

Paper Type: Original Article



Immobilization of Cellulase enzyme from *Aspergillus niger* on amyloid nanofibers and its kinetic comparison with the free enzyme

Marzieh Rashvand¹, Amir Arasteh^{2*} , Hashem Nayyeri¹

¹ Department of biology, falavarjan Branch, Islamic Azad University, falavarjan, Isfahan, Iran.

² Department of biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran; *(Assistant Professor: Corresponding author: arasteh@iau.ac.ir)

Citation:

Rashvand, M., Arasteh, A., Nayyeri, H., (2024). Immobilization of Cellulase enzyme from *Aspergillus niger* on amyloid nanofibers and its kinetic comparison with the free enzyme. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 2), PP. 15-26.

Received:2022.10.31.

Accepted: 2023.6.12

Abstract

Introduction: Many proteins can be converted into amyloid in the laboratory. These fields are of interest from various points of view, including as a substrate for enzyme stabilization. In this research, cellulase enzyme was immobilized on amyloid nano-biofibrils obtained from bovine serum albumin and its kinetic properties were compared with the free form.

Methods: The production of amyloid fibers was optimized by Congored absorbance and ThT fluorescence assay methods and was confirmed by transmission electron microscopy. Cellulase enzyme was immobilized via glutaraldehyde cross-linking bridges on amyloid nano-biofibrils.

Results: The results of Congored absorbance and ThT fluorescence emission showed that the maximum amyloid fibers at 4 mg/ml of protein concentration, 60 °C and a pH 3. Electron microscopy images confirmed the presence of amyloid fibers. Immobilizing the enzyme decreased the activity, specific activity and V_m and increased the K_m of the enzyme. The optimum temperature of the enzyme increased from 40 to 50 °C.

Discussion: Amyloid nano-biofibrils can be used as a new nano-biomaterial for cellulase immobilization which introduce a useful product in cellulase-related industries.

Keywords: Bovine serum albumin, Amyloid, Immobilization, Cellulase, Nano-fibrils



تثبیت آنزیم سلولاز قارچ اسپرژیلوس نایجر روی نانورشته‌های آمیلوئیدی و مقایسه سینتیکی آن با آنزیم آزاد

مرضیه رشوند^۱، امیر آراسته^{۲*}، هاشم نیری^۱

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران.

^۲استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

(*نویسنده مسئول: arasteh@iau.ac.ir)

^۳استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، فلاورجان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۸/۹

چکیده

مقدمه: بسیاری از پروتئین‌ها را می‌توان در آزمایشگاه به آمیلوئید تبدیل کرد. این رشته‌ها از دیدگاه‌های گوناگون به‌عنوان بستری برای تثبیت آنزیم مورد توجه است. در این تحقیق آنزیم سلولاز روی نانورشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی تثبیت و خصوصیات سینتیکی آن با فرم آزاد مقایسه شد.

روش‌ها: تولید رشته‌های آمیلوئیدی با روش‌های جذب‌سنجی کنگورد و نشر فلورسانس ThT بهینه‌سازی شد و با میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تأیید قرار گرفت. آنزیم سلولاز به کمک گلو تارالدئید و با تشکیل پل‌های عرضی روی نانورشته‌های آمیلوئیدی تثبیت شد و ویژگی‌های سینتیکی آن با آنزیم آزاد مقایسه گردید.

یافته‌ها: جذب‌سنجی کنگورد و نشر فلورسانس ThT نشان داد که حداکثر رشته‌های آمیلوئیدی در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۳ تشکیل می‌شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره حضور رشته‌های آمیلوئیدی را تأیید کرد. تثبیت آنزیم، میزان فعالیت، فعالیت ویژه و V_m را کاهش و میزان K_m آنزیم را افزایش داد و دمای بهینه آنزیم از ۴۰ به ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: رشته‌های آمیلوئیدی می‌توانند به‌عنوان یک نانوماده جدید در تثبیت آنزیم سلولاز مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، آنزیم تثبیت شده را می‌توان به‌عنوان یک محصول کاربردی در صنایع وابسته به سلولاز معرفی نمود.

کلیدواژه‌ها: آلبومین سرم گاوی، آمیلوئید، تثبیت، سلولاز، نانورشته

مقدمه

سلولز فراوان‌ترین بیوپلیمر موجود در طبیعت است و به‌عنوان بهترین شکل ذخیره‌ی کربن برای تولید انرژی، غذا و مواد شیمیایی مورد نیاز انسان در نظر گرفته شده است. مواد سلولزی منابع تجدید پذیر فراوانی هستند که می‌توانند به‌عنوان بستری برای تولید مواد شیمیایی و سوخت اتانول توسط تغییرات شیمیایی و آنزیمی به‌کار برده شوند [1]. برای تجزیه و دسترسی به این منبع با ارزش، نیاز به آنزیم تجزیه‌کننده اختصاصی سلولز یا همان سلولاز است [2]. آنزیم سلولاز، آنزیمی صنعتی است که توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شود و در زمینه‌های مختلف از جمله مواد غذایی، کشاورزی، نساجی، مواد شوینده، خوراک دام، صنایع خمیر و کاغذسازی و همچنین در توسعه تحقیقات کاربرد دارد. تثبیت سلولاز علاوه بر حفظ فعالیت آنزیم در حین واکنش، امکان استفاده مکرر از آن را فراهم می‌آورد [3].

