الیاف

تهیه الیاف سلولزی با فعالیت بیولوژیکی توسط تثبیت تریپسین روی الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته با پِریُدات

مترجم: مسعود هاشمی

چکیده

در این مطالعه، مادهٔ لیفیِ فعالِ بیولوژیکی، توسط تثبیت تریپسین روی الیاف ویسکوز طراحی شد. نخ ویسکوز، به منظور تولید گروه‌های آلدهید، در ابتدا با پریدات سدیم اکسیده شد و سپس به عنوان حامل یا بستر برای تثبیت تریپسین از طریق سرم آلبومین گاوی بکار گرفته شد. اکسایش با پریدات سدیم سببِ تغییراتی در خواص شیمیایی و فیزیکیِ نمونه‌های نخیِ اصلاح‌شده شد، که توسط تعیین مقدار گروه آلدهید، ظرافت و استحکام کششی نخ ارزیابی شد. الیاف ویسکوزِ اکسایش‌یافته تحت شرایط سخت (۰/٤٪ $NaIO_4$، ۳٦۰ دقیقه) بیشترین مقدار گروه‌های آلدهید (۱/۲۸٤ mmol/g) را نشان دادند، ولی در مقابل بیشترین کاهش را در استحکام کششی به نمایش گذاشتند. فعالیت تریپسین، با α-N-بنزوئیل-DL-آرجینین p-نیتروآنیلید هیدروکلرید تست شد، در حالیکه مقدار پیوند تریپسین، توسط روش برادفورد معین شد. تریپسین تثبیت‌شده روی نخ ویسکوز اکسایش‌یافته، پس از ٦۰ روز ذخیره‌سازی در ٤ و ۲۵ درجهٔ سانتیگراد، به ترتیب ۹۷/۳ و ۸۳/۸ درصدِ فعالیت اولیهٔ خود را حفظ کرد و بطور محکمی به حامل ویسکوز، متصل باقی ماند. کاربرد بالقوهٔ الیاف زیست‌فعالِ بدست‌آمده، در درمان زخم‌ها می‌باشد.

۱- مقدمه

استفاده از مواد نساجی در پزشکی دارای تاریخ طولانی می‌باشد. هرچند، علم پزشکیِ جدید نیازمندِ مواد نساجی با برخی خواص ویژه می‌باشد. در این میان، الیاف فعال بیولوژیکی یا زیست‌فعال، مهم‌ترین این مواد می‌باشند، که شامل مواد ضد میکروب، مُسکن، ضد التهاب، و خواص رقیق‌کنندهٔ خون و الیاف رادیواکتیو و غیره هستند. الیاف زیست‌فعال به منظورِ کاربردهای طبی، می‌توانند به عنوان الیافی دارای اثر ویژه تعریف شوند، که به آنها اجازه می‌دهد که به عنوان عوامل درمانی و پیشگیری‌کننده استفاده شوند. این قبیل اثرات می‌توانند توسط افزودن بسترها یا مواد فعال بیولوژیکی به الیاف بدست آیند. یک روش مؤثر به منظور تولید الیاف زیست‌فعال، اصلاح شیمیایی الیاف بوسیلهٔ آماده‌سازی‌هایی با فعالیت بیولوژیکی می‌باشد.

تولید الیاف با آنزیم‌های تثبیت‌شده، یک روش امیدوارکننده در ایجاد الیاف زیست‌فعال می‌باشد. تثبیت می‌تواند برخی محدودیت‌های مربوط به استفاده از آنزیمها را توسط پایدارتر کردن، ایمنی‌زایی و سمزایی کمتر، و طولانی‌تر کردنِ زمان جریان یا گردش در محیط زنده، برطرف کند. الیافِ آنزیم فعال می‌توانند با استفاده از یکی از روشهای ذیل بدست آیند: افزودن آنزیمها به محلول ریسندگی، واردکردن آنزیمها درون الیاف توخالی یا تثبیت آنزیم‌ها در الیاف توسط پیوندهای شیمیایی. استفاده از الیاف آماده به عنوان حامل برای تثبیت آنزیم، مزایای دو روش اول را شامل می‌شود و همچنین، وسعتِ پلیمرهایی را که می‌توانند به عنوان حامل‌ها استفاده شوند و شیوه‌های تثبیت را توسعه می‌دهد.

این امر معروف است که خواص فیزیکی و شیمیایی، فعالیت و پایداری آنزیم، بستگی به هم روش تثبیت و هم نوع ماتریس پلیمری دارد. انواع وسیعی از روش‌ها و حامل‌ها می‌تواند برای تثبیت آنزیم استفاده شود و انتخاب، بستگی به طبیعت آنزیم، طبیعت بستر، و کاربرد نهایی دارد.

پروتئازها نوعی از آنزیم‌ها هستند که بطور وسیعی در جراحی، به خصوص به منظور درمان زخم استفاده می‌شوند. هرچند، استفاده از پروتئازهای طبیعی برای درمان زخم، به دلیل عدم فعالیت سریع آنها بواسطهٔ بازدارنده‌ها، خواص پادتن‌زایی، گرمازایی و آلرژی‌زایی و ناپایداری در محلول‌های آبی و غیره محدود می‌باشد. کاربرد آنزیم‌های تثبیت‌شده در برابر آنزیم‌های پروتئین‌کافت، دارای مزایایی از قبیل کاهش واکنش‌های آلرژی‌زا، افزایش بازده درمانی، و کاهش مصرف پروتئاز می‌باشد. تریپسین یکی از آنزیم‌های پروتئین‌کافتیِ مهم می‌باشد که به منظور حذف یا زدودن بافت‌های مرده از زخم و سوختگی‌ها استفاده می‌شود. تریپسین می‌تواند همچنین رشد بافت‌های جدید و پیوندهای پوستی را سرعت بخشد و از رشد برخی میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کند.

در عمل، تثبیت تریپسین می‌تواند توسط روشهای گوناگون، مثل جذب، حبس، و پیوند کووالانسی حاصل شود. در مقایسه با دیگر تکنیک‌های تثبیت، تثبیت کووالانسی معمولاً سبب ایجاد اتصالات قوی‌تر، و بنابراین کمپلکس‌های حامل–آنزیم بسیار پایداری می‌شود. یکی از بیشترین واکنش‌های مورد استفاده برای تثبیت تریپسین، سر و کار با گروه فعالِ باقیمانده‌های لیزین (گروه ε-آمینو) دارد. تریپسین حاویِ ۱۴ باقیماندهٔ لیزین می‌باشد و از آنجایی که هیچکدام از این گروه‌های ε-آمینویِ باقیمانده‌های لیزین برای فعالیت کاتالیستیِ تریپسین ضروری نیستند، می‌توانند برای پیونددهی به حامل‌ها از طریق تشکیل باز شیف (Schiff base) استفاده شوند. پیوند کووالانسیِ آنزیم می‌تواند توسط واکنش با گروه‌های فعّال روی سطح حامل یا از طریق فاصله‌دهنده‌ها یا پرکننده‌های مختلف حاصل شود. واردسازی یا معرفی یک فاصله‌دهندهٔ مناسب بین آنزیم و حامل، اغلب عملکرد آنزیم تثبیتی را، مثل پایداری آنزیم و فعالیت حفظ‌شده، بهبود می‌بخشد.

حامل‌های گوناگونی برای تثبیت تریپسین استفاده شده بود و انتخاب حامل به مقدار زیادی بستگی به کاربرد نهایی محصول دارد. پشتیان‌ها یا حامل‌هایی که معمولاً در تثبیت پروتئازها (برای اهداف درمانی) استفاده می‌شوند، حامل‌های پلیمری هستند که غالباً بر پایهٔ مواد سلولزی هستند.

