
2- استادیار گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
3- استادیار گروه علوم پایه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*تبریز، کد پستی: **5375171379**
pazhang@azaruniv.ac.ir
(دریافت مقاله: 93/11/4 پذیرش مقاله: ۹٤/۹/۲)

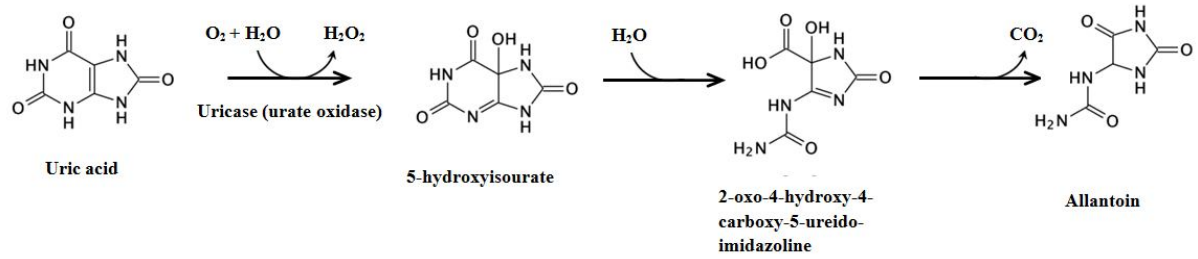
چکیده– اوریکاز یا اورات اکسیداز آنزیمی است که باعث تبدیل اوریک اسید)کم محلول(به 5– هیدروکسی ایزواورات و در نهایت آلانتوئین می شود. افزایش اوریک اسید در انسان باعث بیماری هایی همچون نقرس و سنگ های کلیوی می گردد. بنابراین اوریکاز می تواند به عنوان یک آنزیم دارویی برای کاهش سطح اوریک اسید خون مورد استفاده قرار گیرد. یکی از مشکلات استفاده از پروتئین ها)همچون آنزیم‌های دارویی(، پایداری کم آن ها است. روش های مختلفی از جمله استفاده از افزودنی ها، جهت پایدارسازی پروتئین ها استفاده می شود. در این تحقیق وکتور بیانی)+(pET28a حاوی ژن اوریکاز *آسپرژیلوس فلاووس* به اشریشیاکلی سویه BL21 (DE3 منتقل و سپس پروتئین نوترکیب بیان و با ستون کروماتوگرافی نیکل آگارز تخلیص شد. پس از تخلیص آنزیم، پایداری حرارتی آنزیم خالص بررسی شده و آنزیم با افزودنی ها پایدار شد. نتایج نشان داد که آنزیم به خوبی تخلیص شده و فعال است. بررسی پایداری آنزیم نشان داد که اوریکاز تا دمای 20 درجه سانتی گراد پایداری خود را حفظ کرده و بعد از آن پایداری خود را از دست می دهد، بطوری که نیمه عمر آن در 40 درجه سانتی گراد 30 دقیقه است. نتایج پایدارسازی آنزیم با استفاده از 20٪ از گلوکز، سوربیتول و گلیسرول نشان داد که گلوکز بیشترین اثر پایدارکنندگی را بر روی اوریکاز داشته و تا بیش از دو برابر نیمه عمر آن را بالا برده است. در نهایت می توان نتیجه گرفت افزودنی هایی همچون گلوکز که باعث افزایش کشش سطحی می شوند، بیشترین اثر پایدارکنندگی را روی آنزیم اوریکاز دارند.

کلیدواژگان: اوریک اسید، اوریکاز، پایدارسازی، افزودنی، گلوکز.

1- مقدمه

آنزیم اوریکاز یا اورات اکسیداز[1] با EC 1.7.3.4 از دسته آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز بوده [1] و نقش مهمی را در مسیر تجزیه پورین‌ها داشته و باعث اکسیداسیون اوریک اسید (با حلالیت پائین) به 5-هیدروکسی ایزواورات می-شود. ترکیب اخیر می‌تواند به صورت خودبخود (و یا آنزیمی) در نهایت به آلانتوئین (محلول) تبدیل شود (شکل1) [2،3].

[1] Urate oxidase



شکل 1 واکنش‌هایی که باعث تبدیل اوریک اسید به آلانتوئین می‌شوند. واکنش اول از سمت چپ توسط آنزیم اوریکاز کاتالیز می‌شود و و اکنش‌های بعدی به صورت خودبخود و یا آنزیمی پیش می‌روند. شکل بر اساس اطلاعات منبع شماره 3 رسم شده است.