آمیلوئیدها دارای ساختار رشته‌ای و بدون انشعاب با قطر بین ۷-۱۲ نانومتر هستند که بسته به نوع رشته از چندین پروتوفیبریل به قطر تقریبی ۲۵-۳۵ نانگستروم تشکیل شده‌اند [4]. این پروتوفیبریل‌ها به صورت موازی در طول محور فیبریل و به صورت مارپیچ در کنار یکدیگر آرایش یافته‌اند. هر پروتوفیبریل از دو یا سه رشته تشکیل شده است که عرض هر کدام ۱۵-۱۰ نانگستروم می‌باشد، که به صورت مارپیچ قرار گرفته‌اند [5]. تشکیل این نانو رشته‌ها ناشی از فرایند تجمع پروتئین است. تجمع پروتئین (Protein aggregation) فرایندی است که طی آن مولکول‌هایی که در حالت طبیعی به شکل مونومر یا لیگومرهای کوچک محلول وجود دارند، به یکدیگر متصل شده و ذرات پروتئینی درشت‌تری را تشکیل می‌دهند [6]. تجمع پروتئین یک فرایند برگشت‌ناپذیر و حاصل ارتباط خودبخودی چندین ملکول پروتئین مشابه از طریق تماس‌های درون مولکولی است که ممکن است هر پروتئین به سمت ایجاد آن‌ها حرکت کند [7]. عوامل موثر بر تجمع پروتئین‌ها را می‌توان به دو دسته درونی و برونی تقسیم کرد. بار الکتریکی، خاصیت آبگریزی، الگوی قرارگیری آمینواسیدها و استعداد تشکیل موتیف‌های ثانویه، از عوامل درونی و دما، pH، قدرت یونی، یون‌های فلزی، غلظت پروتئین، منبع پروتئین، مواد افزودنی، سطوح تماسی، نور، پرتودهی و حلال‌های آلی از عوامل بیرونی تجمع پروتئین هستند [8]. پروتئین آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یکی از پروتئین‌های ارزان و در دسترس می‌تواند مدل خوبی برای بررسی فرایند تجمع و فیبریل‌زایی است. این پروتئین نقش بالقوه و مهمی در سازگاری نسجی بدن دارد و از این رو به‌کارگیری آن از این منظر می‌تواند نانومواد جدیدی را در عرصه نانو تکنولوژی به ما معرفی کند. در این تحقیق از نانو رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی برای تثبیت آنزیم سلولاز استفاده شد. استفاده از نانو رشته‌های آمیلوئیدی برای سیستم‌های زنده به‌عنوان یک بستر برای تثبیت آنزیم، با توجه به ماهیت زیستی آن‌ها و ابعاد نانو که دارند، می‌تواند نوآوری و ضرورت انجام این تحقیق را نشان دهد [9].

مواد و روش‌ها

مواد

آلبومین سرم گاوی، تیوفلاوین T، کنگورد و سدیم آزید از شرکت سیگما (St Louis, MO, USA)، رنگ کوماسی بریلیانت بلو، گلیسین، سایر نمک‌ها و مواد شیمیایی از برند شرکت مرک (Merck-Germany-Darmstadt) و آنزیم سلولاز از اسپرژیلوس نایجر از برند شرکت سیگما تهیه شد.

القای تجمع آمیلوئیدی در آلبومین سرم گاوی

پروتئین آلبومین سرم گاوی در بافر مخلوط سترات-فسفات با pH های مختلف و حاوی ۰/۰۵ درصد وزنی/حجمی سدیم آزید (جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی و قارچی) حل شد و غلظت پروتئین به وسیله روش سنجش کمی برادفورد اندازه‌گیری گردید. در این مطالعه، آلبومین سرم گاوی در غلظت‌های ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و دماهای ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در بافر با pH برابر ۳ و ۴ و ۵ به سمت تشکیل تجمعات آمیلوئیدی تحریک شد [10].

جذب نسجی کنگورد

در این روش یک خوانش جذب نوری از ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر از نمونه آمیلوئیدی در مقابل بافر کنگورد به دست آمد. در این محدوده مولکول کنگورد به تنهایی، حداکثر جذب را در طول موج ۴۸۵ نانومتر دارد و در صورت تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی، این میزان تا بیش از ۵۰۰ نانومتر افزایش پیدا می‌کند. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین تجمع یافته با ۱۹۰۰ میکرولیتر از بافر کنگورد مخلوط شده و برای ۱۰ دقیقه به منظور تثبیت رنگ در دمای ۲۵ درجه آزمایشگاه گرفت. از دستگاه طیف سنج مرئی (Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer) برای خوانش جذب نوری از ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر استفاده شد. بافر کنگورد حاوی ۲۰ میکرومولار از رنگ کنگورد در بافر PBS (شامل ۱۴۰ میلی مولار NaCl، ۲/۵ میلی مولار KCl، ۱۰ میلی مولار Na_2HPO_4 و ۲ میلی مولار KH_2PO_4) با pH برابر ۷/۴ است. محلول بافر پس از عبور از فیلترهایی با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر، در ظرف تیره و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [10].

فلوریمتری

رنگ تیوفلاوین T (ThT) با قرار گرفتن در بین زنجیره‌های بتا در رشته‌های آمیلوئیدی باعث افزایش نشر آن می‌گردد. بنابراین به منظور بررسی تشکیل فیبریل‌ها معمولاً از نشر فلورسانس ThT استفاده می‌شود. پروتئین آلبومین سرم گاوی به نسبت ۱ به ۲۰ (۲۰:۱) با رنگ ThT مخلوط شد و طیف نشر فلورسانس آن با دستگاه اسپکتروفلورومتر کری اکلپس واریان (Cary Eclipse VARIAN) در طول موج ۴۸۲ نانومتر خوانده شد. برای این کار ۹۳۶ میکرولیتر ThT به غلظت ۲۰ میکرومولار با ۶۴ میکرولیتر نمونه پروتئینی به غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر به مدت ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. در واقع هر ۶۴ میکرولیتر محلول ۱ میلی گرم بر میلی لیتر پروتئین، غلظت یک میکرومولار دارد. طول موج تحریک ۴۵۰ نانومتر و طیف نشری در محدوده ۴۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد [11].

میکروسکوپ الکترونی گذاره

نمونه‌های آمیلوئیدی پس از رقیق سازی و با غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، برای مدت ۴۵ ثانیه روی گرید مسی پوشیده از فرموار (Formvar) قرار گرفت و مقادیر اضافه با کاغذ صافی زدوده شد. سپس نمونه‌ها با محلول ۳ درصد وزنی اورانیل استات به مدت یک دقیقه شستشو شد و باز مقادیر اضافه با کاغذ صافی برداشته شد. سپس گرید مسی به مدت دو ساعت در دمای آزمایشگاه، خشک شد و با میکروسکوپ الکترونی گذاره (عبوری) مدل Philips EM 208(S) در ولتاژ ۷۵ کیلو ولت تصویر برداری گردید [11]. از بزرگ‌نمایی ۲۰ تا ۸۰ هزار برابر استفاده شد.

