

Use of amyloid nano-fibrils as a protein scaffold for immobilization of lipase enzyme from *Pseudomonas cepacia*

Samira Vaziri¹, Mohammad Fazilati²,
Amir Arasateh^{3*}, Habib-ollah Nazem⁴

1. Instructor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
 2. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
 3. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
 4. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
- (Received: Jan. 15, 2018 - Accepted: Aug. 4, 2018)

Abstract

Amyloids are created from various proteins in denaturant conditions. Highly active surface, makes these materials suitable for enzyme immobilization. The aim of this research was to study the production of amyloid fibrils and investigate the possibility of using them as a matrix for enzyme immobilization. Response surface methodology (RSM) was used to generate the maximum amyloid content. The results of the Congo red spectrometry and circular dichroism (CD) were analyzed by Design Expert 7 software (Trial version) and transmission electron microscopy was used to confirm the presence of amyloid fibrils. The immobilization was done by creating glutaraldehyde mediated crosslink of enzyme on the amyloid fibrils and kinetic factors including activity, specific activity, optimal temperature and pH and thermal stability were compared with the free enzyme. The highest amyloid content was obtained after 72.6 hours agitation of bovine serum albumin at 4.35 mg.ml⁻¹ in mixed citrate-phosphate buffer pH=4.49 at 80 °C and immobilized lipase was improved relative to free lipase in the case of activity, specific activity, K_m and V_{max}, optimal temperature and pH and thermal stability at 40 °C. Amyloid fibrils as a rich material of chemical groups can be suitable for stabilization. This protein matrix can be a good *inVivo* candidate as a bio-compatible scaffold for enzyme immobilization. Amyloids with a diameter less than 100 nanometers, as new nano-materials, not only increase the stability of lipase but also enhance other kinetic properties as a new nano-matrix.

Keywords: Amyloid, Bovine serum albumin, immobilization, lipase, optimization.

استفاده از نانو رشته‌های آمیلوئیدی به‌عنوان یک بستر پروتئینی برای تثبیت آنزیم لیپاز باکتری سودوموناس سپاسیا

سمیرا وزیری^۱، محمد فضیلتی^۲، امیر آراسته^{۳*}، حبیب‌الله ناظم^۴

۱. مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۴. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۵/۱۳)

چکیده

آمیلوئیدها در شرایط غیرطبیعی‌کننده از پروتئین‌های مختلف به وجود می‌آیند. سطح بسیار فعال، این مواد را به‌عنوان بستری برای تثبیت آنزیم مناسب می‌سازد. هدف از این مطالعه تولید رشته‌های آمیلوئیدی و بررسی امکان استفاده از آن‌ها به‌عنوان بستر برای تثبیت آنزیم بوده است. برای تولید حداکثر میزان آمیلوئید از روش پاسخ سطح^۱ استفاده شد و نتایج طیف سنجی کنگورد و دورنگ‌نمایی دورانی^۲ با نرم‌افزار Design Expert 7 (Trial version) تحلیل شد و از میکروسکوپ الکترونی گذاره برای تایید حضور رشته‌های آمیلوئیدی استفاده گردید. فرایند تثبیت با گلوئارالدهید و با ایجاد پل‌عرضی بین آنزیم و رشته‌های آمیلوئیدی انجام شد و فاکتورهای سینتیکی در آنزیم آزاد و تثبیت‌شده شامل فعالیت، فعایت ویژه، دما و pH بهینه و پایداری حرارتی باهم مقایسه شدند. بیش‌ترین میزان آمیلوئید پس از ۷۲/۶ ساعت به‌هم زدن آلبومین سرم گاوی با غلظت ۴/۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر میکس سیترات-فسفات با pH=۴/۴۹ و دمای ۸۰ درجه به‌دست آمد و لیپاز تثبیت‌شده در فعالیت، فعایت ویژه، K_m و V_{max}، دما و pH بهینه و پایداری حرارتی در دمای ۴۰ درجه نسبت به لیپاز آزاد برتری سینتیکی نشان داد. رشته‌های آمیلوئیدی به‌عنوان موادی غنی از گروه‌های شیمیایی، می‌توانند برای تثبیت آنزیم‌ها مناسب باشند. این زمینه پروتئینی می‌تواند کاندیدای مناسبی در شرایط *inVivo* به‌عنوان بستری زیست‌سازگار در تثبیت آنزیم‌ها باشد. آمیلوئیدها با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر به‌عنوان نانو مواد جدید، نه‌تنها باعث افزایش پایداری لیپاز می‌شوند، بلکه سایر خواص سینتیکی آن را به‌عنوان یک نانو-ماتریکس جدید تقویت می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: آلبومین سرم گاوی، بهینه‌سازی، آمیلوئید، لیپاز، تثبیت.

مقدمه

آنزیم تری آسیل گلیسرول لیپاز (EC: 3.1.1.3) یا تری آسیل گلیسرول آسیل هیدرولاز^۱، یکی از انواع آنزیم‌های محلول در آب و از دسته هیدرولازها است که هیدرولیز پیوندهای استری بین اسید چرب و گلیسرول را در سوبستراهای لیپیدی کاتالیز می‌کند. این آنزیم در انسان، توسط لوزالمعده، معده و کبد ساخته می‌شود و در درمان مشکلات گوارشی مفید است (Pilkington *et al.*, 2010). امروزه لیپازهای میکروبی به دلیل پایداری و دامنه وسیع سوبسترای که دارند، تقریباً جایگزین لیپازهای جانوری و گیاهی شده‌اند (Zare Baghi Abad *et al.*, 2016). به‌طور کلی واژه لیپاز برای تمام آنزیم‌هایی که روی سوبستراهای لیپیدی اثر می‌کنند، به‌کار برده می‌شود. لیپازها، سوبستراهای متنوعی دارند (Hadizadeh *et al.*, 2013) و فرایند تثبیت می‌تواند در ارتقای پایداری آن‌ها در فرایندهای مختلف مفید باشد. افزایش پایداری می‌تواند موجب کاهش مقدار مصرف آنزیم، حصول سیگنال قوی‌تر در زیست‌حسگرها و افزایش شانس استفاده دوباره از آنزیم گردد (Kim *et al.*, 2006). به علاوه تثبیت لیپاز منجر به کاهش پتانسیل آلودگی از طریق لیپاز باقیمانده شده و امکان استفاده مکرر از آنزیم را فراهم خواهد کرد. در حال حاضر بیش از سه درصد از کل لیپاز تثبیت‌شده در دنیا برای اصلاح چربی‌های ذوب شده و روغن‌ها به‌کار می‌رود. آنزیم لیپاز معمولاً پس از تثبیت روی بسترهای مختلف دچار افت نسبی در پایداری و فعالیت می‌شود (Maldonado *et al.*, 2015).

تاکنون از مواد مختلفی چون نانوذرات مغناطیسی آهن (Ren, Rivera *et al.*, 2011) و نقره (Dumri & Hung Anh, 2014)، آلژینات، گرافیت و ژئولیت (Maldonado *et al.*, 2015) و غیره به‌عنوان بستر

در تثبیت لیپازها استفاده شده است، ولی در اکثر موارد آنزیم به دلیل از دست دادن آب غیرطبیعی می‌شود. رشته‌های آمیلوئیدی ساختارهای پروتئینی غیرطبیعی و نامحلول در آب هستند که در شرایط غیرطبیعی‌کننده مثل pH پایین و دمای بالا تشکیل می‌شوند. مشخصه بارز این رشته‌ها پایداری حرارتی بالا و گسترده pH وسیع آن‌ها است. مقدار آب موجود در این ساختارها از لحاظ بیولوژیکی مشابه بافت است و به‌نظر می‌رسد تثبیت آنزیم لیپاز روی رشته‌های آمیلوئیدی بتواند در رفع این مشکل راه‌گشا بوده و پایداری و نیز پارامترهای سینتیکی آنزیم را بهبود بخشد (Maldonado *et al.*, 2017). از این‌رو در پژوهش حاضر برای بهینه‌سازی شرایط تولید رشته‌های آمیلوئیدی و به منظور دستیابی به حداکثر میزان آمیلوئید از روش رویه پاسخ سطح^۲ استفاده شد و رشته‌های حاصله به‌عنوان یک نانو بستر پروتئینی جدید برای تثبیت آنزیم لیپاز مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد

آنزیم لیپاز از سودوموناس سپاسیا (*Pseudomonase cepacia*)، پارا نیتروفیل پالمیتات، پارانیتروفیل، تیوفلاوین T، کنگورد و سدیم آزید از شرکت سیگما (St Louis, MO USA) و آلومین سرم گاوی، کوماسی بریلیانت بلو، تریتون X100، صمغ عربی و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک (Merck-Germany-Darmstadt) خریداری شد.