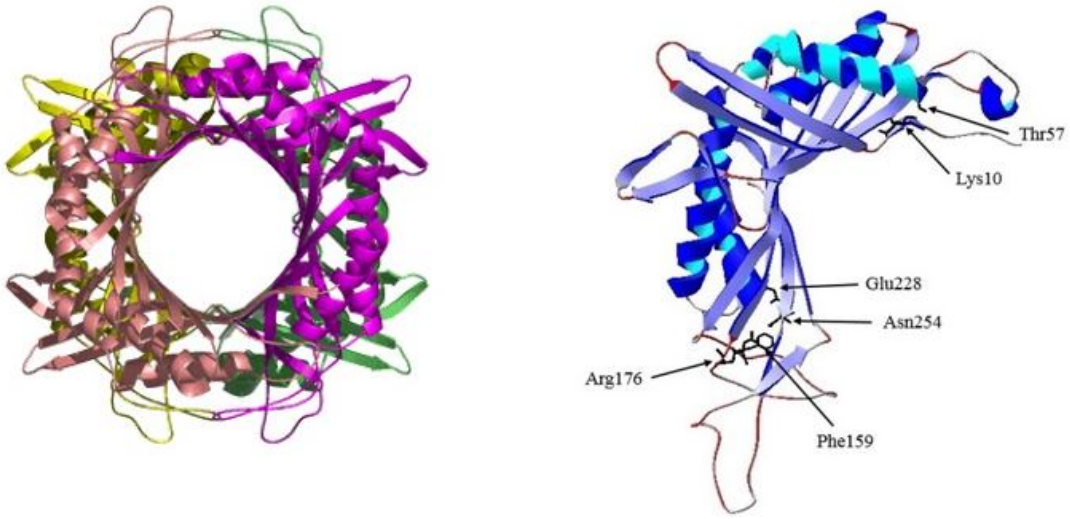
انسان و تعدادی از نخستی‌های عالی این آنزیم را به علت جهش‌های بی‌معنی[2] در اوایل دوره میوسن[3] از دست داده‌اند [4]. فقدان اوریکاز منجر به بالا رفتن سطح اوریک اسید پلاسمای خون می‌شود. افزایش سطح اوریک اسید (در اثر افزایش متابولیسم پورین‌ها) با توجه به حلالیت پایین آن باعث شکل‌گیری کریستال‌هایی از اوریک اسید می‌شود که به طور معمول منجر به شرایطی مانند نقرس و سنگ‌های اورات در دستگاه ادراری می‌شود [5-7]. بنابراین آنزیم اوریکاز می‌تواند با تبدیل اوریک اسید کم محلول به آلانتوئین محلول، به عنوان یک آنزیم دارویی باشد. از اوریکازها با منابع مختلف می‌توان به عنوان آنزیم دارویی بهره برد.

آنزیم اوریکاز از منابع مختلفی همچون باکتری‌ها، قارچ‌ها و سلول‌های یوکاریوتی به دست آمده است. این آنزیم برای اولین بار از کلیه گاو بدست آمده است [5]. از انواع باکتری‌های تولید کننده اوریکاز می‌توان به *سودوموناس آئروجینوزا*، *پروتئوس میرابیلیس*، *استرپتومایسس آلبوسریسئولوس* و *اشریشیا کلی* اشاره کرد [8]. از قارچ‌ها نیز *آسپرژیلوس فلاووس* و *کاندیدا تروپیکالس* آنزیم اوریکاز را تولید می‌کنند [9،8]. امروزه از آنزیم اوریکاز از منبع *آسپرژیلوس فلاووس* به عنوان آنزیم دارویی استفاده می‌شود [10]. اوریکاز از *آسپرژیلوس فلاووس* یک هوموتترامر[4] با وزن مولکولی 135 کیلو دالتون بوده (هر زیر واحد تقریباً 34 کیلو دالتون) و دارای چهار زیرواحد مجزاست (شکل 2-A). این آنزیم غیرگلیکوزیله بوده و پیوند دی سولفیدی ندارد [9،1]. هر زیرواحد آنزیم حاوی یک جایگاه فعال در ارتباط با زیر واحد دیگر است. شکل 2B ساختار این آنزیم و رزیدوهای درگیر در جایگاه فعال را نشان می‌دهد. رزیدوهای درگیر در جایگاه فعال شامل لیزین10، ترئونین57، فنیل آلانین159، آرژینین176، گلوتامیک اسید228 و آسپاراژین254 است (شکل 2-B) [11].

تعداد زیادی از پروتئین‌ها از جمله پروتئین‌های دارویی از نظر ساختاری در مواجه با استرس‌های متعدد از جمله افزایش دما ناپایدار می‌شوند [12]. برای رفع این مشکل می‌توان از روش‌هایی مانند جهش‌زایی [13]، تغییر شیمیایی پروتئین‌ها [15،14] و استفاده از افزودنی‌ها [16-18] استفاده کرد. از میان این روش‌ها استفاده از افزودنی‌ها از روش‌های آسان و مفید است که به میزان زیادی باعث افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌شود [19،17،16].

قندها و پلی‌ال‌ها به طور وسیعی برای پایدارسازی ماکرومولکول‌های زیستی برعلیه دناتوراسیون دمایی استفاده می‌شوند [23-20،16].

[2] Nonsense mutations
[3] Miocene
[4] Homotetramer



(A) (B)

شکل 2 ساختار آنزیم اوریکاز از *آسپرژیلوس فلاووس*. (A) ساختار هوموتترامر آنزیم اوریکاز (B) ساختار یک زیر واحد آنزیم اوریکاز و رزیدوهای درگیر در جایگاه فعال را نشان می‌دهد. فایل اطلاعات ساختاری آنزیم اوریکاز با کد 4OQC ازسایت www.pdb.org گرفته شده است. این ساختار با استفاده از نرم‌افزار SPDBV تهیه شد. جایگاه فعال شامل لیزین10، ترئونین57، فنیل آلانین159، آرژینین176،گلوتامیک اسید228 و آسپاراژین254 می‌باشد.