تثبیت آنزیم سلولاز با ایجاد پل‌های عرضی به کمک گلو تار آلدئید

برای تثبیت آنزیم، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول آمیلوئیدی که پس از تشکیل فیبریل در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و pH ۳ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمده، در ۱۳۰۰۰ دور و به مدت ۲ ساعت سانتریفوژ گردید و سپس ۴۰۰ میکرولیتر از محلول رویی دور ریخته شد. به ۱۰۰ میکرولیتر باقی مانده در انتهای میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر گلو تار آلدئید با غلظت ۳۰۰ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر محلول آنزیم سلولاز با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (در آب مقطر رقیق شد) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روی دستگاه استیرر به هم زده شد [12].

تعیین فعالیت به‌روش سوموگی نلسون و ویژگی‌های سینتیکی آنزیم

به منظور تعیین فعالیت آنزیم از غلظت‌های مختلف گلوکز از ۱۰ تا ۵۰ میکرومولار، به عنوان استاندارد استفاده شد و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. میزان گلوکز تولید شده در محلول مورد آزمایش که در مجاورت آنزیم سلولاز و در حضور سوبسترای سلولز تولید شده است، به عنوان فعالیت آنزیم بر حسب مول بر دقیقه معرفی شد. میزان گلوکز با میزان جذب نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر در مدت یک دقیقه رابطه مستقیم دارد [13].

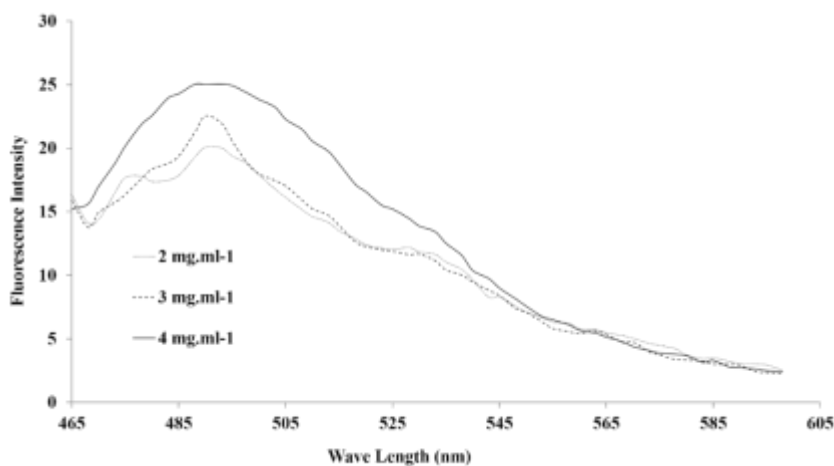
تعیین کمی پروتئین به روش برادفورد

برای این منظور غلظت‌های مختلف استاندارد از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه شد و میزان جذب نوری هر نمونه پس از واکنش با معرف بردفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده و منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار اکسل رسم گردید. میزان غلظت پروتئین در نمونه پس از واکنش با معرف بردفورد، تابعی از میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر است [14].

نتایج

بررسی روند فیبریل‌زایی با تغییرات غلظت پروتئین، pH و دما

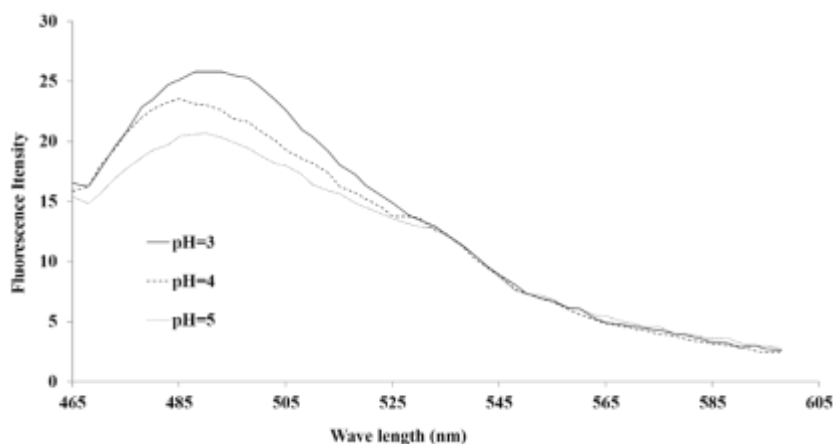
برای بررسی اثر غلظت، دما و pH، میزان تغییرات λ_{max} در محدوده ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر با استفاده از روش جذب سنجی کنگورد بررسی شد و میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی با تغییرات λ_{max} در محلول ردیابی شد. همچنین از روش نشر فلورسانس ThT نیز در تعیین میزان رشته‌های آمیلوئیدی استفاده گردید. برای بررسی روند فیبریل‌زایی، غلظت‌های ۲ و ۳ و ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، pH های ۳ و ۴ و ۵ و دماهای ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین شرایط بهینه فیبریل‌زایی از روش سنجش نشر فلورسانس ThT نیز استفاده شد. این مطالعه بر مبنای شرایط بهینه استنتاج شده از طیف سنجی کنگورد طراحی شد و اثر هر متغیر در مقادیر ثابت و بهینه از دو متغیر دیگر مورد سنجش قرار گرفت. شکل‌های ۱ و ۲ و ۳ به ترتیب اثر غلظت، pH و دما را بر روند فیبریل‌زایی نشان می‌دهد. همانطور که در شکل نشان داده شده است، بالاترین میزان نشر فلورسانسی مربوط به غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین در محلول مورد آزمایش است.