الیاف سلولزی می‌توانند توسط انواع مواد یا عامل‌ها برای تولید مراکز فعّال برای پیوند کووالانسی آنزیمها، فعال شوند. شیوه‌های مناسب برای فعال‌سازی سلولز به منظور تثبیت تریپسین می‌توانند شیوه‌هایی باشند که گروه‌های فعّال را ایجاد می‌کنند. از میان این روش‌ها، سودمندترین آنها روش‌های اکسایش می‌باشند، به خصوص آنهایی که از عامل‌های اکسیدکنندهٔ بسیار گزینشی استفاده می‌کنند.

تبدیل گروه‌های دی‌هیدروکسیل به دی‌آلدهید توسط اکسایش پریُدات، یکی از روش‌هایی است که بطور وسیعی در اصلاح سلولز استفاده می‌شود. سلولز بدست‌آمده از منابع مختلف، در گذشته تحتِ اکسایش با پریُدات قرار گرفته بود. مثال‌ها شاملِ لینترهای پنبه، سلولز میکرو بلوری، پودر سلولز بدست‌آمده از پنبه و پالپ چوب جنگلی، سلولز بلوری مشتق‌شده از جلبک می‌باشند. مزایای مهم اکسایش با پریدات، ماهیت بسیار انتخابی و آسانی کاربرد هستند. سلولز دی‌آلدهید، به عنوان یک پشتیبان یا حاملِ زیست‌سازگار و زیست‌تجزیه‌پذیرِ مناسب برای تثبیت و رهایش کنترل‌شدهٔ داروها و هرمون‌ها معرفی شده است و قبلاً بطور موفقیت‌آمیزی برای اتصال با انسولین و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و تتراسایکلین مورد استفاده قرار گرفته بود.

در مطالعهٔ قبلی ما، نخ پنبه توسط پریُدات اکسیده شده بود و به عنوان حامل برای تثبیت مستقیم تریپسین مورد استفاده قرار گرفته بود. چنان که مشهور است، از آنجایی که الیاف ویسکوز رطوبت‌گیرتر و تمیزتر از الیاف پنبه هستند و الیافی مصنوعی می‌باشند، و دارای خواص و ساختارهای همگن‌تری نسبت به پنبه می‌باشند، برای بسیاری از کاربردها به خصوص در زمینهٔ منسوجات پزشکی و سلامت، می‌توانند جایگزینِ پنبه شوند. از آنجایی که طبق دانش نویسندگان، کمبود مطالعاتی مفصل در مورد اثر اکسایش پریُدات روی الیاف ویسکوز و کاربرد آنها به عنوان حامل برای تثبیت آنزیم احساس می‌شد، ما الیاف ویسکوز را برای بررسی امکان دستیابی به الیاف سلولز دی‌آلدهید با تریپسین تثبیت‌شده، و همچنین برای دستیابی به اطلاعاتی دربارهٔ اثر اکسایش پریُدات روی خواص الیاف سلولزی مصنوعی، انتخاب کردیم. الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته تحت شرایط مختلف، بر حسب مقدار آلدهید، کاهش وزن، ظرافت و استحکام کششی نخ آنالیز و بررسی شدند. به منظور کسب یک حامل مناسب برای تثبیت تریپسین، الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته سپس با سرم آلبومین گاوی (BSA) و گلوتارآلدهید اصلاح شدند. پروتئین BSA، به منظور افزایش میزان اتصال آنزیم و تثبیت تریپسین در ساختار فعّال اضافه شد. داده‌های ما نشان دادند که تثبیت تریپسین روی الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته توسط روش غیرمستقیم، بطور قابل‌توجهی پایداری ذخیره یا انبارسازیِ آن را، مخصوصاً در دمای اتاق افزایش داد، که برای کاربردهای آینده مهم می‌باشد.

۲- تجربیات

۲-۱- مواد:

مواد لیفی مورد استفاده در کل این پژوهش، نخ ویسکوز (ظرافت اسمی: ۱۰ تکس) بدست آمده از کمپانی Ites Rilon-Lorison (صربستان) بود. پریُدات سدیم از شرکت فلوکا (سوئیس) تهیه شد. سرم آلبومین گاوی (BSA) از HiMedia (هند) و محلول گلوتارآلدهید (۲۵ درصد) از کمپانی مرک آلمان تهیه شدند. تریپسین از لوزالمعدهٔ گاو (EC 3.4.21.4) در حالت پودری و N–α–بنزوئیل–DL–آرجینین p–نیتروآنیلید هیدروکلرید (BAPNA) از کمپانی سیگما (آمریکا) تهیه شدند. دیگر مواد شیمیایی در خلوص آزمایشگاهی بودند.

۲-۲- اکسایشِ پریُدات نخ ویسکوز:

نمونه‌های نخ ویسکوز (۸ گرم) در محلول پریدات سدیم در بافر استیک ۰/۱ مولار (۴۰۰ میلی‌لیتر)، PH = ۴، در غلظت‌های ۲ mg/ml و ۴ mg/ml، یعنی ۰/۲ و ۰/۴ درصد وزنی/حجمی، غوطه‌ور شدند. مخلوط سپس در تاریکی در دمای اتاق به مدت ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰، ۳۰۰ و ۳۶۰ دقیقه هم زده شد. بعد از اتمام اکسایش، نخ بطور کامل با آب مقطر فوق‌العاده سرد روی یک کاغذ صافیِ قرار گرفته روی قیف بوخنر شسته شد. نمونه‌های ویسکوز اکسایش‌یافته، بدون خشک‌شدن، برای تثبیت تریپسین مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۳- تعیین خواص فیزیکی-شیمیایی نخ‌های ویسکوز اکسایش‌یافته:

۲-۳-۱- تعیین کاهش وزن:

کاهش وزن نمونه‌های نخ ویسکوز اکسایش‌یافته، به عنوان نتیجهٔ عملیات شیمیایی، توسط بکارگیری روش وزن‌سنجیِ مستقیم تعیین شد.

۲-۳-۲- تعیین میزان گروه آلدهید:

میزان آلدهید موجود در ویسکوز اکسایش‌یافته، طبقِ روش شرح‌داده شده در مقالات قبلی اندازه‌گیری شد. گروه‌های آلدهید، با کلریت سدیم در PH = ۴-۵ در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت، بطور انتخابی به گروه‌های کربوکسیل اکسیده شدند و مقدار گروه کربوکسیل توسط روش اصلاح‌شدهٔ کلسیم-استات تعیین شد. قبل از تیتراسیون، همهٔ نمونه‌های ویسکوز توسط سوسپانسیون یا تعلیق در ۰/۰۱ HCl مولار به مدت ۱ ساعت و سپس شستشو با آب مقطر، بواسطهٔ تبادل یونی به فُرم اسید در آمدند. مقدار گروه آلدهید توسط تفریق مقدار گروه کربوکسیلِ تعیین‌شده در نمونهٔ ویسکوز ابتدایی از نمونه‌های اکسایش‌یافته با کلریت محاسبه شد.

۲-۳-۳- اندازه‌گیری استحکام کششی:

نخ‌های ویسکوز توسط دستگاه تست کششی Tex Test ساخت سوئیس، با گیره‌های فاصله‌دار در ۱۰۰ میلی‌متر و با نرخ کرنشِ (نرخ گیرهٔ پایینی) ۱۵۰ میلیمتر بر دقیقه، طبقِ شیوهٔ معمولِ شرح‌داده شده در مقالات، تست شدند. استحکام کششی نخ بصورت مقدار میانگینِ ۴۰ اندازه‌گیری محاسبه شد.

۲-٤- تثبیت تریپسین روی نخ ویسکوز اکسایش‌یافته:

به منظور تثبیت کووالانسی تریپسین روی نخ ویسکوز توسط شیوهٔ غیرمستقیم، نخ اکسیده‌شدهٔ ویسکوز با فاصله‌دهندهٔ BSA اصلاح شد و سپس گلوتارآلدهید، برای ایجادِ اتصال‌دهندهٔ دوعاملی برای جفت‌کردن یا اتصالِ تریپسین به فاصله‌دهندهٔ BSA، مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌های ویسکوز اکسایش‌یافتهٔ حاصل (۰/۱ گرم وزن خشک) با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول BSA (۰/۸ mg/ml) در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار، PH = ۷، در دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از دورهٔ کمون یا قرارگیری در انکوباتور، پروتئینِ اتصال‌نیافته، توسط شستشو با محلولِ فیزیولوژیکی (۹ مرتبه) و ۰/۱ مولار بافر فسفات سدیم، PH = ۷ (۱ مرتبه)، زدوده شد. نخ ویسکوز بدست‌آمده با BSA تثبیت‌شده، تا زمان استفاده، در همان بافر نگهداری شد.