از این مواد می‌توان به گلوکز، سوربیتول وگلیسرول اشاره کرد. این مواد از طریق آب‌پوشی ترجیحی[1] باعث پایداری پروتئین‌ها می‌شوند [25،24]. از قندها و پلی‌ال‌ها همچنین در صنعت داروسازی به عنوان افزودنی در فرمولاسیون پروتئین‌های دارویی استفاده می‌شود [26،16].

با توجه به اهمیت آنزیم اوریکاز به عنوان آنزیم دارویی، بررسی پایداری و همچنین پایدارسازی آن می‌تواند به لحاظ بیوتکنولوژیک حائز اهمیت باشد. بنابراین در این تحقیق بعد از بیان آنزیم اوریکاز از *آسپرژیلوس فلاووس* در باکتری *اشریشیا کلی* سویه BL21 (DE3) و تخلیص آن، پایداری دمایی آنزیم مورد بررسی قرار گرفت و درنهایت با استفاده از گلوکز آنزیم پایدار گردید.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

در این تحقیق اوریک اسید و آنتی بیوتیک کانامایسین از شرکت سیگما خریداری شد. بقیه مواد مورد استفاده از شرکت مرک تهیه شد.

2-2- بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب

به منظور تولید پروتئین نوترکیب، ناقل pET28a (+) دارای ژن اوریکاز (که توسط یکی از نویسندگان مقاله، مهدی ایمانی، ساخته شده است) به باکتری اشریشیاکلی سویه BL21 (DE3) با روش شوک حرارتی منتقل شد. سپس باکتری حاوی ناقل دارای ژن به فلاسک حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت 50 میکروگرم بر میلی لیتر (دمای 37 درجه سانتی‌گراد) منتقل شد. بعد از رسیدن محیط کشت به OD=0/8 در طول موج 600 نانومتر، القای بیان پروتئین با لاکتوز 4 میلی‌مولار در دمای 28 درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از گذشت 6 ساعت محیط کشت جمع‌آوری شده و با دور 10000×g و به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی دور ریخته شده و

[1] Preferential hydration

رسوب (باکتری‌ها) در بافر لیز (ایمیدازول 20 میلی‌مولار، کلرید سدیم 150 میلی‌مولار و تریس 20 میلی‌مولار، 8 pH) معلق شده و برای تخریب سلول‌ها و استحصال عصاره سلولی حاوی پروتئین نوترکیب، با دستگاه سونیکاتور شرکت Biocompare (آمریکا) تحت سونیکاسیون (10 دور سونیکاسیون هر دور، 20 ثانیه پالس و 40 ثانیه استراحت) قرار گرفت. سلول‌های لیز شده در 20000×g و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به روی ستون حاوی رزین نیکل-آگارز منتقل و ستون با بافر حاوی تریس 20 میلی‌مولار و ایمیدازول 20 میلی‌مولار، کلرید سدیم 150 میلی‌مولار و 8 pH شستشو شد. سپس پروتئین نوترکیب حاوی دنباله هیستیدینی (در انتهای N) با افزودن بافر حاوی تریس 20 میلی‌مولار، ایمیدازول 250 میلی‌مولار، کلرید سدیم 150 میلی‌مولار و با 8 pH از ستون خارج شد. محلول حاوی پروتئین خالص علیه بافر تریس 50 میلی‌مولار دیالیز شد (از این محلول حاوی آنزیم خالص در مطالعات دیگر در این تحقیق استفاده شد). در نهایت برای بررسی بیان و میزان خلوص آنزیم نوترکیب، عصاره سلولی قبل از القا، بعداز القا و بعد از تخلیص با روش SDS-PAGE، الکتروفورز گردید [27].

2-3- تعیین فعالیت آنزیم اوریکاز

برای تعیین فعالیت آنزیم، 50 میکرولیتر از محلول حاوی آنزیم خالص به900 میکرولیتر از محلول حاوی سوبسترا (اوریک اسید 0/1 میلی‌مولار، EDTA 1 میلی‌مولار و تریس 50 میلی‌مولار با 7 pH) در دمای 25 درجه سانتی‌گراد افزوده شد. بعد از گذشت 6 دقیقه 100 میکرولیتر KOH 20% (وزنی به حجمی) برای توقف واکنش آنزیمی افزوده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج 293 نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (Genway) ارزیابی شد. از آنجایی که اوریک اسید در طول موج 293 نانومتر دارای حاوی جذب بوده و بنابراین فعالیت آنزیم بر اساس میزان کاهش اوریک اسید اندازه گیری شد [9]. در واقع فعالیت آنزیم اوریکاز توسط کاهش جذب در طول موج 293 نانومتر تعیین می‌شود. یک واحد آنزیمی، مقدار آنزیمی است بتواند 1 میکرومول اوریک اسید را در یک دقیقه مصرف نماید.

2-4- بررسی پایداری دمایی آنزیم در دماهای مختلف

برای سنجش پایداری حرارتی آنزیم، محلول‌های حاوی آنزیم در میکروتیوب‌ها به مدت 10 دقیقه در دماهای 0، 10، 20، 30، 40، 50، 60 و 70 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گذشت 10 دقیقه آنزیم سریعاً به روی یخ منتقل شد. بعد از گذشت 30 دقیقه از قرارگیری میکروتیوب روی یخ، فعالیت باقی‌مانده آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیمی با در نظر گرفتن دمای صفر (100%) به عنوان کنترل محاسبه گردید.