شکل ۱- روند فیبریل‌زایی با تغییرات غلظت پروتئین. شدت نشر فلورسانس ThT در غلظت‌های مختلف از آلبومین سرم گاوی در شرایط بهینه فیبریل‌زایی (pH برابر ۳ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد)

Figure 1- The process of fibril formation with changes in protein concentration. ThT fluorescence emission intensity in different concentrations of bovine serum albumin in optimal conditions of fibril formation (pH 3 and temperature 60 °C)

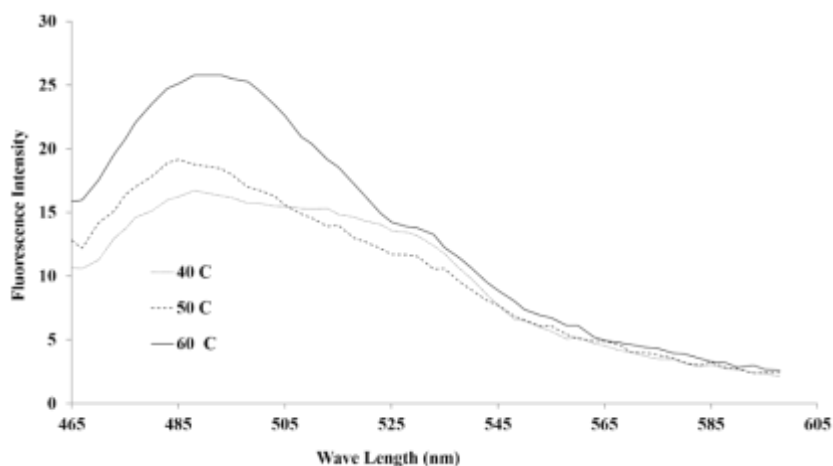
بررسی اثرات pH بر تولید رشته‌های آمیلوئیدی در محدوده اسیدی و منطبق با شرایط بهینه تولید رشته‌های آمیلوئیدی انجام گرفت تا ارزش بررسی و تفسیر داشته باشد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، بیشترین میزان نانورشته‌های آمیلوئیدی در ۳ pH تولید شده است که بیش‌ترین میزان نشر فلورسانس را دارد.



شکل ۲- روند فیبریل زایی با تغییرات pH. شدت نشر فلورسانس ThT در pH های مختلف و در شرایط بهینه فیبریل زایی (غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد)

Figure 2- Fibril formation process with pH changes. ThT fluorescence emission intensity at different pH and in optimal conditions of fibril formation (concentration of 4 mg/ml of protein and temperature of 60 °C)

با توجه به این که نتایج قبلی حاکی از بیشترین میزان فیبریل زایی در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر و pH ۳ بوده است، در این بخش نتایج تغییرات دمایی در غلظت و pH مذکور بررسی شده است. نتیجه بررسی با روش فلورسانس ThT بیشترین میزان نشر فلورسانس را در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد نشان می دهد (شکل ۳).

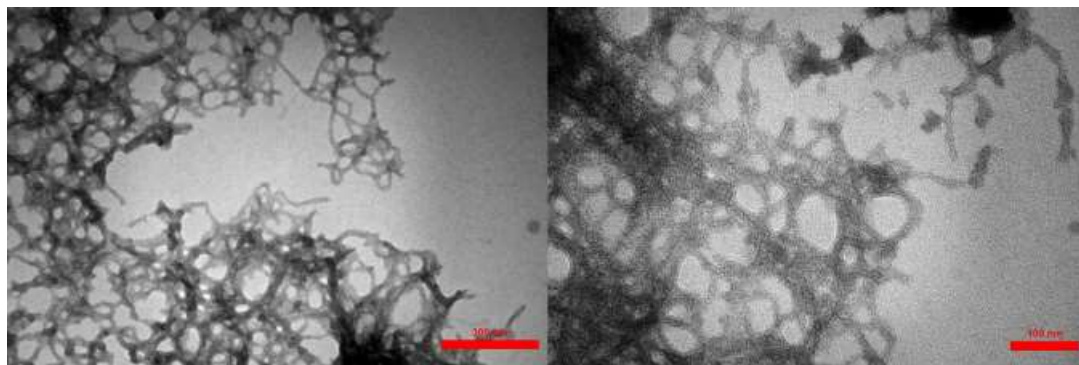


شکل ۳- روند فیبریل زایی با تغییرات دما. شدت نشر فلورسانس ThT در دماهای مختلف و در شرایط بهینه فیبریل زایی (غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین و pH برابر ۳)

Figure 3- Fibril formation process with temperature changes. ThT fluorescence emission intensity at different temperatures and under optimal conditions of fibril formation (concentration of 4 mg/ml of protein and pH 3)

تائید حضور رشته‌های آمیلوئیدی با میکروسکوپ الکترونی گذاره

این روش یکی از مهم‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده برای اثبات وجود تجمعات آمیلوئیدی است. تصاویر به دست آمده با بزرگنمایی ۱۰۰ هزار برابر، ساختارهای رشته‌ای تجمعات آمیلوئیدی را به طور واضح نشان می دهد. بر این اساس، رشته های آمیلوئیدی، رشته‌هایی با طول ۳۰۰ و قطر حدود ۲۰ نانومتر است که در تصاویر مشخص است (شکل ۴).



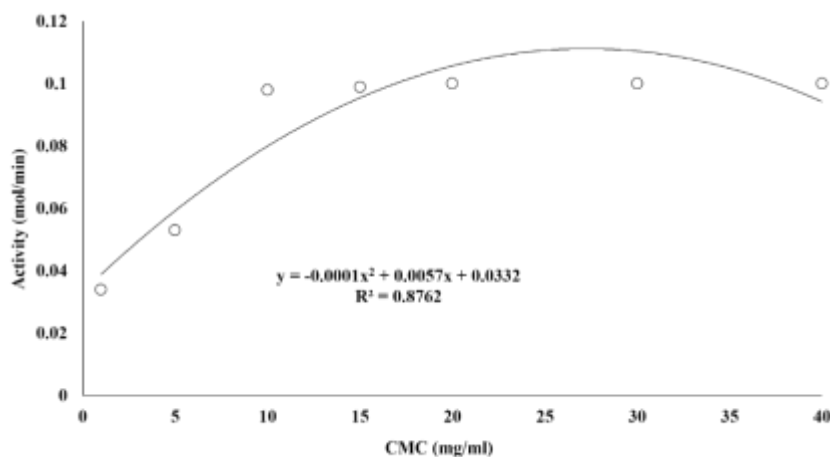
شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نانورشته‌های به‌دست آمده در شرایط بهینه فیبریل زایی

Figure 4- Electron microscope images of nano-fibrils obtained under optimal conditions of fibril formation