به منظور فعالسازیِ BSA برای تثبیت تریپسین، نخ ویسکوز-BSA (۰/۱ گرم وزن خشک) با ۴ میلی‌لیتر گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد (حجمی/حجمی) در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (PH = ۷) در ۲۵ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۲ ساعت در انکوباتر قرار گرفت. گلوتارآلدهید اضافی، با آب مقطر و به دنبال آن توسط بافر ۰/۱ مولارِ M Tris-HCl (PH = ۹/۲) حاویِ $CaCl_2$ ۰/۱ مولار، شسته شد. سپس نخ ویسکوز-BSA فعال‌شده (۰/۱ گرم وزن خشک) با محلول تریپسین (۲/۵ میلی‌لیتر) به مدت ۱۸ ساعت در ۴ درجهٔ سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفت. محلول تریپسین (mg/ml ۰/۸) توسط حل‌کردن آنزیم در بافر ۰/۱ مولارِ M Tris-HCl (PH = ۹/۲) حاویِ $CaCl_2$ ۰/۱ مولار، تهیه شده بود. پس از تثبیت، نخ با محلول فیزیولوژیکی (۹ مرتبه) به منظور زدودن تریپسین پیوندنداده شستشو داده شد و سپس در همان محلول ذخیره شد. مایع رویی یا شناورِ هر شستشو برای اندازه‌گیری‌های پروتئین جمع‌آوری شد. همهٔ تست‌های تثبیت در دو نسخه انجام شدند.

۲-۵- بررسی تریپسین آزاد و تثبیت‌شده:

۲-۵-۱- سنجش فعالیت تریپسین:

فعالیت تریپسین در محلول و در حالت تثبیت‌شده، توسط روش برپایهٔ نرخ اولیهٔ هیدرولیز بسترِ BAPNA، بررسی شد. یک واحد از فعالیت، به صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای رهایشِ ۱ میکرومول p-nitroaniline در هر دقیقه با استفاده از ضریب جذب مولیِ p-nitroaniline در ۴۱۰ نانومتر ($۸۸۰۰ M^{-1} cm^{-1}$) تعریف می‌شود.

واکنش‌ها در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار، در PH = ۷ و ۳۷ درجهٔ سانتیگراد، شرایط تقریباً فیزیولوژیکی بدن انسان، انجام شدند. مخلوط واکنش، حاویِ ۳ مول بافر فسفاتِ ۰/۱ مولار (PH = ۷)، ۱۵ میکرولیتر BAPNA ۰/۱ مولار آماده‌شده در DMSO و مقدار مناسبی از تریپسین، یعنی ۵۰ میکرولیتر محلول تریپسین (mg/ml ۰/۸)، و ۵ میلی‌گرم وزن خشک نخ ویسکوز اصلاح‌شده، به ترتیب برای سنجش فعالیت محلول تریپسین و تریسین تثبیتی، بود. در فواصل زمانی معین، با استفاده از اسپکتوفتومتر UV-VIS (Pye Unicam SP6-550)، p-nitroaniline رهاشده در ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر تکراری معین شدند و مقدار میانگین محاسبه شد.

۲-۵-۲- پایداری تریپسین آزاد و تثبیتی در حین ذخیره‌سازی:

پایداری تریپسین آزاد و تثبیتی در ۴ و ۲۵ درجهٔ سانتیگراد پس از ۶۰ روز ذخیره‌سازی تعیین شد. نمونه‌های نخ ویسکوز با تریپسین تثبیتی، که در محلول فیزیولوژیکی ذخیره شده بودند و محلول تریپسین (mg/ml ۰/۸) در بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار، PH = ۷، به مدت ۶۰ روز در ۴ و ۲۵ درجهٔ سانتیگراد نگه‌داری شدند. فعالیت‌های تریپسین آزاد و تثبیت‌شده، در فواصل معین، بصورتی که در بالا ذکر شد سنجیده شدند و به ترتیب نسبت به فعالیت اولیهٔ نمونهٔ بلافاصله بعد از تثبیت و همچنین محلول تریپسین تازه تهیه‌شده، بیان شدند.

به منظور مطالعهٔ نشت یا تراوش تریپسین از حامل، ۳ نمونهٔ نخ ویسکوز با تریپسین تثبیتی، در ۵ میلی‌لیتر محلول فیزیولوژیکی ذخیره شدند. بعد از ۶۰ روز غلظت پروتئین در محلول بصورتی که در بالا ذکر شد، معین شد.

۲-٦- طیف‌سنجی FTIR:

طیف‌های FTIR مربوط به لیف ویسکوز قبل و بعد از اکسایش، الیاف ویسکوز اصلاحی با BSA، گلوتارآلدهید و بعد از تثبیت تریپسین با استفاده از طیف‌سنج

Bomem Hartmann & Braun، با جمع‌آوری ۴۰ پویش و تفکیک $4\ cm^{-1}$ ثبت شدند. نمونه‌ها در قرص‌های KBr تهیه شدند.

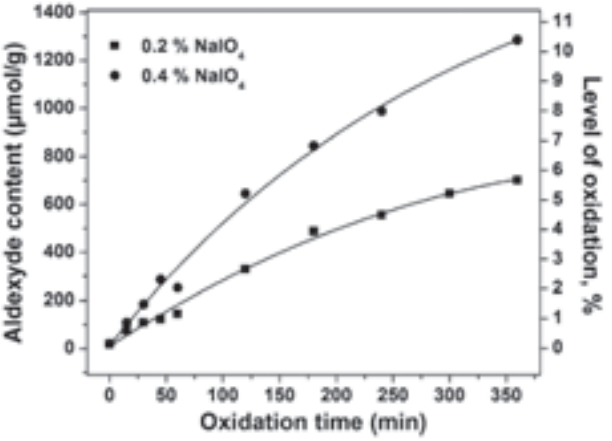
۲-۷- آنالیز SEM:

خواص مورفولوژیکی الیاف ویسکوز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشیِ HEOL JSM-5300 ارزیابی شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اثر اکسایش روی خواص فیزیکی-شیمیایی نخ ویسکوز:

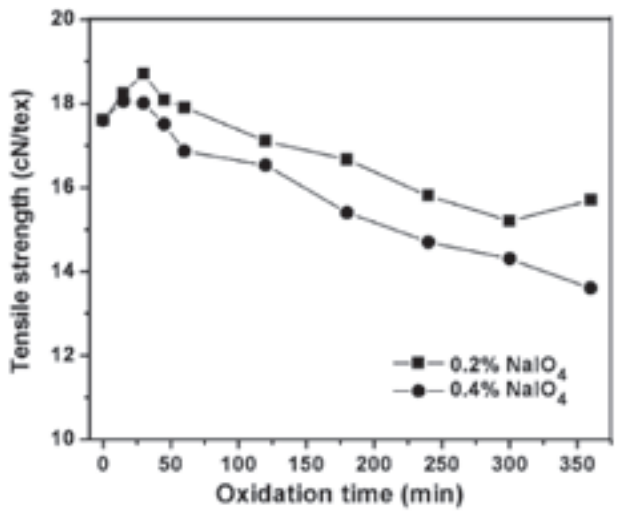
مرحلهٔ اول در مطالعهٔ ما اکسایش پریداتِ نخ ویسکوز بود، که سبب گسیختگیِ حلقهٔ گلوکوپیرانوز و تشکیل دی‌آلدهید در واحدهای منومری سلولز شد. اکسایش نخ ویسکوز توسط تغییر غلظت محلول پریُدات سدیم و زمان واکنش انجام شد. اثر شرایط اکسایش پریُدات روی میزان گروه آلدهید، یعنی سطح اکسایش الیاف ویسکوز (با فرض وجود دو C=O در هر شکر اکسایش‌یافته)، در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان گروه آلدهید در ویسکوز اصلاح‌نشده، ۱۸/۴ میکرومول بر گرم سلولز بود. به عنوان نتیجهٔ اکسایش پریُدات، الیاف ویسکوز، افزایش در مقدار گروه آلدهید را با افزایش زمان اکسایش و غلظت اکساینده، به میزانِ ۷۰۱/۲ میکرومول بر گرم برای ۰/۲ درصد $NaIO_4$ و به میزانِ ۱۲۸۴ میکرومول بر گرم برای ۰/۴ درصد $NaIO_4$، مطابق با ۵/۶۸ و ۱۰/۴۰ درصدِ واحدهای اکسایش‌یافتهٔ گلوکز، نشان دادند. این مقادیر در مقایسه با مقدار گروه CHO در ویسکوز اصلاح‌نشده، به ترتیب ۳۸ و ۷۰ برابر بیشتر هستند. مقدار بیشینهٔ گروه آلدهید واردشده در الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته تحت شرایط شدید، در مقایسه با مقدار گروه آلدهید در الیاف پنبهٔ (۹۹/۲ میکرومول بر گرم) اکسایش‌یافته در شرایط یکسان، حدود ۱۳ درصد بیشتر می‌باشد. از این نتایج، این امر آشکار می‌شود که الیاف ویسکوز نسبت به اکسایش پریُدات، بسیار فعالتر از الیاف پنبه هستند. این امر بیشتر به دلیل شاخص بلوریت کمتر و ساختار کمپلکس ظریف و میکروی الیاف ویسکوز و همچنین در دسترس‌بودنِ بیشتر ساختار بلوری سلولز II نسبت به ساختار سلولز I می‌باشد.



شکل ۱- میزان یا حجم گروه آلدهید و سطح اکسایش الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته تحت شرایط مختلف.

علاوه بر تبدیل گروه‌های هیدروکسیل ثانویهٔ سلولز به گروه‌های آلدهید، بطور کلّی بعد از عملیات پریدات، کاهش وزن رخ می‌دهد. این امر، نتیجهٔ تخریب جزئی سلولز می‌باشد، یعنی گسستگی زنجیر سلولز، نه بواسطهٔ اکسایش به تنهایی، بلکه ناشی از واکنش بعدی یا ثانویه می‌باشد. تشکیل قطعات محلول حاصله از تخریب سلولز، توسط اندازه‌گیری کاهش وزنِ نمونه‌های نخ ویسکوز اکسایش‌یافته مشخص شد. افزایش زمان اکسایش و غلظت پریُدات، هیچ تأثیر قابل‌توجهی بر روی کاهش وزن نداشت. همهٔ نمونه‌های ویسکوز کاهش در وزنی در محدودهٔ ۴/۴۷ تا ۵/۰۴ درصد از خود نشان دادند، که اندکی بیشتر از مقادیر کاهش وزنِ بدست‌آمده برای نمونه‌های پنبهٔ اکسایش‌یافته با پریُدات (۲/۰۳-۲/۵۶ درصد) بود و هنگامی که با مقادیر کاهش وزن محاسبه‌شده برای الیاف لایوسل اکسایش‌یافته با KIO_4 تحت شرایط یکسان (حدود ۲۱ درصد) مقایسه شد، بطور قابل‌ملاحظه‌ای کمتر بود. طبق نتایج ارائه‌شده، پریُدات سدیم در شرایط بکاررفته در آزمایش، آسیب کمی به سلولز می‌زند.

تغییرات ایجادشده در ساختار مولکولی و فوق‌مولکولیِ سلولز توسط عملیات پریُدات، تأثیر قابل‌توجهی روی خواص فیزیکی و مکانیکی نخ اکسایش‌یافته، مثل ظرافت و استحکام کششی داشت، که از دیدگاه کاربردهای عملی مهم هستند. کاهش وزنِ نخهای ویسکوز اکسایش‌یافته، بدون هیچگونه جمع‌شدگی قابل ملاحظه در نخ در حین اصلاح پریُدات، مسئول تغییرات در ظرافت نخ اکسایش‌یافته می‌باشد. نمونه‌های ویسکوز اکسیده‌شده، افزایش ظرافتی در حدود ۶/۲ درصد (اطلاعات نشان داده نشده است) از خود نشان دادند. این نتایج، معکوس اطلاعات بدست‌آمده توسط پرینچی (Princi) و همکارانش، که مشاهده کردند اکسایش پریُدات سببِ جمع‌شدگی نخ‌های پنبه و کتان می‌شد، بود. هرچند، آنها با غلظت‌های پریُدات بیشتر از ۱۰ برابر بالاتر کار کردند و فواصل زمانی آنها بسیار بیشتر از مطالعهٔ ما بود. شکل ۲ اثر زمان اکسایش و غلظت پریُدات سدیم را روی استحکام کششی نخ‌های ویسکوز اکسایش‌یافته نشان می‌دهد. از نتایج بدست‌آمده، می‌توان مشاهده کرد که استحکام کششی نمونه‌های اصلاحی در مرحلهٔ ابتدایی اکسایش (تا حدود ۱ درصدِ واحدهای گلوکز اکسایش‌یافته)، افزایش می‌یابد. به این ترتیب که، نخ‌های



شکل ۲- اثر ظرایط اکسایش روی استحکام کششی نخ‌های ویسکوز اکسایش‌یافته.