2-5- بررسی پایداری دمایی آنزیم در زمان‌های مختلف

با توجه به نتایج بالا دمای 30، 40 و 60 درجه سانتی‌گراد برای بررسی در زمان‌های مختلف انتخاب شدند. تیوب‌های محتوی آنزیم در دماهای مورد نظر انکوبه شدند و در بازه‌های زمانی 0، 5، 10، 20، 30، 40، 50 و 60 دقیقه برداشته شده و به روی یخ منتقل و پس از گذشت 30 دقیقه، فعالیت باقی‌مانده آنزیم بررسی شد. میزان فعالیت باقی‌مانده آنزیم در زمان صفر دقیقه (در داخل یخ قرار داده شده) به عنوان فعالیت 100% (کنترل) در نظر گرفته شد.

2-6- بررسی اثر افزودنی‌ها بر روی پایداری اوریکاز

برای بررسی اثر افزودنی‌های مختلف، محلول آنزیمی حاوی غلظت 20 درصد (حجمی به حجمی) از گلیسرول و 20 درصد (وزنی به حجمی) از سوربیتول و گلوکز تهیه

شده و به میکروتیوب‌ها منتقل شد. میکروتیوب‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای 40 درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس به مدت 30 دقیقه به روی یخ منتقل شدند و در نهایت فعالیت باقی‌مانده آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیمی باقی‌مانده در حضور 20 درصد از افزودنی‌ها که به مدت 0 دقیقه (انکوبه شده در یخ) به عنوان کنترل (فعالیت 100%) در نظر گرفته شد.

2-7- بررسی اثر گلوکز بر پایداری آنزیم نوترکیب

برای بررسی تأثیر گلوکز بر روی فعالیت آنزیم اوریکاز، محلول آنزیمی حاوی مقدار 20 % گلوکز در تهیه شده و بعد از انتقال به میکروتیوب‌ها در دمای 40 درجه سانتی‌گراد در زمان‌های 0، 5، 10، 20، 30، 40، 50 و 60 دقیقه قرار گرفت. سپس به مدت 30 دقیقه به روی یخ منتقل شدند و فعالیت باقی‌مانده آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار فعالیت باقی‌مانده آنزیم در زمان صفر به عنوان فعالیت 100% (کنترل) در نظر گرفته شد.

2-8- اندازه گیری ثابت سرعت غیرفعال شدن و نیمه عمر آنزیم

برای محاسبه ثابت سرعت غیر فعال شدن، اول نمودار لگاریتم طبیعی (نپری) درصد فعالیت آنزیم علیه زمان‌های مختلف رسم می‌گردد. اگر نمودار حاصل، نمودار یک خط راست باشد نتیجه‌گیری می‌شود که واکنش غیر فعال شدن، واکنش درجه یک است. در این نوع واکنش‌ها ثابت سرعت غیرفعال شدن (k_{in}) و نیمه عمر آنزیم (Half life) به ترتیب با روابط (1) (2) محاسبه می‌شود.

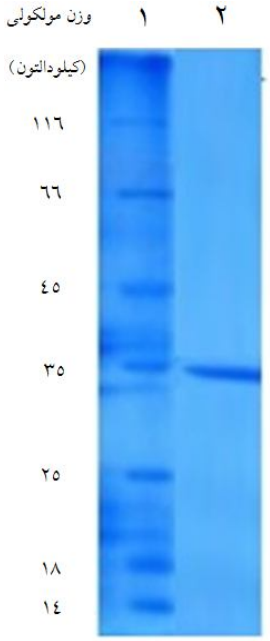
$$\ln[\text{Activity}] = \ln[\text{Activity}]_0 - k_{in}t \quad (1)$$

$$Half\ Life = \frac{0.693}{k_{in}} \quad (2)$$

3- نتایج

3-1- بیان و تخلیص

بعد از بیان، آنزیم نوترکیب توسط ستون Ni-NTA خالص شد، همان‌طور که در شکل 3 مشاهده می‌شود، پروتئین خالص شده دارای وزن مولکولی حدود 34 کیلودالتون است. این اندازه وزن مولکولی مربوط به مونومر آنزیم اوریکاز می‌باشد و نشان می‌دهد آنزیم بیان شده و به خوبی خالص شده است.



شکل 3 نتایج حاصل از بیان و تخلیص آنزیم اوریکاز بر روی ژل SDS-PAGE.چاهک 1، پروتئین مارکر و چاهک 2 پروتئین خالص شده را نشان می‌دهد. در پروتئین مارکر، وزن‌های مولکولی 116، 66، 45، 35، 25، 18 و 14 کیلو دالتون به ترتیب متعلق به پروتئین‌های بتاگالاکتوزیداز، آلبومین سرم گاوی، اوآلبومین، لاکتات دهیدروژناز، REase Bsp 981، بتالاکتوگلوبین و لیزوزیم است.