نتایج حاصل از تعیین فعالیت و ویژگی‌های سینتیکی آنزیم سلولاز

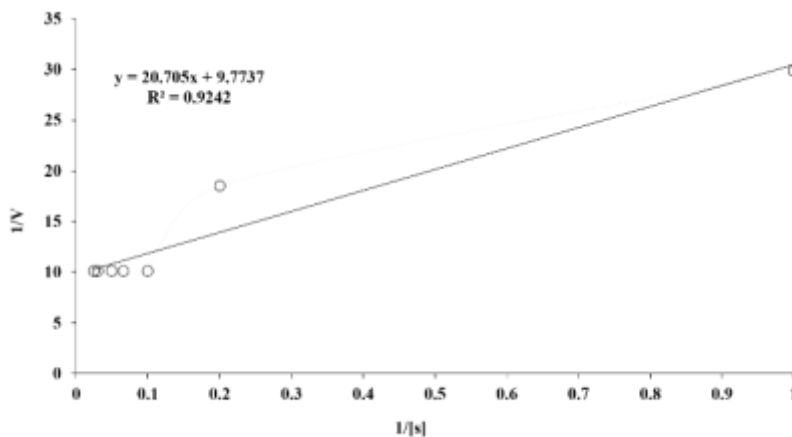
در تعیین میزان فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده، هر یک برای ۳۰ دقیقه در معرض معرف های سوموگی نلسون قرار گرفتند. در هر مورد این مقادیر بر وزن مولکولی گلوکز تقسیم شد و سپس این مقدار بر عدد ۳۰ تقسیم شد تا میزان فعالیت آنزیم بر حسب مول بر دقیقه محاسبه گردد. میزان فعالیت آنزیم سلولاز آزاد برابر ۰/۰۸ و فعالیت آنزیم تثبیت شده معادل ۰/۰۵ مول بر دقیقه محاسبه شد.

برای محاسبه میزان فعالیت ویژه آنزیم، فعالیت آن بر تعداد میلی گرم از آنزیم موجود در محیط واکنش تقسیم گردید. میزان فعالیت ویژه آنزیم آزاد ۰/۰۲۷ و فعالیت ویژه آنزیم تثبیت شده معادل ۰/۰۱۹ مول بر دقیقه بر میلی گرم محاسبه گردید. برای محاسبه مقادیر V_{max} و K_m از معادله لاین ویور برک استفاده شد. بدین صورت که ابتدا مقادیر معکوس فعالیت و غلظت سوبسترا محاسبه و پس از رسم نمودار لاین ویور برک مقادیر V_{max} و K_m محاسبه گردید (شکل ۵ و ۶).



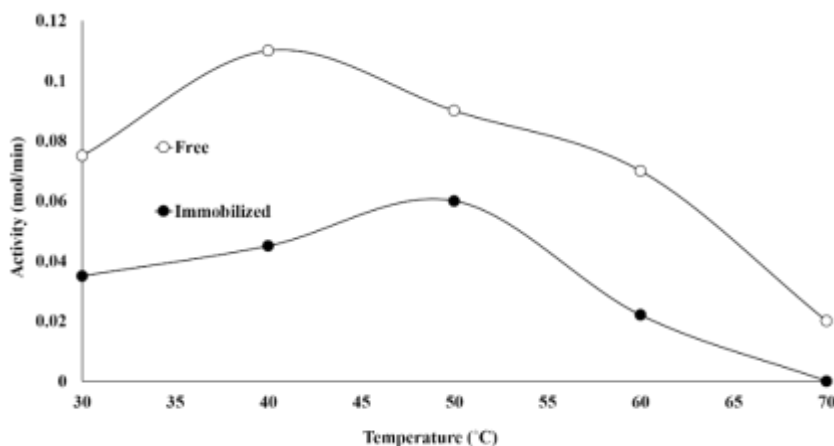
شکل ۵- نمودار میکائلیس-منتن مربوط به آنزیم سلولاز تثبیت شده

Figure 5- Michaelis-menten diagram related to immobilized cellulase enzyme

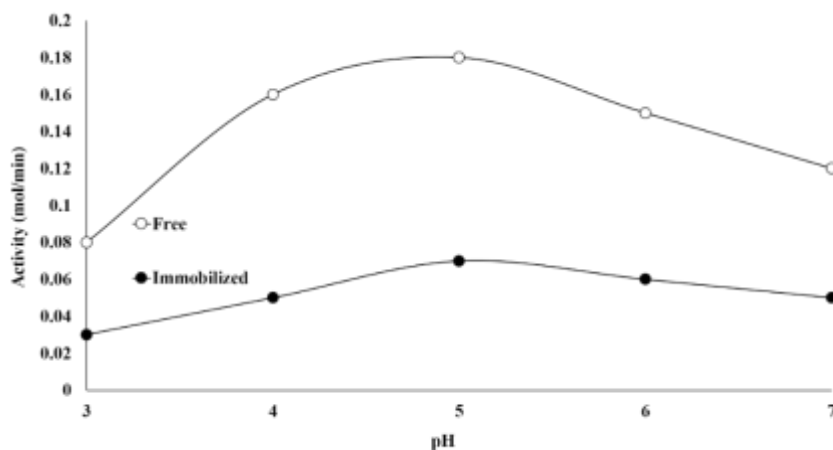


شکل ۶- نمودار لاینویور-برک مربوط آنزیم سلولاز تثبیت شده
Figure 6- lineweaver burk plot of immobilized cellulase enzyme

نتایج نشان می‌دهد، میزان K_m در آنزیم آزاد و تثبیت شده به ترتیب برابر 0.27 و 0.102 مول و میزان V_{max} در آنزیم آزاد و تثبیت شده به ترتیب برابر $7/525$ و $2/11$ مول بر دقیقه است. در این مطالعه نتایج حاصل از تعیین دما و pH بهینه آنزیم در حالت آزاد و متصل به صورت نمودارهای فعالیت آنزیمی در برابر دما و pH رسم گردیده که نتایج به صورت زیر است. بر اساس نتایج حاصل، میزان دمای بهینه آنزیم تثبیت شده (50 درجه سانتی‌گراد) نسبت به فرم آزاد (40 درجه سانتی‌گراد)، 10 درجه افزایش یافته است (شکل ۷ و ۸). ویژگی‌های سینتیکی آنزیم سلولاز آزاد و تثبیت شده به صورت مقایسه‌ای در جدول ۱ نشان داده شده است. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد و مقادیر ($P < 0.05$) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. تغییرات فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در تمام دماها و مقادیر pH، معنی‌دار بود.