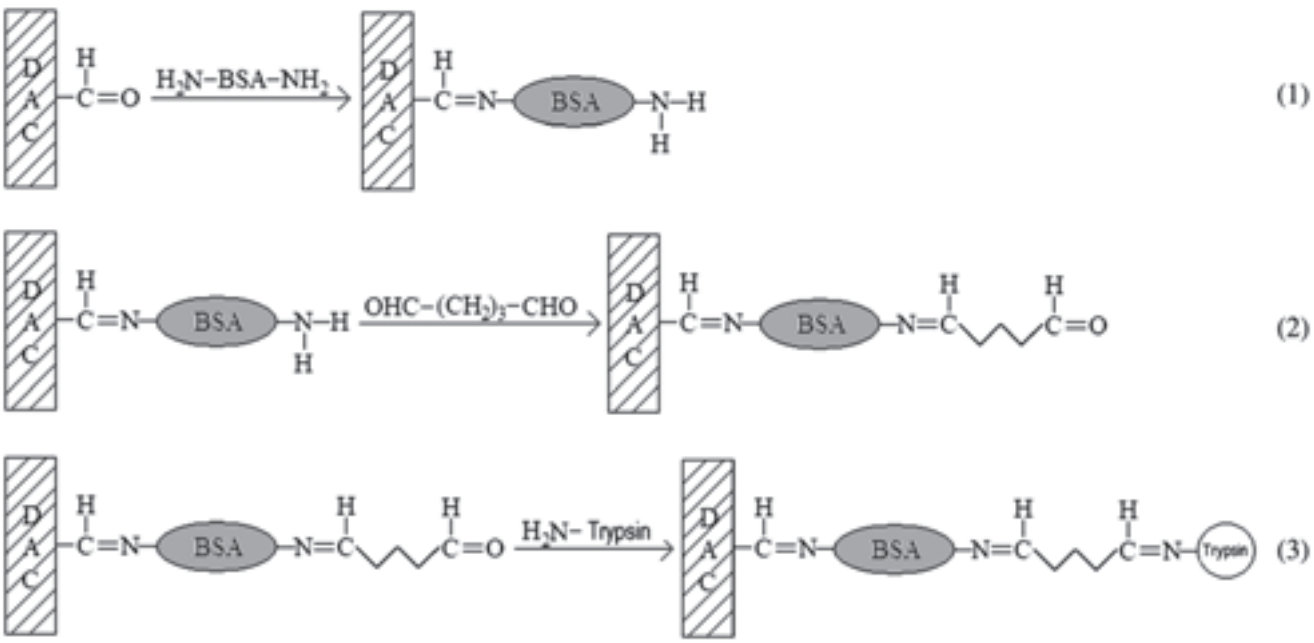
ویسکوز اکسایش‌یافته با ۰/۲ درصد $NaIO_4$ در طول فواصل زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه، و همچنین نخهای ویسکوز اکسایش‌یافته با ۰/۴ درصد $NaIO_4$ در طول فواصل زمانی ۱۵ و ۳۰ دقیقه، مقادیر استحکام کششی بالاتری نسبت به نخ ویسکوز اصلاح‌نشده نشان دادند. نتایج بدست‌آمده را می‌توان بوسیلهٔ حضور اتصالات همی‌استال تشکیل‌شده بین زنجیرهای سلولزی مجاور که منجر به افزایش در استحکام کششی نخ می‌شود، توضیح داد. افزایش در ظرافت نخ نیز، مسئول افزایش در استحکام کششی نخهای ویسکوز اکسایش‌یافتهٔ ذکرشده در بالا می‌باشد. مقادیر استحکام کششی دیگر نمونه‌های اکسایش‌یافته در مقایسه با نخ ویسکوز اصلاح‌نشده کمتر هستند؛ اینها اساساً نمونه‌هایی هستند که در زمانهای واکنش طولانی‌تر اصلاح شدند. کاهش مشاهده‌شده در استحکام کششی را می‌توان توسط فرایندهای اکسایشی–تخریبی توضیح داد که منجر به کاهش در درجهٔ پلیمریزاسیون و وزن مولکولی می‌شود. بیشترین کاهش در استحکام کششی برای نمونهٔ ویسکوز اکسایش‌یافته تحتِ سخت‌ترین شرایط (۰/۴ درصد $NaIO_4$، ۳۶۰ دقیقه) تعیین شد. نتایج بدست‌آمده را می‌توان توسط این امر توضیح داد که اکسایش بواسطهٔ پریُدات سدیم، تا حدی ساختار بلوری سلولز را می‌شکند و زمان واکنش طولانی، خواص مکانیکی نخ ویسکوز اکسایش‌یافته را ضعیف می‌کند.

۳-۲- تثبیت تریپسین روی نخ ویسکوز اکسایش‌یافته

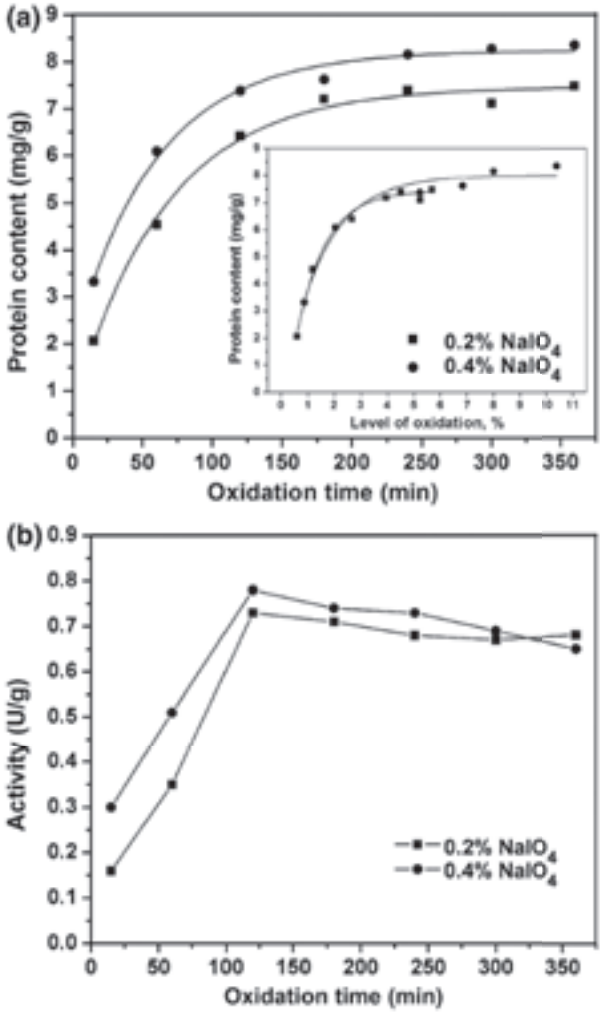
الیاف ویسکوز دی‌آلدهید حاصل با مقادیر متفاوت گروه آلدهید به عنوان حامل برای تثبیت تریپسین استفاده شدند. گروه‌های آلدهید روی الیاف سلولزی اکسایش‌یافته با پریُدات، قادر به واکنش با گروه‌های آمین پروتئین‌ها برای تشکیل باز شیف مربوطه (Schiff base) هستند. به دلیل تعداد بالای گروه‌های آمینو و موقعیت آنها روی سطح مولکول تریپسین، امکان اتصال چندنقطه‌ای بین آنزیم و اُکسی‌سلولز وجود دارد.

شیوهٔ مستقیم تثبیت تریپسین روی نخ ویسکوز اکسایش‌یافته، که در ابتدا در این مطالعه بکار رفت، باعث ایجاد نخی با مقدار متوسطِ آنزیم‌های متصل و فعالیت تثبیتی خیلی کم (کمتر از ۱ درصد فعالیت کل اولیهٔ تریپسین در محلول قبل از تثبیت) شد. میزان پروتئین نسبتاً کم در لیف ویسکوز اصلاح‌شده، می‌تواند مربوط به اختلاف در مکان واکنش اکسایش و تشکیل باز شیف در لیف سلولز بشد. یون‌های پریُدات کوچک که قادر هستند ابتدا به قسمت آمورف و سپس مناطق بلوری سلولز وارد شوند، باعث تشکیل مقادیر زیاد گروه‌های آلدهید در داخل لیف می‌شوند، که برای مولکول‌های بزرگ مثل تریپسین غیر قابل دسترس هستند. علاوه بر این، بخشی از گروه‌های آلدهید شاید پیوندهای همی‌استال یا همی‌آلدال تشکیل دهند. به دلیل مقادیر زیاد گروه‌های آلدهید ایجادشده در الیاف ویسکوز توسط اکسایش پریُدات، یا به عبارتی تراکم زیاد مکان‌های اتصال، این امکان وجود دارد که تعداد قابل‌توجهی از گروه‌های آلدهید ویسکوز اکسایش‌یافته در تثبیت یک مولکول آنزیم سهیم شوند.

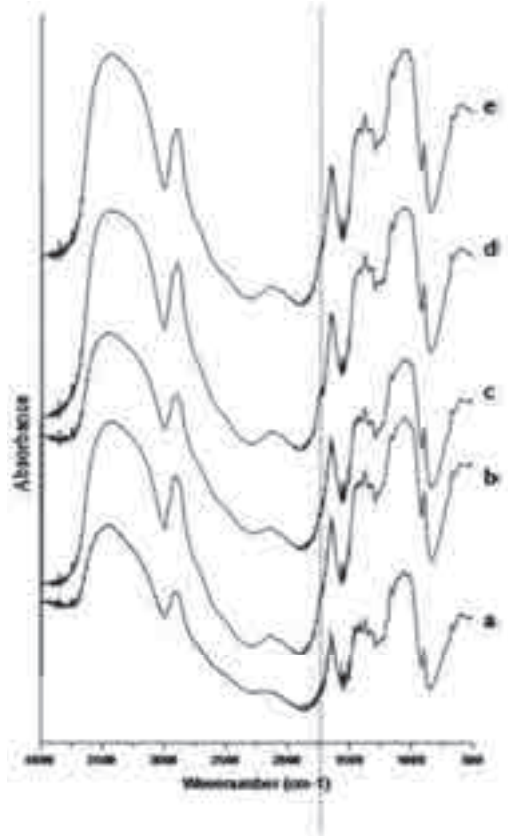
توضیح محتمل برای فعالیت بشدت کم حاصل‌شده برای تریپسینِ اتصال‌یافته بطور مستقیم، این می‌باشد که اغلب مولکول‌های تریپسین در حین تثبیت حالت غیرفعال (تغییر ماهیت) به خود می‌گیرند که اصولاً به دلیل پیوندهای بسیار زیاد با حامل می–باشد. گذشته از آن، وجود گروه‌های بی‌اثر یا خنثی روی سطح الیاف ویسکوز، که از مواد شیمیایی مورد استفاده در حین فرایندهای تکمیل سرچشمه می‌گیرند، ممکن است به کاهش فعالیت کمک کنند. این گروه‌ها در پیونددهی شرکت نمی‌کنند، اما ممکن است اثرات عمیقی روی کاراییِ آنزیم تثبیتی، مثل