تهیه محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز

برای تهیه بافر میکس سیترات-فسفات، ابتدا یک استوک ۰/۱ مولار از اسید سیتریک و ۰/۲ مولار از فسفات سدیم دی‌بازیک در آب دو بار تقطیر تهیه و

2. RSM

1. Triacylglycerol Acyl Hydrolase

در بافر مخلوط سیترات- فسفات با pHهای مختلف ۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۶ و در حمام آب با دماهای مختلف (از ۸۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و به کمک مگنت‌های کوچک ۵ میلی‌متری (برنجی) با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و برای مدت صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به هم زده شدند تا رشته‌های آمیلوئیدی در هر یک به‌وجود آید. بر این اساس تعداد زیادی از حالات مختلف فیبریل‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. پس از پایان زمان انکوباسیون، نمونه‌ها تا بررسی به روش طیف‌سنجی کنگورد در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

طرح آماری

روش پاسخ سطح مجموعه ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌سازی فرایندهای مختلف زیستی به‌کار می‌رود. در این تحقیق از نرم‌افزار Design-Expert 7 جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و روش پاسخ سطح در قالب طرح مرکب مرکزی^۲ برای بررسی میزان اثر متغیرهای مختلف بر فرایند تولید نانورشته‌های آمیلوئیدی استفاده شد. در این تحقیق اثر متغیرهای غلظت پروتئین، دما، pH و زمان گرماگذاری، هر یک در پنج سطح (جدول ۱) بر فرایند تولید رشته‌های آمیلوئیدی با روش‌های طیف‌سنجی کنگورد و دو رنگ نمایی دورانی مورد بررسی قرار گرفت (Milani et al., 2010). نتایج حاصل از حالات مختلف تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی با نرم‌افزار RSM طراحی شد و برای دریافت بهترین پاسخ از طریق نرم‌افزار، کلیه آزمایش‌های تشکیل آمیلوئید نظیر کنگورد و دورنگ نمایی دورانی در ۳۰ نمونه طراحی و انجام شد. در روش طیف‌سنجی کنگورد، طول موج ماکزیمم و جذب در طول موج ماکزیمم و در روش دورنگ نمایی دورانی میزان درصد ساختارهای بتای تولید شده

سپس با نسبت‌های مشخص با هم ترکیب شدند که بافرهایی با pHهای مختلف از ۲/۶ تا ۷ تهیه شد. میزان pH به طور جداگانه با pH متر تنظیم و جهت جلوگیری از آلودگی احتمالی، ۰/۰۵٪ سدیم آزید به محلول بافر اضافه شد. محلول بافر پس از عبور از فیلتر میلی پور در شیشه‌های تیره و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای تهیه بافر کنگورد، میزان مورد نظر از رنگ کنگورد (به‌طوری‌که غلظت نهایی کنگورد به ۲۰ میکرو مولار برسد) در بافر فسفات بافر سالین^۱ شامل ۱۴۰ میلی‌مولار NaCl و ۲/۵ میلی‌مولار KCl و ۱۰ میلی‌مولار Na₂HPO₄ و ۲ میلی‌مولار KH₂PO₄ حل شد. بافر پس از تنظیم pH روی ۷/۴ از فیلتر مخصوص عبور داده شده و در شیشه تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد (Holm et al., 2007).

تهیه محلول آلبومین سرم گاوی و تعیین غلظت آن
محلول آلبومین سرم گاوی از انحلال مقدار مورد نظر از پروتئین در بافر به آرامی و بدون به‌هم‌زدن شدید به‌دست آمد. با توجه به خالص بودن نمونه پروتئینی مورد استفاده در این مطالعه، سنجش غلظت پروتئین در همه آزمایشات بر اساس روش دقیق برادفورد انجام شد تا حداکثر اطمینان از میزان غلظت پروتئین برای تشکیل آمیلوئید حاصل گردد.

القای تجمع آمیلوئیدی در آلبومین سرم گاوی

برای القای تجمع‌های آمیلوئیدی و بررسی شرایط مختلف، پنج حالت مختلف از متغیرهای چهارگانه شامل غلظت پروتئین، pH، دما و زمان انکوباسیون در نظر گرفته شد. بدین معنی که هر یک از غلظت‌های یک تا پنج میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی

به‌عنوان پاسخ^۱ در نرم‌افزار قرار گرفته و مورد تحلیل قرار گرفت. تعداد کل آزمایش‌ها ۳۰ آزمایش بوده که هر کدام با دو تکرار انجام شدند.

جدول ۱. متغیرها و سطوح مربوط به هر متغیر در فرایند

| بهبودسازی تولید رشته‌های آمیلوئیدی | | | | | |
|--------------------------------------|---------------|----|----|----|----|
| متغیرها | مقادیر (سطوح) | | | | |
| دما (درجه سانتی‌گراد) | ۸۰ | ۷۰ | ۶۰ | ۵۰ | ۴۰ |
| pH | ۶ | ۵ | ۴ | ۳ | ۲ |
| غلظت پروتئین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) | ۵ | ۴ | ۳ | ۲ | ۱ |
| زمان (ساعت) | ۹۶ | ۷۲ | ۴۸ | ۲۴ | ۰ |

طیف‌سنجی کنگورد

برای ردیابی رشته‌های آمیلوئیدی با روش اتصال رنگ کنگورد، میزان ۲۵ میکرولیتر از محلول پروتئینی نمونه با ۴۷۵ میکرولیتر از بافر کنگورد با هم مخلوط شده و پس از به‌هم‌زدن برای مدت ۱۰ دقیقه تا تثبیت رنگ در شرایط آزمایشگاه قرار داده شد. سپس طیف جذبی آن‌ها با دستگاه طیف‌سنج مرئی (UV-3100 Shimadzu-Japan) در طول موج ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر در مقابل بافر کنگورد به‌عنوان بلانک اندازه‌گیری شد. اطلاعات حاصل از هر بار اسکن طول موج به کمک نرم‌افزار Excel برای تعیین میزان λ_{max} و جذب در λ_{max} مورد استفاده قرار گرفت. در این محدوده مولکول کنگورد به تنهایی، حداکثر جذب را در طول موج ۴۸۵ نانومتر دارد، ولی در صورت تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی، این میزان می‌تواند تا بیش از ۵۰۰ نانومتر نیز افزایش یابد (Arasteh, Habibi-). (Rezaei et al., 2012)

طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD)

برای ردیابی رشته‌های آمیلوئیدی با طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی، برای هر یک از نمونه‌های ۳۰ گانه میزان

بیضی‌واری مولی^۲ با استفاده از دستگاه اسپکتروپلاریمتر (Circular Dichroism Spectropolarimeter Model-215 Aviv-USA) در محدوده ۱۹۰ تا ۳۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. برای این کار نمونه‌های آمیلوئیدی تا غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر تریس- باز با pH=۷/۴ رقیق شدند و با استفاده از کووت کوارتز با قطر یک میلی‌لیتر در دستگاه قرار گرفتند. نتایج با نرم‌افزار CDNN تحلیل شده و میزان درصد ساختارهای ثانویه موجود در پروتئین مشخص گردید (Taha et al., 2015).

میکروسکوپ الکترونی گذاره

برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از رشته‌های آمیلوئیدی، ابتدا ۵ میکرولیتر از نمونه آمیلوئید تهیه شده با غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (در بافر اصلی رقیق شدند)، برای مدت ۴۵ ثانیه بر روی گریدهای مسی فرموار^۳ پوشش دار شده با کربن (۴۰۰ مش) قرار داده شد و مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد. سپس سطح گرید با محلول ۳ درصد وزنی اورانیل استات به مدت یک دقیقه رنگ آمیزی و مقادیر اضافه با کاغذ صافی زدوده شد. پس از خشک شدن به مدت دو ساعت در دمای آزمایشگاه، گریدهای آماده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل Philips EM 208(S) با بزرگ‌نمایی ۲۰ تا ۸۰ هزار برابر تصویربرداری گردید (Pilkington et al., 2010).