شکل ۷- نمودار مقایسه‌ای دمای بهینه آنزیم آزاد (○) و تثبیت شده (●)
Figure 7- Comparative diagram of optimal temperature for free (○) and immobilized (●) enzyme



شکل ۸- نمودار مقایسه ای pH بهینه آنزیم آزاد (○) و تثبیت شده (●)

Figure 8- Comparison plot of optimal pH for free (○) and immobilized (●) enzyme

جدول ۱- مقایسه فاکتورهای سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده

Table 1- Comparison of kinetic factors of free and immobilized enzyme

Kinetic Factor	Free Cellulase Enzyme	Immobilized Cellulase Enzyme
Activity (mol/min)	0.08	0.05
Specific Activity (mol/min.mg)	0.027	0.019
K_m (M)	0.27	0.102
V_{max} (mol/min)	7.525	2.11
Optimum Temperature (C°)	40	50
Optimum pH	5	5

میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده بر روی نانوبیوفیبریل‌های آمیلوئیدی کمتر از فعالیت آنزیم آزاد بوده است. روند مشابهی که در فعالیت ویژه دیده می‌شود، نشان دهنده کاهش فعالیت آنزیم در اثر تثبیت بر روی فیبریل‌های آمیلوئیدی است. این کاهش در فعالیت ویژه را می‌توان نتیجه کاهش میزان انعطاف پذیری آنزیم طی فرایند تثبیت کوالانسی توسط مولکول‌های گلووتارالدهید دانست. پژوهشگران در سال ۲۰۱۸ نیز نتایج مشابهی در تثبیت آنزیم سلولاز مربوط به *آسپرژیلوس نایجر* روی نانولوله‌های کربنی گزارش نمودند، همچنین میزان V_m را نیز در این مطالعه نشان دادند [15]. کاهش میزان فعالیت می‌تواند با کاهش میزان V_m یا افزایش میزان K_m همراه باشد. از این رو مقادیر مربوط به این پارامترها نیز با هم مقایسه شده و نتایج بسیار جالبی بدست آمد. از آنجائی که K_m بیانگر میزان تمایل یا گرایش آنزیم به سوبسترای خود است، این مطلب بسیار اهمیت پیدا می‌کند. افزایش میزان K_m در اثر فرایند تثبیت نشان می‌دهد که بهبود زیادی در این پارامتر ایجاد نشده و آنزیم تثبیت شده نسبت به حضور سوبسترا حساسیت کمتری پیدا کرده است [16]. این مطلب موید این واقعیت است که در حین فرایند تثبیت جایگاه‌های فعال آنزیم تا حد زیادی اشغال شده و امکان ورود و خروج سوبسترا به دهانه جایگاه فعال کمتر شده است. میزان V_{max} آنزیم تثبیت شده و آزاد در این تحقیق برابر ۷/۵۲۵ و ۲/۱۱ است. کاهش V_{max} آنزیم تثبیت شده نسبت به سلولاز آزاد نشانگر آن است که آنزیم با مقدار کمتری از سوبسترا اشباع می‌شود و فعالیت خود را به حد بیشینه رسانده است. در واقع جایگاه فعال آنزیم تثبیت شده با مقدار کمتری از سوبسترا نسبت به جایگاه فعال آنزیم آزاد پر شده است و فعالیت آنزیم، پس از تثبیت کاهش یافته است [17]. بررسی الگوی فعالیت آنزیم در دماهای مختلف (دمای بهینه) نشان داد آنزیم تثبیت شده نسبت به شکل آزاد، دماهای بالاتر را بهتر تحمل می‌کند. در عین حال، آنزیم تثبیت شده به خوبی شکل آزاد در تمامی دماها فعالیت خود را حفظ کرده است. این نتایج در بررسی صادقی و همکاران در سال ۲۰۲۳ نیز مورد تأیید قرار گرفت [18]. الگوی تغییرات فعالیت با pH نیز در میزان بهینه شبیه به شکل آزاد بوده ولی دامنه تحمل شکل تثبیت شده برای فاکتور pH افزایش قابل توجهی داشته است، به طوری که در pH های مختلف میزان فعالیت آنزیم تغییر چندانی نداشته است. در واقع تثبیت آنزیم آن را در برابر pH پایدارتر کرده است. این نتایج در مطالعه احمد و همکاران نیز که بیشترین فعالیت آنزیم (آزاد و تثبیت شده) را در pH برابر ۵ گزارش کردند، نیز تأیید شده است [15]. در مطالعه دیگری که توسط Hojnik و همکاران در سال ۲۰۱۹ انجام شد، آنزیم سلولاز با استفاده از گلووتارالدهید و با روش ایجاد پل‌های عرضی تثبیت گردید.

در این مطالعه نیز فعالیت آنزیم تثبیت شده نسبت به فرم آزاد کاهش نشان داشت، ولی قابلیت استفاده مجدد از آنزیم افزایش قابل توجهی را از خود نشان داد [19].

در این مطالعه فرایند تولید رشته‌های آمیلوئیدی در دما، غلظت و pH های مختلف بهینه سازی شد. غلظت پروتئین از طریق بالا بردن شانس برخورد حدواسطها به یکدیگر موجب افزایش تجمعات پروتئینی می‌گردد. در واقع در غلظت‌های بالای پروتئین، جمعیت ماکرومولکولها افزایش یافته و حجم بالایی از کل را اشغال می‌کنند و همین امر احتمال برخورد آنها را با هم بالا می‌برد [20]. نتایج حاصله نیز افزایش میزان تجمعات آمیلوئیدی را در غلظت بالا تأیید می‌کند. این نتایج با نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت بر فرایند آمیلوئیدی شدن سایر پروتئین‌ها مثل آلبومین سرم گاوی [9] و آلبومین سرم انسانی [21] همخوانی دارد. دما به عنوان موثرترین فاکتور در تشکیل تجمعات پروتئینی مستقیماً بر روی روند فیبریل زایی موثر است. افزایش دما موجب افزایش تعداد برخورد مولکولی شده و از این طریق سرعت تشکیل تجمعات پروتئینی بالا می‌رود [22]. دمای بالا موجب ایجاد تغییرات شیمیایی در پروتئین‌ها نیز می‌شوند و این تغییرات ممکن است حتی ترکیب نسبی ساختارهای ثانویه را تغییر داده و رفتار فرایند تجمع را عوض کنند [23]. دلیل استفاده از pH های اسیدی این است که در pH اسیدی بار خالص پروتئین تغییر می‌کند. با توجه به این که pI آلبومین سرم گاوی ۴/۷ است، در pH اسیدی بار خالص این پروتئین مثبت می‌شود و بین بخش‌های مختلف پروتئین نیروهای دافعه بوجود می‌آید که منجر به بازشدگی نسبی ساختار سوم پروتئین می‌گردد. باز شدن نسبی ساختار پروتئین به عنوان یک حدواسط ناپایدار شناخته می‌شود به همین دلیل این حدواسطها در بخش‌هایی با یکدیگر برهمکنش کرده، ساختارهای پیش فیبریلی و در نهایت فیبریل‌ها را که ساختارهای پایدارتری هستند بوجود می‌آورد [11]. مجموعه این موارد و نتایج حاصل از این تحقیق، تکرار پذیری فرایند فیبریل‌زایی را به اثبات می‌رساند.