3-2- پایداری دمایی آنزیم در دماهای مختلف

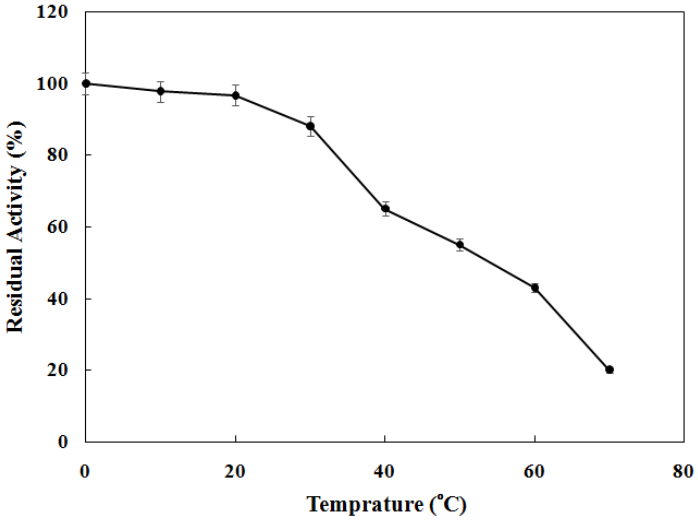
برای بررسی پایداری حرارتی، آنزیم به مدت 10 دقیقه در دماهای 0، 10، 20، 30، 40، 50، 60 و 70 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. همانطور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، آنزیم تا دمای 20 درجه سانتی‌گراد تا حدودی پایداری خود را حفظ می‌کند ولی بعد از آن به تدریج پایداری خود را از دست می‌دهد.

3-3- پایداری دمایی آنزیم در زمان‌های مختلف

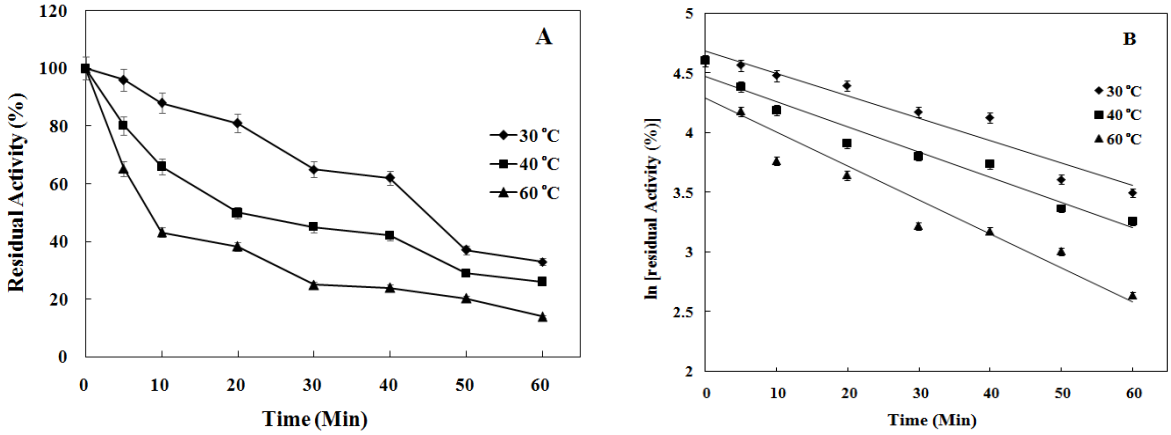
پس از انکوبه کردن آنزیم در دماهای30 ، 40 و 60 درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف پایداری آنزیم با تعیین فعالیت و رسم نمودار علیه زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت (شکل 5). همان‌طور که در شکل A-5 مشخص است بعد از گذشت 60 دقیقه آنزیم در دماهای 30 ، 40 و 60 به ترتیب 33%، 26% و 14% از فعالیت (پایداری) خود را حفظ کرده است. با توجه به اینکه نمودار لگاریتم طبیعی فعالیت باقی‌مانده آنزیم علیه زمان خطی است (شکل B-5) بنابراین واکنش غیر فعال شدن آنزیم در دماهای مورد آزمایش از نوع درجه یک است. جدول 1 ثابت سرعت غیر فعال شدن (k_{in}) و نیمه عمر آنزیم را در دماهای مورد آزمایش نشان می‌دهد.

جدول 1 ثابت سرعت غیر فعال شدن و نیمه عمر آنزیم اوریکاز در دماهای مختلف

Temperature (°C)	k_{in} (1/Min)	Half life (Min)
30	0/018	38
40	0/022	30
60	0/028	24



شکل 4 تأثیر دمای‌های مختلف بر روی پایداری آنزیم



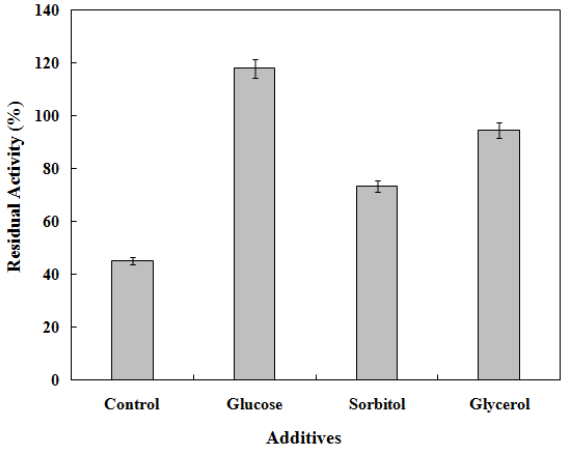
شکل 5 بررسی پایداری حرارتی آنزیم در دماهای 30°c، 40 c و 60°c. (A) فعالیت باقی‌مانده آوریکاز در اثر انکوباسیون در زمان‌های مختلف. (B) نمودار نیمه لگاریتمی فعالیت باقی‌مانده آنزیم در زمان‌های مختلف.