سنجش فعالیت آنزیم لیباز به روش طیف‌سنجی مرئی در این روش از پارا نیترو فنیل پالمیتات^۴ به‌عنوان سوبسترای آنزیم استفاده شد که در نتیجه فعالیت

2. Molar Ellipticity
3. Formvar
4. pNPP

1. Response

۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنزیم لپاز انجام گرفت. پس از تهیه رشته‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی و تعیین غلظت ماتریکس، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رسوبات آمیلوئیدی، درون همان میکروتیوپ دو میلی‌لیتری باقی‌مانده و ۱۰۰ میکرولیتر گلو تارالدهید با غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار (3X) و ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم لپاز با غلظت ۲/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (3X) به نمونه اضافه شدند. این کار برای تهیه محلول نهایی تثبیت با غلظت صحیح (۱۰۰ میلی‌مولار از گلو تارالدهید و ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنزیم لپاز) انجام شد. فرایند تثبیت با به‌هم‌زدن ملایم محلول حاوی آنزیم، گلو تارالدهید و زمینه آمیلوئیدی با مگنت ریز با دور ۱۰۰ دور در دقیقه و برای مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار جهت تعیین بهترین مدل پیشنهادی برای تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی در (جدول ۲) آورده شده است. شرایط بهینه تولید رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۴/۳۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین، دمای ۸۰ درجه و همراه با به‌هم‌زدن آرام محلول در بافر مخلوط سیترات-فسفات با pH برابر ۴/۴۹ برای مدت ۷۲/۶ ساعت به‌دست آمد. این شرایط با تحلیل نتایج حاصل از روش‌های طیف‌سنجی مرئی و دورنگ نمایی دورانی به‌دست آمده است و در تمام مراحل انجام آزمایش برای تولید رشته‌های آمیلوئیدی استفاده شده است.

نتایج حاصل از طیف‌سنجی کنگورد

با روش طیف‌سنجی کنگورد میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی در هر یک از آزمایش‌های ۳۰ گانه تعیین شد و نتایج بر حسب طول موج ماکزیمم و جذب در طول موج ماکزیمم در نرم‌افزار قرار گرفت. تصاویر زیر اثر همزمان دو فاکتور (متغیر) را بر طول موج ماکزیمم و جذب در طول موج ماکزیمم نشان می‌دهد (شکل‌های ۱ و ۲).

آنزیم به اسید چرب و پارا نیترو فنل^۱ تبدیل می‌شود. پارانیتروفنل رنگی زرد دارد که حضور آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. برای تهیه محلول سوبسترا، محلول A (محلول ۱۶/۵ میلی‌مولار پارا نیترو فنیل پالمیتات در ۱۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول) به نسبت ۱ به ۹ با محلول B (حاوی ۰/۴ درصد تریتون X=100 و ۰/۱ درصد صمغ عربی) مخلوط گردید. برای سنجش جذب مرئی، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم به ۹۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا اضافه شده و پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV-3100-Shimadzu Japan) خوانده شد. از غلظت‌های استاندارد پارانیتروفنل برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. یک واحد فعالیت، مقدار آنزیمی است که در هر دقیقه یک میکرومول پارانیتروفنل زرد رنگ را در محیط آزاد نماید (Venkatesagowda et al., 2012). برای سنجش فعالیت آنزیم تثبیت شده، آنزیم بارگذاری شده روی رشته‌های آمیلوئیدی که در انتهای میکروتیوپ باقیمانده است، به‌عنوان منبع آنزیمی استفاده شد و پس از افزوده شدن سوبسترا، موارد بالا عیناً تکرار گردید. زمان گرماگذاری برای آنزیم تثبیت‌شده ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد. برای تعیین فعالیت ویژه، فعالیت آنزیم بر میزان غلظت آنزیم موجود در محیط واکنش تقسیم شد.

تثبیت آنزیم لپاز روی رشته‌های آمیلوئیدی

فرایند تثبیت با روش ایجاد اتصالات عرضی^۲ با گلو تارالدهید و در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشته‌های آمیلوئیدی، ۱۰۰ میلی‌مولار از گلو تارالدهید

1. pNP

2. Cross linking

جدول ۲. بهترین مدل‌های پیشنهادی برای تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی از آلبومن سرم گاوی

| Number | temp | pH | Conc. | Time | Desirability |
|--------|-------|------|-------|-------|--------------|
| ۱ | ۸۰ | ۴/۴۹ | ۴/۳۶ | ۷۱/۹ | ۰/۹۹۵۰۷۵ |
| ۲ | ۸۰ | ۴/۵ | ۴/۳۶ | ۷۲/۳۴ | ۰/۹۹۵۰۷۴ |
| ۳ | ۸۰ | ۴/۵۱ | ۴/۳۱ | ۷۵/۵۴ | ۰/۹۹۴۹۴۶ |
| ۴ | ۸۰ | ۴/۴۳ | ۴/۲۸ | ۷۴/۱۹ | ۰/۹۹۴۸۵۲ |
| ۵ | ۸۰ | ۴/۵۷ | ۴/۴۲ | ۶۹/۸۵ | ۰/۹۹۴۷۸۴ |
| ۶ | ۸۰ | ۴/۴۷ | ۴/۴۲ | ۶۷ | ۰/۹۹۴۷۷۳ |
| ۷ | ۸۰ | ۴/۵۵ | ۴/۲۸ | ۷۷/۸ | ۰/۹۹۴۶۹۵ |
| ۸ | ۸۰ | ۴/۶۲ | ۴/۳۸ | ۷۳/۵۱ | ۰/۹۹۴۶۰۷ |
| ۹ | ۸۰ | ۴/۶۱ | ۴/۳۳ | ۷۶/۳۵ | ۰/۹۹۴۵۸۸ |
| ۱۰ | ۷۹/۹۴ | ۴/۵۱ | ۴/۳۳ | ۷۴/۳۴ | ۰/۹۹۴۵۸۰ |

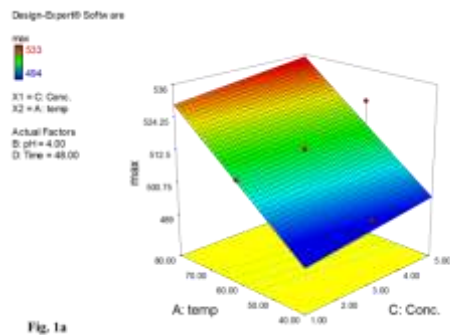


Fig. 1a

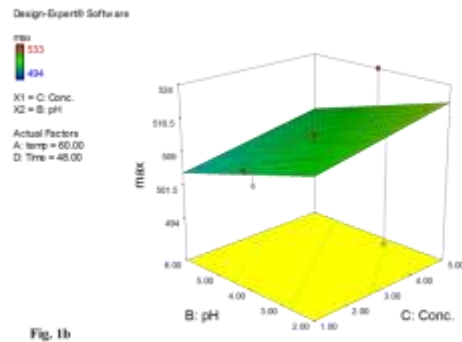


Fig. 1b

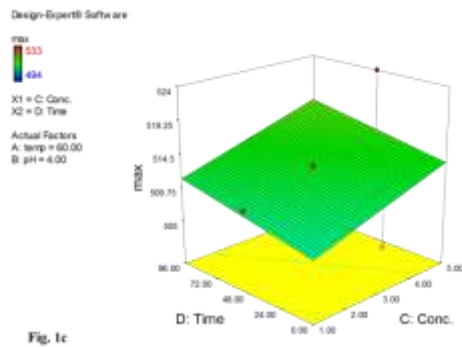


Fig. 1c

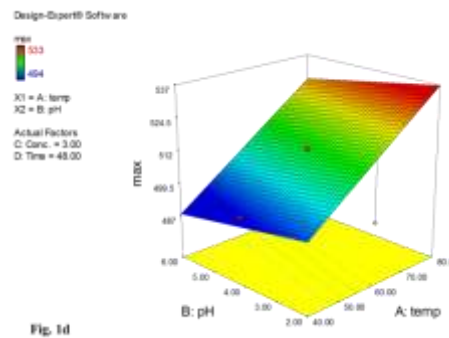


Fig. 1d

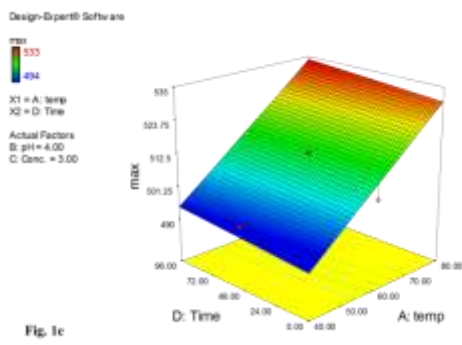


Fig. 1e

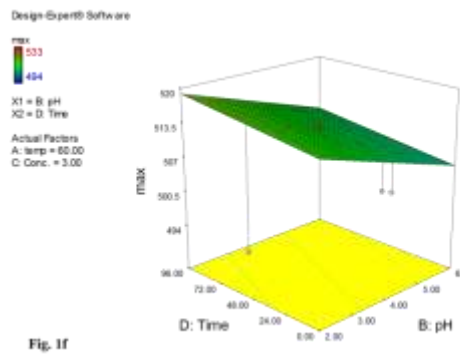


Fig. 1f

شکل ۱. اثر همزمان دو متغیر بر میزان طول موج ماکزیمم حاصل از جذب سنجی کنگورد به عنوان شاخص تولید رشته‌های آمیلوئیدی. (a) غلظت و دما، (b) غلظت و pH، (c) غلظت و زمان، (d) دما و pH، (e) دما و زمان و (f) pH و زمان