شکل ۳- نمای کلّی شیوهٔ غیرمستقیم تثبیت تریپسین روی نخ ویسکوز اکسایش‌یافته:
(۱) پیوند سرم آلبومین گاوی (BSA) به سلولز دی‌آلدهید (DAC)؛ (۲) ورود گلوتارآلدهید؛ (۳) تثبیت تریپسین.



شکل ۵- (a) اثر شرایط اکسایش و سطح اکسایش (شکل الحاقی در قسمت a) روی میزان یا حجم پروتئین و (b) اثر شرایط اکسایش روی فعالیت تریپسین تثبیتی.

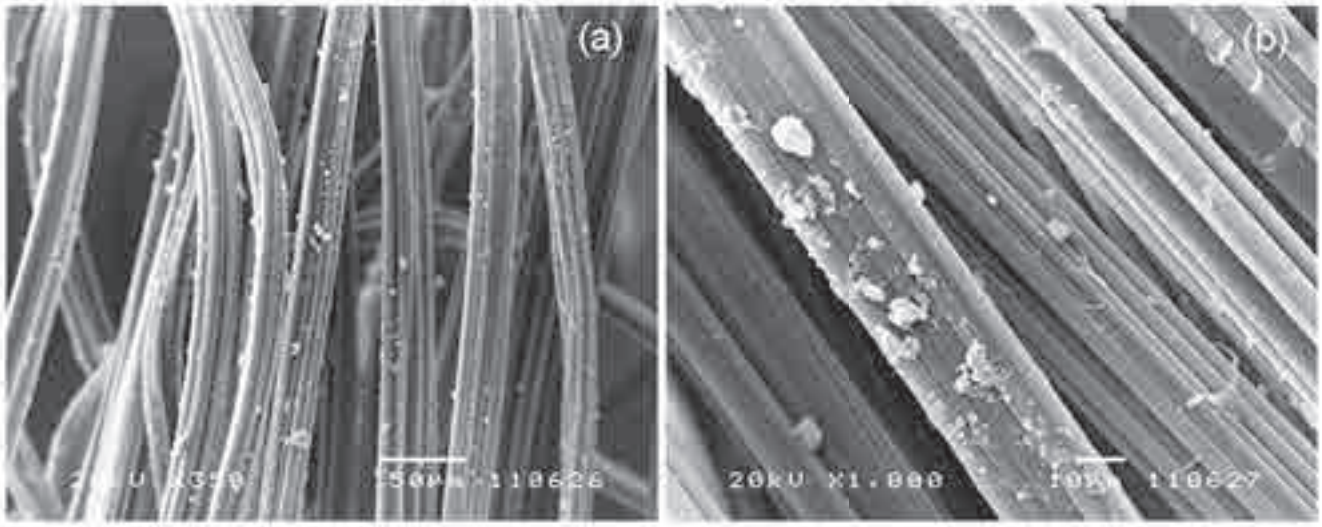


شکل ٤- طیف‌های FTIR مربوط به نخ ویسکوز قرارگرفته تحت عملیات‌های مختلف: (a) ویسکوز مرجع؛ (b) اکسایش‌یافته با پریُدات (٠/٤ درصد، ٣٦٠ دقیقه)؛ (c) ویسکوز-BSA؛ (d) ویسکوز-BSA فعال‌شده با گلوتارآلدهید؛ (e) نمونهٔ d بعد از تثبیت تریپسین.

حفظ فعالیت، بازدهٔ پیونددهی، پایداری و انتخاب‌پذیری داشته باشند. هنگامی که کاهش فعالیت تریپسین تثبیتی بطور مستقیم را روی الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته در نظر می‌گیریم، احتمال ورود آنزیم در ساختار میکرو متخلخل الیاف را به دلیل وجود منافذ (۵-۲۵ نانومتر) و شکاف‌های ناشی از اکسایش، نیز بایستی در نظر بگیریم. پیونددهی بیشتر مولکول‌های تریپسین با گروه‌های آلدهید روی سطح و در مجاورت منافذ و شکاف‌ها منجر به بلوکه-شدن مولکول‌های آنزیم در درون آنها به دلیل غیرقابل دسترس‌بودنِ بستر یا زمینه خواهد شد.

با درنظر گرفتنِ نتایج مذکور، ما شیوهٔ غیر مستقیمِ تثبیت تریپسین را از طریق BSA به عنوان فاصله‌دهنده و گلوتارآلدهید به عنوان پیونددهنده بکار بردیم. پروتئین BSA به منظور افزایش مقدار اتصال آنزیم و برای تثبیت تریپسین در ساختار فعال آن معرفی شد. شکل ۳ این شیوهٔ تثبیت را نمایش می‌دهد. نخ ویسکوزِ از قبل اکسایش‌یافته با پریُدات سدیم، با فاصله‌دهندهٔ BSA اصلاح شد و سپس گلوتارآلدهید برای فعالسازی فاصله‌دهنده جهتِ تثبیت تریپسین مورد استفاده قرار گرفت.

نخ ویسکوز و همهٔ محصولاتِ واکنش، از لحاظ کیفی توسط طیف‌سنجیِ FTIR تجزیه و تحلیل شدند؛ خلاصهٔ طیف‌ها در شکل ۴ ارائه شده‌اند. از طیف الیاف ویسکوز طبیعی (شکل a.۴)، باند پهنی در $3450\ cm^{-1}$ (هیدروژن پیوندی با O-H کششی)، باندهایی در $2900\ cm^{-1}$ (C-H کششیِ گروه CH_2)، $1654\ cm^{-1}$ (ارتعاش خمشیِ OH آب)، $1423\ cm^{-1}$ (ارتعاش خمشیِ متقارن CH_2)، $1374\ cm^{-1}$ (ارتعاش خمشی C-H)، $1161\ cm^{-1}$ (ارتعاش کششی نامتقارنِ پل C-O-C)، $1067\ cm^{-1}$ و 1024 (ارتعاش‌های اسکلتی مرتبط با کشش C-O) و همچنین باندی در $895\ cm^{-1}$ که می‌تواند مربوط به حلقهٔ گلوکزی در ساختار سلولز باشد را می‌توان برداشت کرد. در طیف ویسکوز اکسایش‌یافته (شکل b.۴)، باند جذبی مشخصهٔ سلولز دی‌آلدهید بصورت یک شانه یا برآمدگی کوچک در $1734\ cm^{-1}$ به دلیل ارتعاش کششی گروه آلدهید ظاهر شد. بعد از عملیات با BSA، پیک مشخصهٔ آلدهید ناپدید شد (شکل c.۴)، که دلالت بر این دارد که واکنش بین گروه‌های آلدهیدِ ویسکوز اکسایش‌یافته و BSA به وقوع پیوسته است. وجود گروه‌های آلدهید در نمونهٔ عمل‌شده با گلوتارآلدهید، توسط ظهور دوبارهٔ باند جذبی در $1734\ cm^{-1}$ (شکل d.۴) تأیید شد. گروه‌های آلدهید آزاد از گلوتارآلدهید با گروه‌های آمین تریپسین واکنش داده‌اند، که همانطور که در طیفها دیده می‌شود، این امر می‌تواند از ناپدیدشدنِ باند مشخصهٔ کربونیل نتیجه‌گیری شود. هرچند، باندهای مشخصهٔ تریپسین تثبیتی، توسط جذب اجتناب‌ناپذیر آبِ غیرقابلِ حذفِ متصل به آنزیم و همچنین سلولز، پوشانده شده‌اند. به عنوان مثال، باند آمید I مربوط به تریپسین