3-4- بررسی پایداری آنزیم در حضور افزودنی‌ها

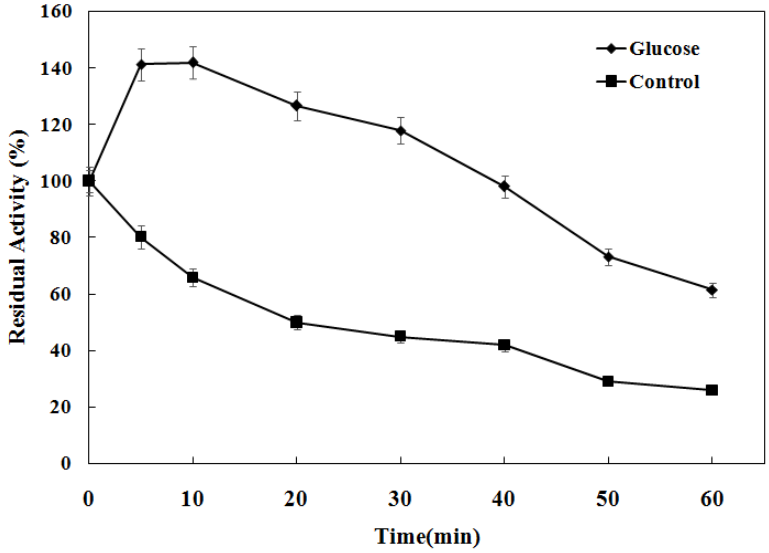
برای بررسی تأثیر افزودنی‌ها بر روی پایداری آنزیم، فعالیت باقی‌مانده آنزیم بعداز انکوبه نمودن آنزیم به مدت 30 دقیقه در دمای 40 درجه سانتی‌گراد در حضور 20 درصد از افزودنی‌های گلوکز، سوربیتول و گلیسرول و عدم حضور آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل 6 نشان داده شده است، آنزیم در عدم حضور افزودنی‌ها تا 45% فعالیت (پایداری) خود را حفظ کرده است اما در حضور گلوکز، سوربیتول و گلیسرول فعالیت باقی‌مانده‌اش به ترتیب به 117%، 73% و 94% رسیده است. این نشان می‌دهد که همه افزودنی‌های به کار رفته آنزیم را پایدار می‌کنند و از میان آن‌ها گلوکز بیشترین اثر پایدار کنندگی را دارد. بنابراین برای بررسی بیشتر تأثیر افزودنی‌ها بر روی پایداری اوریکاز، گلوکز انتخاب شد.

3-5- پایدارسازی اوریکاز به وسیله گلوکز

برای بررسی اثر گلوکز بر روی پایداری آنزیم اوریکاز، تأثیر آن با غلظت 20% در دمای 40 درجه سانتی‌گراد و در زمان‌های مختلف بررسی شد. نتایج نشان دهنده پایدارسازی آنزیم در حضور گلوکز است بطوری که آنزیم بعد از گذشت 60 دقیقه تا بیش از 60 درصد از فعالیت خود را حفظ نمود است. این نشان می‌دهد، نیمه عمر آنزیم از 30 دقیقه به بیش از 60 دقیقه (در حضور گلوکز) افزایش یافته است. قابل ذکر است که به دلیل خطی نبودن لگاریتم طبیعی فعالیت باقی‌مانده علیه زمان در حضور گلوکز (نتایج نشان داده نشده است)، غیر فعال شدن آنزیم از نوع درجه یک نیست. بنابراین نیمه عمر آنزیم در حضور گلوکز از روی شکل 7 تخمین زده شد.