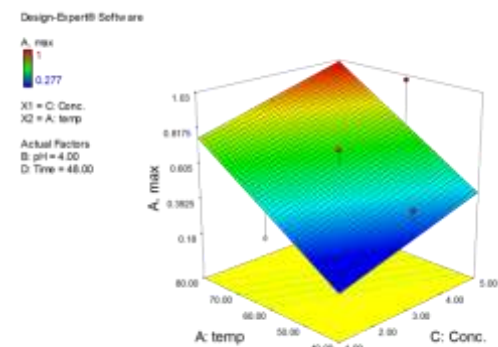


Fig. 2a

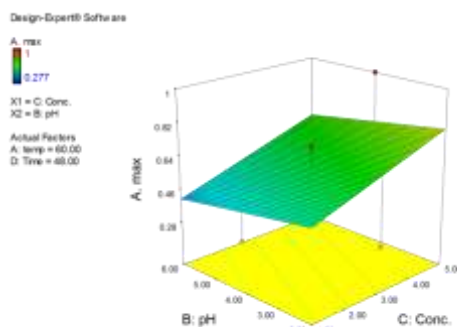


Fig. 2b

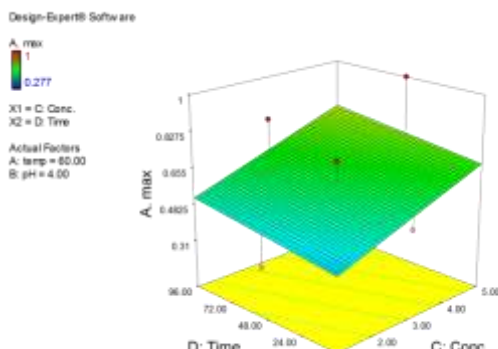


Fig. 2c

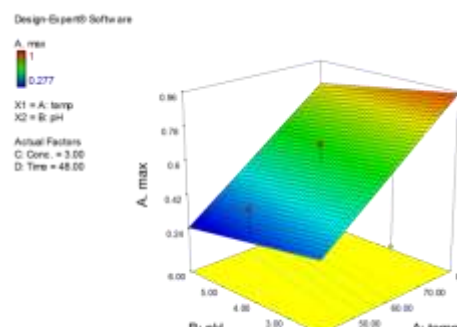


Fig. 2d

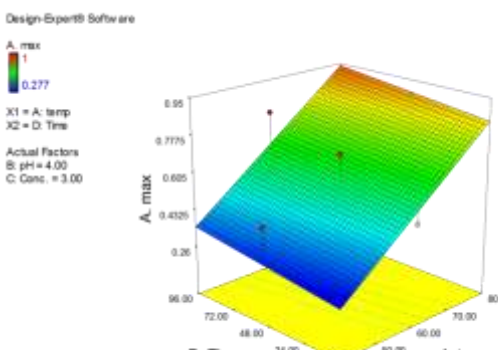


Fig. 2e

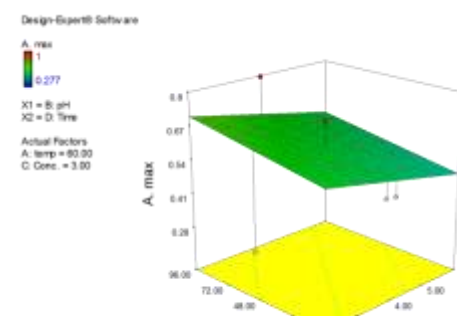


Fig. 2f

شکل ۲. اثر همزمان دو متغیر بر میزان جذب در طول موج ماکزیمم حاصل از جذبسنجی کنگورد به عنوان شاخص تولید رشته‌های آمیلوئیدی. (a) غلظت و دما، (b) غلظت و pH، (c) غلظت و زمان، (d) دما و pH، (e) دما و زمان و (f) pH و زمان

نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره پروتئین بتا آمیلوئید در شرایط آزمایشگاهی الیگومرها و پروتوفیبریل‌ها را تولید می‌کنند و پس از گذراندن دوره طولانی انکوباسیون به رشته‌های بالغ خطی تبدیل می‌شوند (Arosio et al., 2015). در شکل زیر حضور این رشته‌ها که در شرایط بهینه فیبریل‌زایی تولید شده‌اند، با میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

نتایج حاصل از طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD) با روش دورنگ نمایی دورانی میزان درصد تولید رشته‌های آمیلوئیدی بتا در هر یک از آزمایش‌های ۳۰ گانه تعیین شده و نتایج بر حسب درصد در نرم‌افزار Design Expert قرار گرفت. شکل ۳ اثر همزمان دو متغیر را به صورت سه بعدی بر درصد تولید رشته‌های بتا آمیلوئیدی نشان می‌دهد.