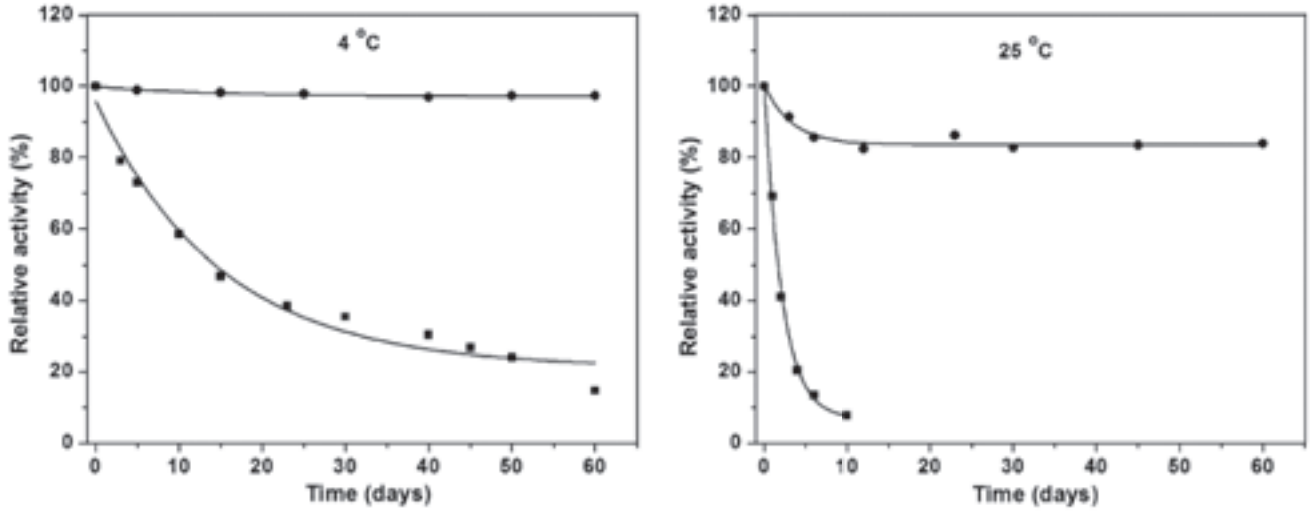


شکل ٦- عکس‌های SEM مربوط به ویسکوز با ۸/۳۵ میلی‌گرم تریپسین تثبیتی در هر گرم ویسکوز خشک اکسایش‌یافته با ۰/٤ درصد $NaIO_4$ در مدت ۳٦۰ دقیقه در بزرگنماییِ (a) ۳۵۰× و (b) ۱۰۰۰×.

(انتظار می‌رفت که در حدود cm^{-1} ۱۶۴۰–۱۶۴۵ مشاهده شود)، شدیدترین باند جذبی در پروتئینها، در ناحیه‌ای از طیف‌ها می‌باشد که در آنجا آب جذبی سیگنال آن را پوشش داده است. گذشته از این، باند پهن در cm^{-1} ۱۴۵۰، باند گروه‌های NH مربوط به پروتئین‌ها را همپوشانی کرده است.

مقدار و فعالیت تریپسین تثبیتی روی الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته در شرایط مختلف و اصلاح‌شده بطوری که در بالا شرح داده شد، در شکل ۵ ارائه شده است.

داده‌های بدست‌آمده نشان دادند که هم میزان پروتئین و هم فعالیت تریپسین تثبیتی، با افزایش زمان اکسایش در طول ۱۲۰ دقیقه ابتدایی، افزایش یافتند. هرچند، مقدار تریپسین پیوند کووالانسی داده با لیف اکسیده‌شده، در زمانِ طولاتی‌تر از ۱۲۰ دقیقه، شروع به افزایش کرد، درحالیکه فعالیت کاتالیستی شروع به کاهش کرد. در دید اول (شکل a.۵)، میزان پروتئین، برای لیف اکسایش‌یافته توسط ۰/۴ درصد $NaIO_4$ نسبت به لیف اکسایش‌یافته توسط ۰/۲ درصد $NaIO_4$ بیشتر بود. در حقیقت میزان پروتئین توسط سطح اکسایش معین می‌شود، یعنی، الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته بطرق مختلف با سطوح اکسایش یکسان، دارای میزان پروتئین مشابه هستند (شکل الحاقی در شکل a.۵). بیشترین مقدار پروتئین برابر با ۸/۳۵ میلی‌گرم بر گرم نخ ویسکوز خشک، برای نمونه‌های اکسایش‌یافته تحت شدیدترین شرایط (۰/۴ درصد $NaIO_4$، ۳۶۰ دقیقه) بود، درحالیکه بیشترین فعالیت تثبیت‌شده (U/g ۰/۷۸)، برای نمونه اکسایش‌یافته توسط ۰/۴ درصد $NaIO_4$، ۱۲۰ دقیقه، بدست آمد. همانطور که از شکل a.۶ دیده می‌شود، تریپسین تثبیتی، بطور یکنواختی روی سطح لیف توزیع شده بود. بزرگنمایی بیشتر (شکل b.۶) نشان داد که تریپسین پیوندی، بیشتر روی سطح لیف قرار گرفته و تشکیل تجمعات یا انباشتگی‌ها را داده است. از آنجایی که فعالیت بیشینهٔ تریپسین تثبیتی (۰/۷۸ واحد آنزیم بر گرم نخ



شکل ۷- پایداری تریپسین آزاد (مربع مشکی) و تریپسین تثبیتی (دایرهٔ مشکی) در ٤ و ۲۵ درجهٔ سانتیگراد در طول انبارکردن یا ذخیره‌سازی. فعالیت‌ها وابسته به فعالیت‌های روز اول (۱۰۰ درصد) هستند.

ویسکوز خشک U/g، که ۹ درصد فعالیت کل ابتدایی تریپسین در محلول قبل از تثبیت می‌باشد) برای نمونهٔ اکسایش‌یافته با ۰/۴ درصد $NaIO_4$ به مدت ۱۲۰ دقیقه بدست آمد، که در این حالت این قبیل تجمعات مشاهده نشد، می‌توان نتیجه گرفت که تجمع آنزیم تثبیتی، فعالیت آن را کاهش می‌دهد. همچنین بایستی اشاره کرد که نسبت به روش مستقیم، مقادیر بیشتری از تریپسین روی الیاف ویسکوز از طریق BSA تثبیت شده بود. این نتایج مطابق با نتایج گزارش‌شده در مقالات هستند.

بطور کلی اینگونه تشخیص داده شد که، هنگامی که تثبیت هر مولکول توسط اتصال چندنقطه‌ای رخ دهد، افزایش قابل‌توجه پایداری آنزیم می‌تواند حاصل شود. هرچند غلظت بالای گروه‌های آلدهید می‌تواند منجر به پیوندهای چندنقطه‌ای بیشمار بین آنزیم و حامل، و بنابراین تغییر شکل یا پیچش ساختار آنزیم شود. در چنین حالتی، دسترس‌پذیری و تطابق بستر می‌تواند کاهش یابد، که این امر بر حفظ و نگهداری فعالیت آنزیم تثبیتی تأثیر می‌گذارد. اینگونه فرض شد که غلظت‌های بالاتر گروه‌های آلدهید مشتق‌شده از گلوتارآلدهید مسئول کاهش فعالیت کاتالیستی تریپسین تثبیت‌شده روی الیاف ویسکوز اکسایش‌یافته در مدت زمان بیشتر از ۱۲۰ دقیقه هستند، همانطور که در مقالهٔ مربوط به پنی‌سیلین و اورئاز گزارش شده بود. علاوه بر این، کاهش فعالیت تثبیتی می‌تواند به دلیل بارگذاری اضافهٔ آنزیم باشد که منجر به ممانعت فضایی یا انتقال جرم و محدودیت‌های نفوذ می‌شود، همانطور که قبلاً در مورد تثبیت بتا–گالاکتوزیداز مشاهده شده بود.