شکل 6 تأثیر افزودنی‌های مختلف بر روی پایداری آنزیم اوریکاز



شکل 7 اثر گلوکز روی پایداری آنزیم

4- بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم اوریکاز به عنوان آنزیم دارویی در درمان هیپراوریسمی‌ها به کار می‌رود. . در حال حاضر نوع نوترکیب آنزیم اوریکاز (راسبوریکاز) در درمان هیپراوریسمی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد [10]. راسبوریکاز در سیستم بیانی *ساکارومایسس سرویزیه* تولید می‌شود. در این تحقیق از سیستم بیانی *اشریشیا کلی* استفاده شده است که در مقایسه با سیستم بیانی *ساکارومایسس سرویزیه* دارای مزایایی از جمله هزینه کمتر، زمان کمتر و چرخه‌های کوتاه‌تر برای تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد [1]. نتیجه مربوط به الکتروفورز SDS-PAGE نشان داد که آنزیم بطور کامل خالص شده است. نتایج مربوط به بررسی پایداری نشان داد که آنزیم تا دمای 20 درجه سانتی‌گراد پایداری خود را حفظ کرده و بعد از این دما پایداری آنزیم کاهش می‌یابد، بطوری که نیمه عمر آنزیم در دمای 40 درجه به 30 دقیقه می‌رسد. این بدان معنی است که آنزیم نسبت به حرارت چندان پایدار نیست. یکی از چالش‌ها در استفاده از پروتئین‌ها، پایداری کم آن‌ها است [28]. روش‌های مختلفی برای پایدارسازی آنزیم وجود دارد که از بین آن‌ها استفاده از افزودنی‌ها مزیت بیشتری دارد زیرا بدون دستکاری ساختار آنزیمی (با روش مهندسی پروتئین و یا تغییرات شیمیایی) و با هزینه پائین باعث پایدارسازی پروتئین‌ها می‌شود. تا به حال با استفاده از روش‌هایی همچون قرار دادن اوریکاز داخل نانو ژل‌ها [29] و همچنین افزودن متانول و دی متیل سولفوکساید (برای تقویت پیوندهای هیدروژنی بین زیر واحدها) [30] سعی نموده‌اند تا این آنزیم را پایدار سازند. با این حال مطالعه‌ای که در آن با استفاده از پلی-ال‌ها اوریکاز پایدار گردد، مشاهده نشده است. بنابراین در این تحقیق برای پایدارسازی آنزیم اوریکاز، سه افزودنی(پلی‌ال) گلوکز، سوربیتول و گلیسرول استفاده شد. نتایج نشان داد که گلوکز بیش از گلیسرول اثر پایدار کنندگی داشته و سوربیتول کمترین اثر پایدارکنندگی را دارد. گلوکز با افزایش کشش سطحی باعث آبپوشی ترجیحی پروتئین‌ها شده [31،16] و بنابراین باعث پایدارسازی آن‌ها می‌شود [32]. گلیسرول علاوه بر دور شدن ترجیحی از پروتئین [34،33]، از طریق جهت گیری آمفی پاتیک با نقاط آب‌گریز سطح پروتئین‌ها میانکنش داده و از میان‌کنش نقاط آب‌گریز در روی پروتئین‌ها با همدیگر و ایجاد تجمعات غیر فعال جلوگیری کرده و بدین ترتیب باعث افزایش پایداری پروتئین می‌شود [35]. سوربیتول نیز از طریق دور شدن ترجیحی از نقاط آب‌گریز سطح پروتئین‌ها باعث آبپوشی ترجیحی پروتئین‌هایی می‌شود که ساختارشان کمی باز شده و بدین ترتیب باعث متراکم شدن ساختار پروتئین و برگشت به حالت طبیعی می‌شود [20]. تحقیقات نشان داده است که اثر پایدار کنندگی افزودنی‌ها (با توجه به مکانیسم پایدار سازی‌شان) بر روی پروتئین‌ها مختلف متفاوت است. مطالعات نشان داده است گلوکز که از طریق کشش سطحی باعث پایدارسازی پروتئین‌ها می‌شود، در مورد آنزیم لیزوزیم بیشترین اثر پایدار کنندگی را دارد [16] و از طرف دیگر سوربیتول توانسته است به مقدار زیادی آنزیم تریپسین را پایدار نماید [34]. مکانیسم پایدار سازی این دو افزودنی با هم متفاوت بوده و در دو پروتئین متفاوت هر یک بهترین اثر پایدار کنندگی را داشته‌اند. با توجه به اینکه در این تحقیق گلوکز بیشترین اثر پایدار کنندگی را داشته است؛ بنابراین می‌توان گفت در مورد آنزیم اوریکاز افزایش کشش سطحی نسبت به مکانیسم‌های بکار رفته دیگر توسط افزودنی‌ها، بیشتر باعث پایدارسازی آنزیم می‌شود. بنابراین علاوه بر اینکه ماهیت شیمیایی محیط می‌تواند بر روی اثر پایدار کنندگی افزودنی‌ها موثر باشد [18, 34]، می‌توان گفت نوع پروتئین و همچنین مکانیسم بکار رفته توسط افزودنی‌ها بر روی میزان پایدارسازی پروتئین نیز می‌تواند تأثیر گذار

باشد. با این حال برای بررسی دقیق‌تر تأثیر ویژگی‌های آنزیم اوریکاز همچون ویژگی‌های سطحی آنزیم بر روی قدرت پایدارکنندگی افزودنی‌هایی نظیر گلوکز، نیاز به انجام مطالعات بیشتر همچون مطالعات شبیه سازی دینامیک مولکولی است.

نتایج تأثیر گلوکز بر روی پایداری آنزیم نشان داد که پایداری آنزیم در اثر گلوکز تا بیش از 2 برابر افزایش یافته است. با توجه به اینکه اوریکاز معمولاً بصورت مایع (تزریقی) عرضه می‌شود، بنابراین استفاده از گلوکز در فرمولاسیون آن تا بیش از دو برابر زمان ماندگاری (انبارداری) آن را افزایش می‌دهد. از طرفی چون اوریکاز بصورت تزریقی در افراد دچار هیپراوریسمی استفاده می‌شود، با توجه به اینکه گلوکز بطور طبیعی در خون وجود دارد، لذا ورود آن به همراه اوریکاز به جریان خون در طی تزریق مشکلی (همچون بروز حساسیت) ایجاد نخواهد کرد. در نهایت می‌توان گفت که در مورد آنزیم اوریکاز افزودنی‌هایی همچون گلوکز که باعث افزایش کشش سطحی می‌شوند، بیشترین اثر پایدارکنندگی را دارند. بنابراین در فرمولاسیون این آنزیم دارویی می‌توان برای پایدارسازی از آن‌ها استفاده نمود.

5- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

6- منابع

[1] Li, J., Chen, Z., Hou, L., Fan, H., Weng, S., Xu, C., E., .. (2006) High-level expression, purification, and characterization of non-tagged Aspergillus flavus urate oxidase in Escherichia coli. *Protein expression and purification* **49**, 55-59.

[2] Collings, I., Watier, Y., Giffard, M., Dagogo, S., Kahn, R., Bonneté, F., Margiolaki, I. (2010) Polymorphism of microcrystalline urate oxidase from Aspergillus flavus. **66**, 539-548.