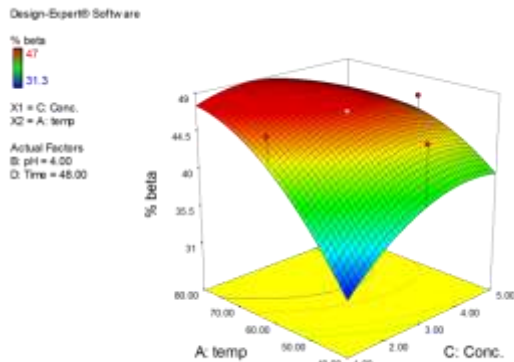


Fig. 3a

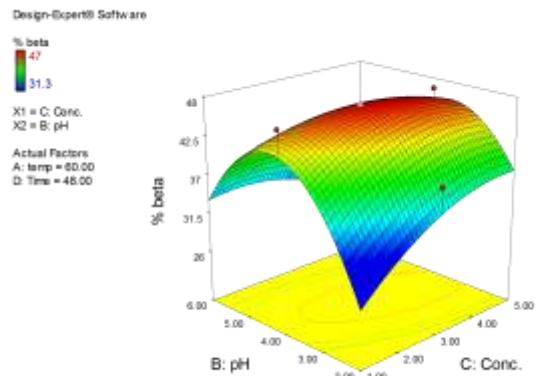


Fig. 3b

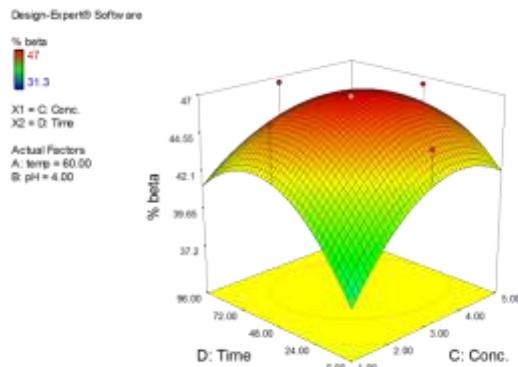


Fig. 3c

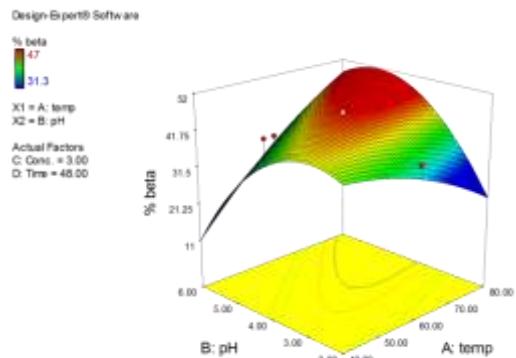


Fig. 3d

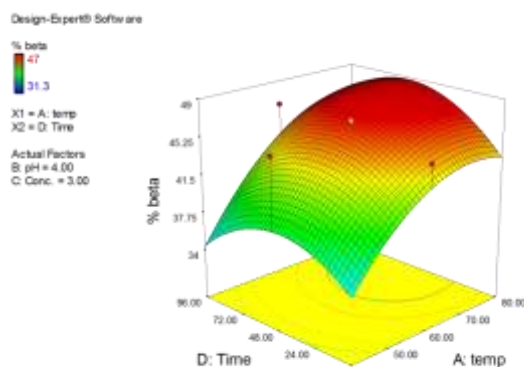


Fig. 3e

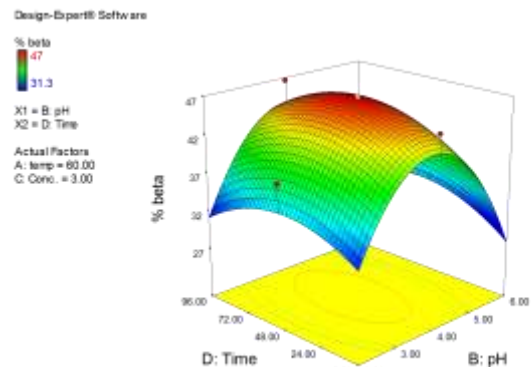
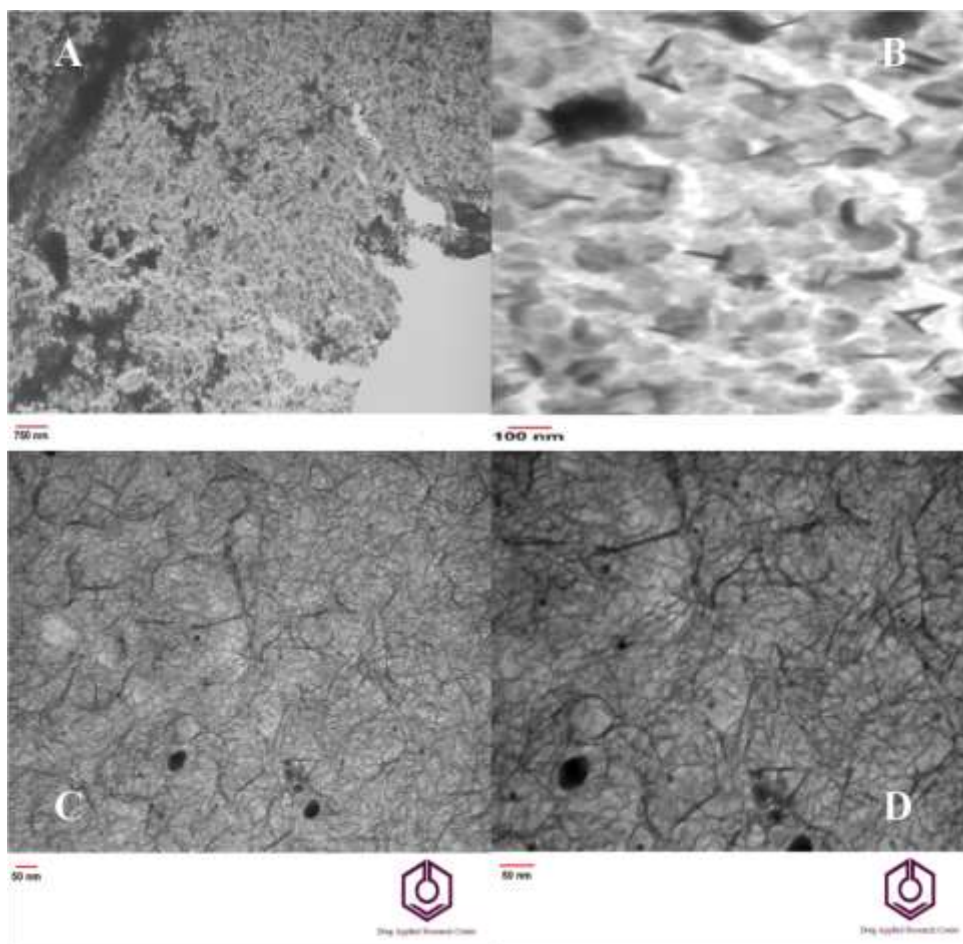


Fig. 3f

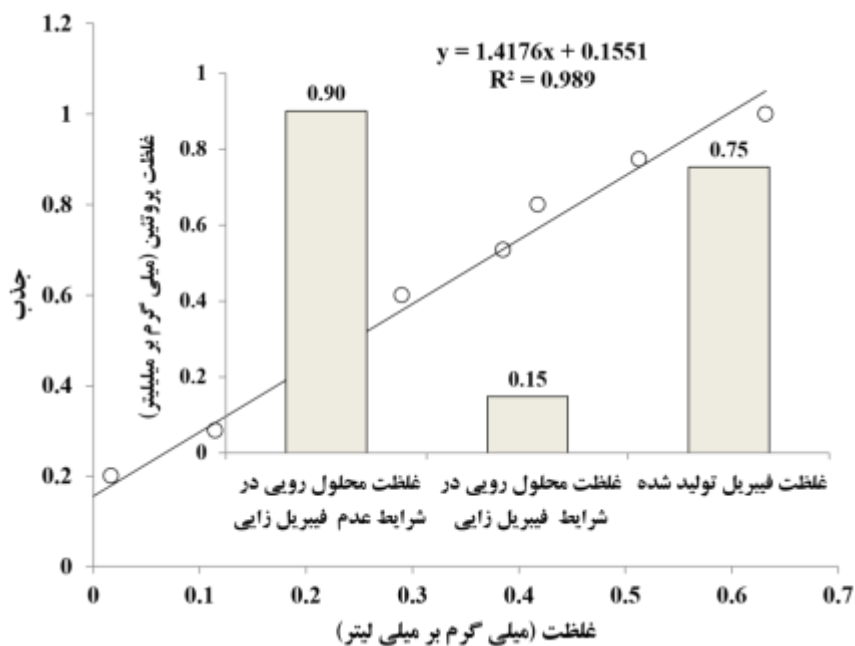
شکل ۳. اثر همزمان دو متغیر بر درصد تولید رشته‌های بتا آمیلوئیدی. (a) غلظت و دما، (b) غلظت و pH، (c) غلظت و زمان، (d) دما و pH، (e) دما و زمان و (f) pH و زمان

حاصل از سانتریفوژ به مدت ۲ ساعت با دور ۳۰ هزار دور در دقیقه) با روش برادفورد، در شرایط فیبریل‌زایی و عدم فیبریل‌زایی با هم مقایسه شوند، آنگاه می‌توان از تفاضل این دو به میزان فیبریل تولیدشده پی برد.

نتایج حاصل از تولید بستر آمیلوئیدی براساس منحنی استاندارد برادفورد (شکل ۵) غلظت فیبریل تولیدی برابر ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. اگر میزان غلظت دقیق پروتئین در محلول رویی



شکل ۴. تصاویر رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی در شرایط بهینه فیبریل‌زایی با بزرگ‌نمایی (A) ۶۰۰۰، (B) ۲۷۸۰۰، (C) ۷۷۵۰۰ و (D) ۱۰۰ هزار برابر



شکل ۵. منحنی استاندارد برادفورد و محاسبه غلظت فیبریل تولیدشده

مقایسه ویژگی‌های سینتیکی لیپاز آزاد و تثبیت‌شده

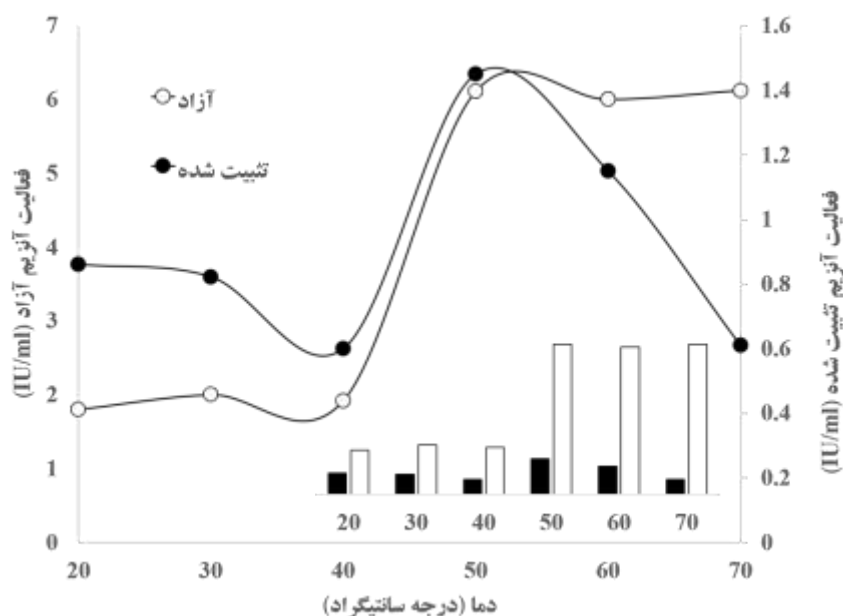
در این پژوهش ویژگی‌های سینتیکی آنزیم لیپاز آزاد و تثبیت شده اندازه‌گیری و با هم مقایسه شد. وزن خالص فیبرهای آمیلوئیدی حاصل از آلبومن سرم گاوی برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و فعالیت آنزیم لیپاز برحسب واحد آنزیمی در میلی‌لیتر ($\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$) با روش رنگ‌سنجی پارانیتروفنیل پالمیتات اندازه‌گیری شد. میزان آنزیم قابل بارگیری بر روی نانو رشته‌های آمیلوئیدی تولید شده به روش ایجاد پل‌های عرضی با گلوټارالدهید، بهینه‌سازی گردید. بر این اساس حداکثر میزان آنزیم قابل تثبیت بر روی رشته‌های آمیلوئیدی ($0/75$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشته تولید شده) برابر $0/8$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. این

کار با سنجش فعالیت آنزیم تثبیت‌شده بر روی رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت‌های مختلف آنزیم انجام شد. پارامترهای سینتیکی آنزیم لیپاز آزاد و تثبیت‌شده بر روی رشته‌های آمیلوئیدی در جدول ۳ با هم مقایسه شده است.