۳-۳- پایداری ذخیره یا انبار کردن:

پایداری آنزیم تثبیتی یک خصلت مهم از دیدگاه کاربرد عملی آن می‌باشد. به منظور ارزیابی قابلیت استفاده نخ‌های ویسکوز حاصله با تریپسین تثبیتی، پایداری ذخیرهٔ آنها جهتِ مشاهدهٔ اینکه آنزیم در حالت تثبیت‌شده فعالیت کاتالیستی خود را برای مدت زمان قابل‌توجهی حفظ می‌کند یا نه، بررسی شدند. نخ ویسکوز اکسایش‌یافته با ۰/۴ درصد NaIO4 در مدت ۱۲۰ دقیقه، به عنوان نمونه‌ای با بیشترین فعالیت تثبیتی، به منظور بررسی‌های پایداری ذخیره انتخاب شد.

پایداری تریپسین در محلول و در حالت تثبیتی روی لیف در طی مدت ۶۰ روز انبارشدن در ۴ و ۲۵ درجهٔ سانتیگراد ارزیابی شد. همانطور که در شکل ۷ می‌توان مشاهده کرد، آنزیم آزاد ۸۵ درصد فعالیت اولیهٔ خود را بعد از ۶۰ روز ذخیره‌سازی یا انبار در ۴ درجهٔ سانتیگراد از دست داد، درحالیکه در دمای اتاق، اُفت فعالیتی حدود ۹۲ درصد در ۱۰ روز ابتدایی مشاهده شد. این کاهش شدید در فعالیت کاتالیستی تریپسین آزاد اساساً به دلیل جذب خودبه‌خود بین مولکولی، یعنی، اتولیز یا خودکافت رخ می‌دهد. این امر معروف است که کاربرد عملی تریپسین آزاد (و همچنین دیگر پروتئازها) بواسطهٔ مشکلاتی از قبیل ناپایداری و افت سریع فعالیت که برخاسته از تمایل آن به خودکافتی یا اتولیز و تجمع و پیچ نخوردن است، محدود می‌باشد. تثبیت می‌تواند بر این محدودیت‌ها غلبه کند، چون که تثبیت ساختار و بنابراین فعالیت آنزیم را پایدار می‌کند. علاوه بر این تثبیت از خودکافت پیشگیری می‌کند، چون که از تماس بین مولکول‌های آنزیم جلوگیری می‌کند. این امر توسط نتایج به دست آمده برای پایداری تریپسینِ تثبیتی روی نخ ویسکوز اکسایش‌یافته (شکل ۷) اثبات شد. بعد از ۶۰ روز انبارسازی در ۴ و ۲۵ درجهٔ سانتیگراد، فعالیت تریپسین تثبیتی به ترتیب ۹۷/۳ و ۸۳/۸ درصدِ فعالیت اولیهٔ آن (سنجش‌شده بلافاصله بعد از تثبیت) بود. نتایج مشابهی نیز توسط ژی و همکارانش گزارش شده بود.

تریپسین پیوند دادهٔ کووالانسی حاصل، بسیار پایدارتر از همتای محلول خود می‌باشد. این امر شاید نتیجهٔ تثبیت می‌باشد، که از آنزیم در برابر حملهٔ پروتئین‌کافتی (اتولیز یا خودکافت)، و همچنین تجمعی که در مولکول‌های تریپسین در محلول رخ‌می‌دهد، محافظت می‌کند. مهمترین عامل در پایدارسازی، اتصال چندنقطه‌ای یک مولکول اکسی‌سلولز به چندین گروه آمینو از مولکول تریپسین یکسان می‌باشد، که سختی مولکولی را افزایش می‌دهد و از پیچ نخوردنِ آن جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، حضور BSA، به مقدار بیشتری آنزیم را پایدار می‌کند. این امکان وجود دارد که اتصال یک نقطه‌ای بین آنزیم و حامل که در برخی موارد رخ می‌دهد، انعطاف‌پذیری مولکولی بیشتری را برای آنزیم فراهم می‌کند، امّا از طرف دیگر محافظت کمتری را در برابر تغییرات ساختاری در گذر زمان ایجاد می‌کند. این پدیده ممکن است دلیلِ کاهش اندک در پایداری آنزیم تثبیتی در انبارسازی به مدت طولانی باشد. در نهایت، آزمایش جهتِ وجود پروتئین در محلول فیزیولوژیکی بعد از ۶۰ روز ذخیره‌سازی یا انبار، هیچ پروتئینی را در محلول نشان نداد، که این امر دلالت بر این دارد که تریپسین بطور مستحکمی به نخ ویسکوز متصل باقی مانده است.

٤- نتیجه‌گیری

بواسطهٔ اکسایش پریُدات، مقادیر قابل‌توجهِ گروه‌های آلدهید می‌تواند در الیاف ویسکوز ایجاد شود؛ مقدار بیشینهٔ گروه‌های آلدهید ۱۲۸۴ میکرومول بر گرم می‌باشد. مقدار عاملیت‌های واردشده، توسط انتخاب شرایط اکسایش قابل‌کنترل می‌باشد. اکسایش پریُدات هیچ تأثیر قابل‌توجهی روی اُفت وزن نخ‌های ویسکوز اصلاحی نداشت و سبب افزایش کمینه‌ای در ظرافت نخ اکسایش‌یافته شد. استحکام کششی نخ‌های اکسایش‌یافته، برای زمان اکسایش تا حدود ۱۲۰ دقیقه، تغییر قابل‌ملاحظه‌ای نکرد. هرچند، هنگامی که زمان اکسایش بیشتر از ۱۲۰ دقیقه بود، مخصوصاً در مورد غلظت‌های پریُدات بالاتر، استحکام کششی به شدت کاهش یافت.

نخ‌های ویسکوزِ اکسایش‌یافته با پریُدات سدیم و سپس اصلاح‌شده با BSA و گلوتارآلدهید، سطح مطلوبی را برای تثبیت تریپسین فراهم کردند. بیشترین میزان پروتئین، برابر با ۸/۳۵ میلی‌گرم بر گرم نخ ویسکوز خشک، برای نمونه‌های اکسایش‌یافته تحت سخت‌ترین شرایط (۰/۳ درصد $NaIO_4$، ۳۶۰ دقیقه) بدست آمده بود، در حالیکه فعالیت تثبیتی بیشینه، برای نمونه‌های اکسایش‌یافته توسط ۰/۴ درصد $NaIO_4$ به مدت ۱۲۰ دقیقه بدست آمده بود. پس از ۶۰ روز ذخیره‌سازی یا انبار در ۴ و ۲۵ درجهٔ سانتیگراد، اتصال چندنقطه‌ای کووالانسیِ تریپسین بطور مستحکمی متصل به حامل باقی ماند و به ترتیب ۹۷/۳ و ۸۳/۸ درصد فعالیت اولیهٔ خود را، حفظ کرد.

الیاف سلولزی حاصله با تریپسین تثبیتی می‌توانند به عنوان مواد نساجی زیست‌پزشکی به شکل پانسمان‌ها و گازها برای درمان زخمها مورد استفاده قرار گیرند. این امر به دلیل زیست‌سازگاری خوب مواد سلولزی، و خواص ضد التهاب، ضد سمیت و زهکشی تریپسین و همچنین پایداری بالای الیاف ویسکوز فعال بیولوژیکی می‌باشد.