[3] Cendron, L., Berni, R., Folli, C., Ramazzina, I., Percudani, R., Zanotti ,G. (2007) The structure of 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline decarboxylase provides insights into the mechanism of uric acid degradation. *J Biol Chem* **282**, 18182-18189.

[4] Oda , M., Satta , Y., Takenaka , O., Takahata , N. (2002) Loss of Urate Oxidase Activity in Hominoids and its Evolutionary Implications. **19**, 640–653.

[5] Atalla, Mabrouk , M., Hamed , E. R., Farag., M., M., Ahmed , N. A. (2010) Purification and Characterization of Uricase Enzyme Produced by Gliomastix gueg. **2**, 1-13.

[6] Walsh, G., (2003) Biopharmaceuticals Biochemistry and Biotechnology, pp. 547.

[7] ALY , M., TORK1, S., AL-GARNI1 , S., ALLAM , R. (2013) Production and characterization of uricase from Streptomyces exfoliatus UR10 isolated from farm wastes. *Turkish Journal of Biology*, 520-529.

[8] Aly, M., Tork, S., Al-Garni, S., Allam, R. (2013) Production and characterization of uricase from Streptomyces exfoliatus UR10 isolated from farm wastes. *Turkish Journal of Biology* **37**.

[9] Legoux, R., Delpech, B., Dumont, X., Guillemot, J. C., Ramond, P., Shire, D., & Loison, G. (1992) Cloning and expression in Escherichia coli of the gene encoding Aspergillus flavus urate oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 8565-8570.

[10] Cammalleri, L., Malaguarnera, M. (2007) Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout. *International journal of medical sciences* **4**.

[11] Gabison, L., Chiadmi, M., Colloc'h, N., Castro, B., El Hajji, M., and Prangé, T. (2006) Recapture of [S]-allantoin, the product of the two-step degradation of uric acid, by urate oxidase. *FEBS letters* **580**, 2087-2091.

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

[13] Badoei-Dalfard, A., Khajeh, K., Asghari, S. M., Ranjbar, B., Karbalaei-Heidari, H. R. (2010) Enhanced activity and stability in the

[24] Xie, G., Timasheff, S. N. (1997) Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured then for the native protein. *Protein Sci* **6**, 211-221.

[25] Tiwari, A., Bhat, R. (2006) Stabilization of yeast hexokinase A by polyol osmolytes: correlation with the physicochemical properties of aqueous solutions. *Biophys Chem* **124**, 90-99.

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

[27] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

[28] Taverna, D. M., Goldstein, R. A. (2002) Why are proteins marginally stable? *Proteins* **46**, 105-109.

[29] Liu, Z., Lu, D., Yin, L., Li, J., Cui, Y., Chen, W. (2011) Strengthening the stability of a tunnel-shaped homotetramer protein with nanogels. *J Phys Chem B* **115**, 8875-8882.

[30] Liu, Z., Lu, D., Li, J., Chen, W. (2009) Strengthening intersubunit hydrogen bonds for enhanced stability of recombinant urate oxidase from Aspergillus flavus: molecular simulations and experimental validation. *Phys Chem Chem Phys* **11**, 333-340.

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

[32] Lin, T. Y., Timasheff, S. N. (1996) On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Science* **5**, 372-381.

[33] Sathish, H. A., Kumar, P. R., Prakash, V. (2007) Mechanism of solvent induced thermal stabilization of papain. *Int J Biol Macromol* **41**, 383-390.

[34] Pazhang, M., Mehrnejad, F., Pazhang, Y., Falahati, H., Chaparzadeh, N. (2015) Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents. *Biotechnol Appl Biochem.*

[35] Vagenende, V., Yap, M. G., Trout, B. L. (2009) Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry* **48**, 11084-11096.

presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. *J Biochem* **148**, 231-238.

[14] khajeh, K., Ranjbar, B., Naderi-Manesh, H., Ebrahim Habibi, A., 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.

[15] Jegan Roy, J., Emilia Abraham, T. (2004) Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chem Rev* **104**, 3705-3722.

[16] Kumar, V., Chari, R., Sharma, V. K., 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.

[17] Lee, J. C., Timasheff, S. N. (1981) The stabilization of proteins by sucrose. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 7193-7201.

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

[19] Back, J. F., Oakenfull, D., Smith, M. B. (1979). Back, J. F., Oakenfull, D., & Smith, M. B. (1979). Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. Biochemistry, 18(23), 5191-5196. *Biochemistry* **18**, 5191-5196.

[20] Petersen, S. B., Jonson, V., Fojan, P., Wimmer, R., Pedersen, S. (2004) Sorbitol prevents the self-aggregation of unfolded lysozyme leading to and up to 13 degrees C stabilisation of the folded form. *J Biotechnol* **114**, 269-278.

[21] Wimmer, H., Olsson, M., Petersen, M. T., Hatti-Kaul, R., Peterson ,S. B., Muller, N. (1997) Towards a molecular level understanding of protein stabilization: the interaction between lysozyme and sorbitol. *J Biotechnol* **55**, 85-100.

[22] Gekko, K., Morikawa, T. (1981) Thermodynamics of polyol-induced thermal stabilization of chymotrypsinogen. *J Biochem* **90**, 51-60.

[23] Rariy, R. V., Klibanov, A. M. (1997) Correct protein folding in glycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13520-13523.