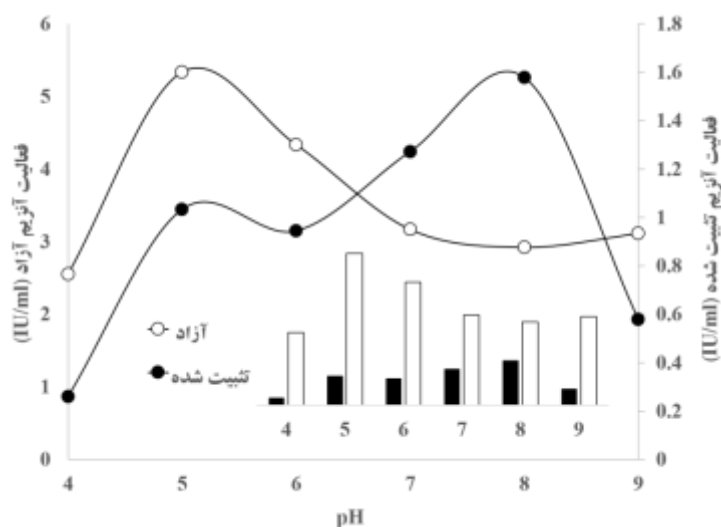
بررسی دمای بهینه در گستره دمایی $20-70$ درجه سانتی‌گراد نشان داد که آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در دمای 50 درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین فعالیت را دارند (شکل ۶)، بنابراین آنزیم مورد بررسی از لیپازهای مقاوم به حرارت طبقه‌بندی می‌شود. بررسی فعالیت آنزیم در گستره pH برابر $4-9$ نیز نشان می‌دهد که pH بهینه آنزیم آزاد از 5 به 8 در آنزیم تثبیت‌شده رسیده و فرایند تثبیت موجب افزایش pH بهینه آنزیم گردیده است (شکل ۷).

جدول ۳. مقایسه پارامترهای سینتیکی آنزیم لیپاز آزاد و تثبیت شده بر روی فیبریل‌های آمیلوئیدی

| لیپاز | فعالیت ($\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$) | فعالیت ویژه | K_m (mM) | V_{max} ($\text{IU}\cdot\text{ml}^{-1}$) | دمای بهینه ($^{\circ}\text{C}$) | pH بهینه |
|-----------|---|-------------|------------|--|-----------------------------------|----------|
| آزاد | $0/966$ | $24/15$ | $589/82$ | $1/95$ | 50 | 5 |
| تثبیت شده | $3/56$ | $167/13$ | $296/76$ | $4/86$ | 50 | 8 |



شکل ۶. مقایسه دمای بهینه لیپاز آزاد و تثبیت‌شده بر روی فیبرهای آمیلوئیدی بین 20 تا 70 درجه سانتی‌گراد



شکل ۷. مقایسه pH بهینه لیپاز آزاد و تثبیت‌شده بر روی فیبرهای آمیلوئیدی بین pH برابر ۴ تا ۹

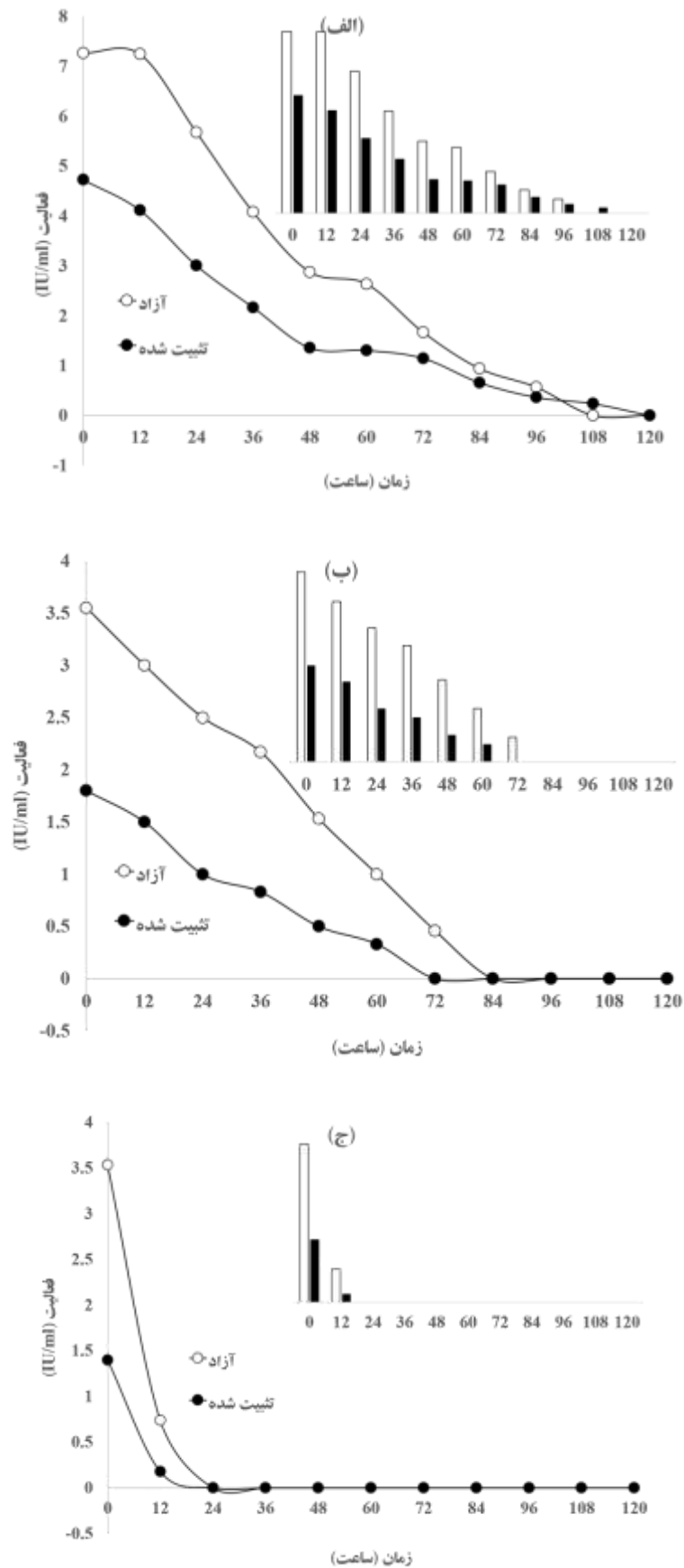
گاوای کلیه ساختارهای ماریپیچ آلفا در دمای بالا به دور هم جمع شده و رشته‌های آمیلوئیدی را به‌وجود می‌آورند. این رشته‌ها از نظر مورفولوژی مانند کرم کشیده هستند (Chan *et al.*, 2012). چنین ساختارهایی را می‌توان با روش‌های اتصال رنگ مثل تیوفلاوین تی (Lindberg *et al.*, 2015) و قرمز کنگو (Millucci *et al.*, 2009; Arasteh *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 2012)، ردیابی و تشخیص داد. آلبومن سرم گاوی به دلیل ارزان و در دسترس بودن به‌عنوان منبع پروتئینی برای فیبریل زایی استفاده شد. برای این کار، پروتئین طبیعی برای زمان مشخصی در شرایط pH پائین (کمتر از pI) و دمای بالا قرار داده شد (Tokunaga *et al.*, 2015). بسیاری از پروتئین‌ها در pHهای بسیار پایین ناپایدار هستند اما، آلبومن سرم گاوی پروتئین پایدار است و استفاده از pHهای پایین به تنهایی موجب القای تشکیل تجمع آمیلوئیدی نمی‌شود. بنابراین در کنار آن از دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. مطالعات پیشین نشان داده که افزایش دما به بیش از دمای فیزیولوژیک می‌تواند تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی را بالا ببرد (Wang *et al.*, 2010).