در حال حاضر تجمعات پروتئینی از جنبه‌های مختلف مورد علاقه‌ی محققان قرار گرفته‌اند. به دلیل کاربردهای بیوتکنولوژی و دارویی و همچنین دخالت در ایجاد بیماری‌های مختلف، تجمعات پروتئینی در محدوده‌ی وسیعی مورد مطالعه قرار می‌گیرد. امروزه درک این مساله که از رشته‌های آمیلوئیدی می‌توان استفاده‌های متنوعی در علوم نانو همچون تشکیل نانولوله‌ها داشت، اهمیت بحث را صد چندان نموده است [24] [25] [26] [27]. تحقیقات انجام شده روی تجمعات آمیلوئیدی، معطوف به حوزه‌های متفاوتی است. از جمله این موارد، می‌توان به شناسایی خصوصیات ساختاری و عملکرد گونه‌های متفاوت آمیلوئیدی، بررسی جزئیات فرآیند تجمع و کشف مکانیسم‌های دخیل در این فرایند [28]، ارزیابی اثر آمیلوئیدها روی سلول‌های مختلف [29] [30]، مطالعات *in vivo* روی دروزوفیلا و مدل‌های موشی، بررسی اثرات داروهای متفاوت در مهار تجمعات و یا جلوگیری از میزان آسیب‌رسانی آن به سلول‌ها و ارائه‌ی مکانیسم‌های اثر مهاری دارو اشاره نمود [31] [32]. پژوهش صورت گرفته به منظور شناخت بیشتر خصوصیات آمیلوئیدها و بررسی شرایط بهینه برای فیبریل‌زایی پروتئین آلبومین سرم گاوی پرداخته و امکان استفاده از این نانو رشته‌ها را در تثبیت آنزیم ارزیابی نموده است.

از آنجایی که آنزیم‌ها قیمت بالایی دارند و به طور ذاتی از پایداری کمی برخوردارند، همچنین دست‌ورزی با آن‌ها در حالت آزاد نیاز به ایجاد شرایط ویژه دارد، از این رو تثبیت آن‌ها می‌تواند راه حلی برای مرتفع نمودن این مشکلات باشد. امکان تثبیت آنزیم‌ها با حامل‌های مختلف توسط روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد. معمولاً ارجحیت با روشی است که کمترین صدمه را به آنزیم وارد کند و در این میان سیستم‌هایی با سهولت و امنیت بیشتر و هزینه کمتر ایده آل است. روش تثبیت کوالانسی تا حد زیادی این نیاز را در غالب موارد تأمین می‌کند. در این راستا استفاده از حامل‌های مناسب و طبیعی در فرآیند‌های تثبیت بسیار رایج است. رشته‌های آمیلوئیدی به دلیل نامحلول بودن در آب و دارا بودن مقادیر زیادی از گروه‌های شیمیایی در دسترس، می‌تواند کاندیدای مناسبی برای تثبیت آنزیم‌ها باشد. هدف کلی این تحقیق، استفاده از پروتئین آلبومین سرم گاوی برای تشکیل ساختارهای رشته‌ای غنی از صفحات بتا در شرایط مختلف و بهینه سازی آن بوده است تا بتواند به عنوان یک بستر در تثبیت آنزیم سلولاز به کار رود. آنزیم سلولاز، با توجه به کاربردهای مختلف صنعتی و غذایی که دارد و البته پایداری و مقاومت خوب دمایی و همچنین قیمت مناسب و در دسترس بودن، به عنوان آنزیم مورد استفاده برای تثبیت انتخاب شد. تثبیت آنزیم سلولاز تاکنون با روش‌های مختلفی انجام شده است. در جدول ۱ این روش‌ها با هم مقایسه شده است.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه به منظور تشکیل تجمعات آمیلوئیدی تحت شرایط مختلفی از غلظت پروتئین، دما و pH استفاده شد تا تاثیر هر یک بطور جداگانه مورد بررسی قرار گیرد. در بررسی روند فیبریلازایی می توان با ثابت در نظر گرفتن همزمان دو فاکتور دیگر، تغییرات یکی از آنها را مورد بررسی قرار داد. دلیل این کار حذف هر گونه عامل تغییر دیگر از شرایط موجود در سیستم مطالعه و بررسی متغیر مورد نظر بطور ویژه است. برای سنجش تشکیل فیبریلازها از روش های جذب سنجی کنگورد و نشر فلورسانس ThT استفاده شد و برای تایید نهایی فیبریلازهای تهیه شده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره نیز کمک گرفته شد. نتایج حاصل نشان داد که حداکثر میزان تولید فیبریلازهای آمیلوئیدی در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین، دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و pH برابر ۳ تشکیل می شود. با یک رویکرد نوین، می توان رشته های آمیلوئیدی را به عنوان یک نانوماده جدید برای تثبیت آنزیم سلولاز معرفی نمود.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ تعارض منافی ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی و آزمایشگاه استاندارد دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