برای بررسی پایداری حرارتی، میزان فعالیت آنزیم طی ۱۲۰ ساعت، هر ۱۲ ساعت یکبار اندازه‌گیری شد. آنزیم لیپاز آزاد در ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰۸ ساعت و در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۴ ساعت و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت فعالیت خود را حفظ کرد. این در حالی است که آنزیم تثبیت‌شده در دمای ۴۰ درجه به مدت ۱۲۰ ساعت، در ۶۰ درجه به مدت ۷۲ ساعت و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت فعالیت خود را حفظ کرده است (شکل ۸). این بدان معناست که آنزیم تثبیت‌شده فقط در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد پایداری بیشتری نسبت به حالت آزاد داشته است.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات دو رنگ نمایی دورانی^۱ نشان می‌دهد که ساختار دوم آلبومین سرم گاوی دارای ۴۸/۷ درصد ماریپیچ آلفا، ۱۰/۹ درصد دور^۲ و ۳۰/۷ درصد پیچ تصادفی^۳ و فاقد صفحات بتا می‌باشد. در آلبومین سرم

1. Circular dichroism
2. Turn
3. Random coil



شکل ۸. مقایسه پایداری حرارتی لیپاز آزاد و تثبیت‌شده در (الف) ۴۰ درجه، (ب) ۶۰ درجه و (ج) ۸۰ درجه سانتی‌گراد

آنزیمی مناسبی که دارند، ولی آنزیم تثبیت‌شده دارای اتصال ثابت و محکم نبوده و معمولاً پس از چند دور استفاده از بستر جدا می‌شود. در این تحقیق رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک بستر مناسب در تثبیت آنزیم لپاز بر پایه ایجاد پل‌های کوالانسی عرضی حاصل از مولکول‌های گلو تارالدهید مورد استفاده قرار گرفت. این روش نسبت به سایر روش‌ها به علت سهولت بازیابی و احیای کاتالیست و نیز سادگی تخلیص محصولات مورد توجه است. بهبود فعالیت آنزیم، فعالیت ویژه، دما و pH بهینه و پایداری حرارتی در دماهای پایین در آنزیم تثبیت‌شده نسبت به همتای آزاد خود تأییدی بر موفقیت این روش در تثبیت لپاز بوده است. اما معمولاً کاهش فعالیت آنزیم تثبیت‌شده موجب کاهش استفاده از فرآیندهای زیستی نسبت به روش‌های شیمیایی شده است (Cao *et al.*, 2016). بالا بودن V_{max} و K_m پایین برای لپاز تثبیت‌شده تأییدی بر افزایش کارآرایی کاتالیزوری آنزیم تثبیت‌شده نسبت به فرم آزاد بوده است. البته با توجه به این که یک بستر پروتئینی با گروه‌های فعال متنوع و زیاد در دسترس ما قرار گرفته است، استفاده از سایر روش‌های تثبیت آنزیم نیز می‌تواند به عنوان بخشی از دورنمای آینده این تحقیق مطرح شود.

برخی پارامترهای سینتیکی در لپاز تثبیت‌شده بهبود یافته‌اند

لیپازهایی که از منابع آنزیمی مختلف حاصل می‌شوند ویژگی‌های متفاوتی برای واکنش‌های مختلف دارند (Fukuda *et al.*, 2001). در پژوهش حاضر که از لپاز سودوموناس *سیپاسیا* استفاده گردیده حداکثر سرعت واکنش (V_{max}) و ثابت میکائلیس منتن (K_m) مطابق جدول ۳ برای آنزیم تثبیت‌شده و آزاد توسط سرعت اولیه در هیدرولیز پارانیتروفنیل پالمیتات در غلظت‌های مختلف (صفر تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در دما و زمان بهینه اندازه‌گیری شد. مطالعات مشابهی

هدف کلی در بخش اول مطالعه، سنجش توانایی پروتئین آلبومین سرم گاوی با ساختار تمام آلفا برای تشکیل ساختارهای رشته‌ای غنی از صفحات بتا در شرایط مختلف و بهینه‌سازی آن بوده است. در مطالعات مختلف از شرایط متفاوتی برای القای تولید تجمعات آمیلوئیدی در پروتئین آلبومین سرم گاوی استفاده شده است (Holm *et al.*, 2007; Kim & Shin, 2016). در این مطالعه، تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی در شرایط مختلف غلظت پروتئین، دما، pH و زمان با استفاده از روش پاسخ سطح^۱ بهینه‌سازی شد. با توجه به نتایج حاصل از تصاویر سه بعدی، هر گونه تغییر در میزان متغیرهای دخیل در فرایند تولید رشته‌های آمیلوئیدی موجب کاهش میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی به‌عنوان بستر تثبیت آنزیم بوده است. این مطلب به وضوح بیانگر این مطلب است که برای تولید میزان کافی از بستر آمیلوئیدی جهت تثبیت، باید فرایند تولید در بهترین شرایط ممکن انجام شود. از این رو فرایند بهینه‌سازی برای تولید رشته‌های آمیلوئیدی ضروری خواهد بود.

ایجاد پل عرضی روشی مناسب برای تثبیت آنزیم لپاز است

در سال‌های اخیر سنتز بیو کاتالیست‌های تثبیت‌شده با اتصالات کوالانسی به‌عنوان یک روش مناسب مورد توجه قرار گرفته است. از مزایای این روش تثبیت در مقایسه با روش‌های پیوند غیر کوالانسی می‌توان به فعالیت آنزیمی بسیار متمرکز، استحکام بالا و صرفه جویی در هزینه اشاره کرد (Torres *et al.*, 2013). در مقابل در روش‌های پوشینه‌سازی^۲ (Zhao *et al.*, 2013) و جذب سطحی^۳ (Sakai *et al.*, 2010) گذشته از سادگی و سهولت انجام و نیز رهاسازی

1. Response Surface
2. Encapsulation
3. Adsorption

نشان داده شده است نمای زنگوله‌ای برای هر دو آنزیم آزاد و تثبیت‌شده صورت گرفته است (Guit *et al.*, 1991; Ray, 2012; Kumar *et al.*, 2014; Nickpour & Pazouki, 2014). غلظت اپتیمم آنزیم مورد نیاز در فرایند تثبیت اندازه‌گیری شد. در واقع در این مرحله برای غلظت‌های مختلف از آنزیم بر روی فیبریل‌ها، فرایند تثبیت به‌طور جداگانه انجام گرفت. نتایج حاصل میزان ۰/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنزیم لیپاز را به‌عنوان بهترین غلظت آنزیمی نشان دادند. فعالیت آنزیم تثبیت‌شده نسبت به فرم آزاد حدود چهار برابر بیشتر شده است. این مطلب بیانگر افزایش کارایی آنزیم و احتمالاً در دسترس قرارگیری بیشتر جایگاه فعال برای سوبسترا است. فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده نیز حدود ۷ برابر بهبود یافته است. این افزایش در فعالیت ویژه را می‌توان به افزایش چشم‌گیر میزان انعطاف‌پذیری آنزیم طی فرایند تثبیت کوالانسی توسط مولکول‌های گلووتارالدهید مرتبط دانست. مروری بر میزان مقادیر مربوط به K_m و V_{max} نشان می‌دهد پارامتر K_m در مورد آنزیم تثبیت‌شده حدوداً به نصف میزان مربوطه در آنزیم آزاد رسیده است. از آنجائی که پارامتر K_m بیانگر میزان تمایل یا گرایش آنزیم به سوبسترای خود می‌باشد، این مطلب بسیار اهمیت پیدا می‌کند. کاهش میزان K_m نشان می‌دهد که در اثر فرایند تثبیت بهبود زیادی در این پارامتر ایجاد شده و آنزیم تثبیت‌شده نسبت به حضور سوبسترا بسیار حساس‌تر شده است. این مطلب موید این واقعیت است که در حین فرایند تثبیت جایگاه‌های فعال آنزیم تا حد زیادی آزاد باقی مانده و حتی امکان ورود و خروج سوبسترا به دهانه جایگاه فعال تسهیل شده است. بررسی‌ها نشان داد که میزان V_{max} مربوط به آنزیم تثبیت‌شده افزایش حدود دو و نیم برابری داشته است. افزایش سرعت ماکزیمم آنزیم می‌تواند به دلیل افزایش انعطاف لیپاز در اثر فرایند تثبیت باشد که برای فعالیت مناسب آنزیم امری ضروری است.

نشان داده شده است نمای زنگوله‌ای برای هر دو آنزیم آزاد و تثبیت‌شده مشاهده می‌شود و فرایند تثبیت موجب افزایش pH بهینه از ۵ به ۸ شده است. این مطلب اثر فرایند تثبیت را بر ویژگی سینتیکی آنزیم تثبیت‌شده نشان می‌دهد، درحالی‌که فرایند تثبیت تغییر خاصی در دمای بهینه آنزیم تثبیت‌شده ایجاد نکرده و دمای بهینه برای هر دو فرم آنزیمی همان دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد است. این مطلب احتمالاً نشان‌دهنده پایداری و استقامت حرارتی لیپاز است ولی تغییر pH بهینه نشان می‌دهد که تغییر الگوی یونیزاسیون همچنان روی ساختار آنزیم مؤثر است. این مطلب وجود گروه‌های باردار را در سطح لیپاز تثبیت‌شده تأیید می‌کند (Borrelli & Trono, 2015; Luo *et al.*, 2016). پایداری حرارتی در دمای بالا یا پایین به انعطاف‌پذیری و استحکام آنزیم بستگی دارد، به‌طوری‌که یک ساختار سفت و سخت‌تر در درجه حرارت بالا دارای مقاومت بالاتری است (Borrelli & Trono, 2015). هر دو شکل لیپاز آزاد و تثبیت‌شده در مطالعه حاضر در دمای ۸۰ درجه تا ۲۴ ساعت دارای فعالیت بودند. از سوی دیگر تحقیقات پیشین نشان داده که آنزیم تثبیت‌شده بر بستر پروتئینی عمدتاً تحت تأثیر خواص سطحی و توزیع بار پروتئین دارای پایداری بالاتری نسبت به حالت آزاد می‌باشد (Kumar *et al.*, 2014; Nickpour & Pazouki, 2014). در مطالعه حاضر نیز آنزیم تثبیت‌شده لیپاز در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با حفظ فعالیت خود تا ۱۲۰ ساعت، دارای پایداری حرارتی بالاتری نسبت به حالت آزاد (۱۰۸ ساعت) بوده است. با تثبیت آنزیم لیپاز بر روی نانو بیوفیبریل‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی از این پس قادر خواهیم بود تا تمام ویژگی‌های آنزیم اعم از تجزیه لیپید در محیط‌های زیستی را به‌صورت یک مجموعه تثبیت شده بر روی یک زمینه پروتئینی داشته باشیم. این کار در مرحله بعد به ما این امکان را خواهد داد تا آنزیم را به‌عنوان یک کاتالیزگر تثبیت‌شده روی

سپاسگزاری

از تمام دوستانی که ما را در ارتقای کیفی این پژوهش یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

ساختارهای حتی‌المقدور سازگار با سیستم‌های زیست، به‌صورت یک مجموعه زیست‌سازگار در دسترس داشته باشیم.

REFERENCES

- Arasteh, A.; Habibi-Rezaei, M.; Ebrahim-Habibi, A.; Moosavi-Movahedi, A. A.; (2012). Response surface methodology for optimizing the bovine serum albumin fibrillation. *The Protein Journal*; 31(6): 457-465.
- Arosio, P.; Knowles, T. P.; Linse, S.; (2015). On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics*; 17(12): 7606-7618.
- Borrelli, G.M.; Trono, D.; (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences* 16(9): 20774-20840.
- Cao, S.-L.; Huang, Y.-M.; Li, X.-H.; Xu, P.; Wu, H.; Li, N.; Lou, W.-Y.; Zong, M.-H.; (2016). Preparation and characterization of immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* onto magnetic cellulose nanocrystals. *Scientific Reports*; 6: 20420.
- Chan, H.-M.; Xiao, L.; Yeung, K.-M.; Ho, S.-L.; Zhao, D.; Chan, W.-H.; Li, H.-W.; (2012). Effect of surface-functionalized nanoparticles on the elongation phase of beta-amyloid (1-40) fibrillogenesis. *Biomaterials*; 33(18): 4443-4450.
- Clark, T. B.; Ziółkowski, M.; Schatz, G. C.; Goodson III, T.; (2014). Two-photon and time-resolved fluorescence spectroscopy as probes for structural determination in amyloid- β peptides and aggregates. *The Journal of Physical Chemistry B*; 118(9): 2351-2359.
- Dumri, K.; Hung Anh, D.; (2014). Immobilization of lipase on silver nanoparticles via adhesive polydopamine for biodiesel production. *Enzyme Research*; 14-20.
- Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H.; (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of bioscience and bioengineering* 92(5): 405-416.
- Guit, R.; Kloosterman, M.; Meindersma, G.; Mayer, M.; Meijer, E.; (1991). Lipase kinetics: Hydrolysis of triacetin by lipase from *Candida cylindracea* in a hollow-fiber membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering*; 38(7): 727-732.
- Hadizadeh, S. N.; Ranjbar, B.; Khajeh, K.; (2013). Isolation of *Pseudomonas Aeruginosa* Hr59 Lipase From Burn Infection and Optimization of Medium by Use of Box-Behnken Design (BBD); 26(2) 229-241.
- Holm, N.K.; Jespersen, S.K.; Thomassen, L.V.; Wolff, T.Y.; Sehgal, P.; Thomsen, L.A.; Christiansen, G.; Andersen, C.B.; Knudsen, A.D.; Otzen, D.E.; (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*; 1774(9): 1128-38 .
- Kim, D.-Y.; Shin, W.-S.; (2016). Functional improvements in bovine serum albumin-fucoidan conjugate through the Maillard reaction. *Food Chemistry*; 190: 974-981.
- Kim, J., Jia, H.; Wang, P.; (2006). Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*; 24(3): 296-308.
- Kumar, V., Yedavalli, P.; Gupta, V.; Rao, N. M.; (2014). Engineering lipase A from mesophilic *Bacillus subtilis* for activity at low temperatures. *Protein Engineering Design and Selection*; 27(3): 73-82.
- Lindberg, D.J.; Wranne, M.S.; Gatty, M.G.; Westerlund, F.; Esbjörner, E.K.; (2015). Steady-state and time-resolved Thioflavin-T fluorescence can report on morphological differences in

- amyloid fibrils formed by A β (1-40) and A β (1-42). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458(2): 418-423.
- Luo, Q.; Hou, C.; Bai, Y.; Wang, R.; Liu, J.; (2016). Protein assembly: versatile approaches to construct highly ordered nanostructures. *Chemical Reviews*; 116(22): 13571-13632.
- Maldonado, R.; Lopes, D.; Aguiar-Oliveira, E.; Kamimura, E.; Macedo, G.; (2017). A Review on *Geotrichum* Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*; 30(4): 439-454.
- Maldonado, R.R.; Aguiar-Oliveira, E.; Fogaça, F.M.; Ramos, G.G.; Macedo, G.A.; Rodrigues, M.I.; (2015). Evaluation of partial purification and immobilization of lipase from *Geotrichum candidum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*; 4(3): 321-326.
- Milani, E.; Poorazarang, H.; Khah, S.; Vakilian, H.; (2010). Optimization of inulin extraction from *Helianthus tuberosus* using response surface methodology (RSM). *Iranian Food Science & Technology Research Journal*; 6(3): 176-183.
- Millucci, L.; Raggiacchi, R.; Franceschini, D.; Terstappen, G.; Santucci, A.; (2009). Rapid aggregation and assembly in aqueous solution of A β (25–35) peptide. *Journal of Biosciences*; 34(2): 293-303.
- Nickpour, M.; Pazouki, M.; (2014). Synthesis and characteristics of mesoporous sol-gels for lipase immobilization. *Int J Eng*; 27: 1495-1502.
- Pilkington, S.M.; Roberts, S.J.; Meade, S.J.; Gerrard, J.A.; (2010). Amyloid fibrils as a nanoscaffold for enzyme immobilization. *Biotechnology Progress*; 26(1): 93-100.
- Ray, A.; (2012). Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*; 2(2): 33-37.
- Ren, Y.; Rivera, J.G.; He, L.; Kulkarni, H.; Lee, D.-K.; Messersmith, P.B. (2011). Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC Biotechnology*; 11(1): 63.
- Sakai, S.; Liu, Y.; Yamaguchi, T.; Watanabe, R.; Kawabe, M.; Kawakami, K.; (2010). Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto electrospun polyacrylonitrile fibers through physical adsorption and application to transesterification in nonaqueous solvent. *Biotechnology Letters*; 32(8): 1059-1062.
- Taha, M.; Quental, M.V.; Correia, I.; Freire, M.G.; Coutinho J.A.; (2015). Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids. *Process Biochemistry*; 50(7): 1158-1166.
- Tokunaga, Y.; Matsumoto, M.; Sugimoto, Y.; (2015). Amyloid fibril formation from a 9 amino acid peptide, 55th–63rd residues of human lysozyme. *International Journal of Biological Macromolecules*; 80: 208-216.
- Torres, M.D.P.G.; Foresti, M.L.; Ferreira, M.L.; (2013). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity. *AMB Express*; 3(1): 25.
- Venkatesagowda, B.; Ponugupaty, E.; Barbosa, A.M.; Dekker, R.F.; (2012). Diversity of plant oil seed-associated fungi isolated from seven oil-bearing seeds and their potential for the production of lipolytic enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 28(1): 71-80.
- Wang, W.; Nema, S.; Teagarden, D.; (2010). Protein aggregation-Pathways and influencing factors. *International Journal of Pharmaceutics*; 390(2): 89-99.
- Zare Baghi Abad, V.; Tabatabai Yazdi, F.; Mortazavi, S.; Varidi, M.; (2016). Isolation and identification of lipolytic yeasts from sesame meal of Yazd province and determination the potential

of lipase production by them. *Journal of Food Science & Technology*; (2008-8787) 13(51).
Zhao, Z.Y.; Liu, J.; Hahn, M.; Qiao, S.; Middelberg, A.P.; He, L.; (2013).

Encapsulation of lipase in mesoporous silica yolk-shell spheres with enhanced enzyme stability. *RSC Advances*; 3(44): 22008-22013.