- [1] Osong, S. H., S. Norgren and P. Engstrand (2016). Processing of wood-based microfibrillated cellulose and nanofibrillated cellulose, and applications relating to papermaking: a review. *Cellulose* 23 (1), 93-123.
- [2] Linton, S. M. (2020). The structure and function of cellulase (endo- β -1, 4-glucanase) and hemicellulase (β -1, 3-glucanase and endo- β -1, 4-mannase) enzymes in invertebrates that consume materials ranging from microbes, algae to leaf litter. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 240, 110354.
- [3] Saini, R., J. K. Saini, M. Adsul, A. K. Patel, A. Mathur, D. Tuli and R. R. Singhania (2015). Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource technology* 188, 240-246.
- [4] Scheres, S. H. (2020). Amyloid structure determination in RELION-3.1. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* 76 (2), 94- 101.
- [5] Salahuddin, P., M. T. Fatima, V. N. Uversky, R. H. Khan, Z. Islam and M. Furkan (2021). The role of amyloids in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *International Journal of Biological Macromolecules* 190, 44-55.
- [6] Schramm, F. D., K. Schroeder and K. Jonas (2020). Protein aggregation in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 44 (1), 54-72.
- [7] Alam, P., K. Siddiqi, S. K. Chturvedi and R. H. Khan (2017). Protein aggregation: from background to inhibition strategies. *International journal of biological macromolecules* 103, 208-219.
- [8] Wang, W. and C. J. Roberts (2018). Protein aggregation—mechanisms, detection, and control. *International journal of pharmaceutics* 550 (1-2), 251-268.
- [9] Arasteh, A., M. Habibi Rezaei, A. Ebrahim Habibi and A. Moosavi Movahedi Ali (2011). Bovine serum albumin aggregation: An optimizing approach. *Clinical biochemistry* 44 (13, Supplement), S136-S137.
- [10] Arasteh, A., M. Habibi-Rezaei, A. Ebrahim-Habibi and A. A. Moosavi-Movahedi (2012). Response surface methodology for optimizing the bovine serum albumin fibrillation. *The protein journal* 31 (6), 457-465.
- [11] Holm, N. K., S. K. Jespersen, L. V. Thomassen, T. Y. Wolff, P. Sehgal, L. A. Thomsen, G. Christiansen, C. B. Andersen, A. D. Knudsen and D. E. Otzen (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1774 (9), 1128-1138.
- [12] Podrepšek, G. H., M. Primožič, Ž. Knez and M. Habulin (2012). Immobilization of cellulase for industrial production. *Chemical Engineering* 27, 235-240.
- [13] Farnet, A., L. Qasemian, D. Guiral and E. Ferré (2010). A modified method based on arsenomolybdate complex to quantify cellulase activities: application to litters. *Pedobiologia* 53 (2), 159-160.
- [14] Kielkopf, C. L., W. Bauer and I. L. Urbatsch (2020). Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harbor Protocols* 2020 (4), pdb. prot102269.
- [15] Ahmad, R. and S. K. Khare (2018). Immobilization of *Aspergillus niger* cellulase on multiwall carbon nanotubes for cellulose hydrolysis. *Bioresource technology* 252, 72-75.
- [16] Waugh, D. S. (2011). An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein expression and purification* 80 (2), 283-293
- [17] Sanchez-Ramirez, J., J. L. Martinez-Hernandez, P. Segura-Ceniceros, G. Lopez, H. Saade, M. A. Medina-Morales, R. Ramos-González, C. N. Aguilar and A. Ilyina (2017). Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for Agave Atrovirens lignocellulosic biomass hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40 (1), 9-22.

- [18] Sadeghi, M., Z. Moghimifar and H. Javadian (2023). Fe₃O₄@SiO₂ nanocomposite immobilized with cellulase enzyme: Stability determination and biological activity. *Chemical Physics Letters* 811, 140161.
- [19] Podrepšek, G. H., Ž. Knez and M. Leitgeb (2019). Activation of cellulase cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) in scCO₂. *The Journal of Supercritical Fluids* 154, 104629.
- [20] Ow, S.-Y. and D. E. Dunstan (2013). The effect of concentration, temperature and stirring on hen egg white lysozyme amyloid formation. *Soft Matter* 9 (40), 9692-9701.
- [21] Juárez, J., P. Taboada and V. Mosquera (2009). Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. *Biophysical Journal* 96 (6), 2353-2370.
- [22] Dubey, K., B. G. Anand, D. S. Shekhawat and K. Kar (2017). Eugenol prevents amyloid formation of proteins and inhibits amyloid-induced hemolysis. *Scientific reports* 7 (1), 1-11.
- [23] Sebastiao, M., N. Quittot and S. Bourgault (2017). Thioflavin T fluorescence to analyse amyloid formation kinetics: Measurement frequency as a factor explaining irreproducibility. *Analytical biochemistry* 532, 83-86.
- [24] Cao, Y. and R. Mezzenga (2019). Food protein amyloid fibrils: Origin, structure, formation, characterization, applications and health implications. *Advances in colloid and interface science* 269, 334-356.
- [25] Chatterjee, A., C. Mahato and D. Das (2021). Complex cascade reaction networks via cross β amyloid nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition* 60 (1), 202-207.
- [26] Knowles, T. P. and R. Mezzenga (2016). Amyloid fibrils as building blocks for natural and artificial functional materials. *Advanced Materials* 28 (31), 6546-6561.
- [27] Leung, W.-H., W.-H. Lo and P.-H. Chan (2015). Amyloid fibrils as rapid and efficient nano-biosorbents for removal of dye pollutants. *RSC advances* 5 (109), 90022-90030.
- [28] Chiti, F. and C. M. Dobson (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol* 5 (1), 15-22.
- [29] Heo, C., K. A. Chang, H. S. Choi, H. S. Kim, S. Kim, H. Liew, J. A. Kim, E. Yu, J. Ma and Y. H. Suh (2007). Effects of the monomeric, oligomeric, and fibrillar Abeta42 peptides on the proliferation and differentiation of adult neural stem cells from subventricular zone. *J Neurochem* 102 (2), 493-500.
- [30] Resende, R., E. Ferreiro, C. Pereira and C. R. De Oliveira (2008). Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: Involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience* 155 (3), 725-737.
- [31] Masuda, M., N. Suzuki, S. Taniguchi, T. Oikawa, T. Nonaka, T. Iwatsubo, S. Hisanaga, M. Goedert and M. Hasegawa (2006). Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly. *Biochemistry* 45 (19), 6085-6094.
- [32] Shaykhalishahi, H., M. Taghizadeh, R. Yazdanparast and Y. T. Chang (2010). Anti-amyloidogenic effect of AA3E2 attenuates beta-amyloid induced toxicity in SK-N-MC cells. *Chem Biol Interact* 186 (1), 16-23.