



تولید تک مرحله‌ای شربت پرفروکتوز از اینولین ریشه کاسنی با استفاده از آنزیم اینولیناز تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با نانوذرات پروتئینی

محدثه میکانی^۱، هما ترابی زاده^{۲*}، رضا رحمانیان^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، مهندسی کشاورزی، گرایش علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

۲. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

۳. دانش آموخته دکتری، شیمی تجزیه، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی-تهران شمال

(تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱۵. تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۶)

چکیده

در این پژوهش آنزیم اینولیناز بر روی نانوذرات مغناطیسی عامل‌دار شده با نانوذرات پروتئینی ایزوله پروتئین سویا و سرم آلبومین گاوی از طریق ایجاد اتصالات کووالانسی تثبیت گردید. تثبیت آنزیم به‌منظور افزایش پایداری ساختار آنزیم تحت شرایط دشوار صنعتی، امکان استفاده مجدد و بیوراکتورهای آنزیمی تثبیت شده با سیستم مداوم صورت گرفت. علاوه بر این، تثبیت این آنزیم بر روی نانوذرات مغناطیسی جداسازی آنزیم را از محیط واکنش توسط میدان مغناطیسی امکان پذیر نمود. بدین منظور در مرحله اول نانوذرات مغناطیسی به روش هم رسوبی تهیه گردیدند. نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی به روش حلال‌زدایی تهیه و سپس جهت پایدار سازی نانوذرات مغناطیسی، فرایند پوشش‌دهی سطح انجام گرفت. در مرحله سوم، فرایند تثبیت آنزیم بر روی سطوح بستر مغناطیسی صورت گرفت. به منظور مطالعه شکل و ساختار، اندازه و ویژگی‌های عملکردی نانوذرات مغناطیسی و پروتئینی و فرایند تثبیت آنزیم در کلیه مراحل تهیه، روش‌های تشخیص میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و تفرق دینامیک نور (DLS) به کار گرفته شد. پس از تثبیت آنزیم، ویژگی‌های آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد مطالعه گردید. نتایج نشان داد که آنزیم تثبیت شده در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه بیش از ۵۰٪ درصد از فعالیت اولیه خود را حفظ نموده، در حالی که آنزیم آزاد تنها ۱۷٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده بود. آنزیم تثبیت شده پس از ۱۲ سیکل بیش از ۶۰٪ فعالیت خود را حفظ نمود. نیمه عمر آنزیم تثبیت شده در دمای ۶۵ °C، به میزان ۶ برابر نسبت به آنزیم آزاد افزایش یافت. میزان فعالیت آنزیم، هم‌چنین پارامترهای سینتیکی (V_{max} ، K_m) آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد به صورتی تغییر یافته که نشان‌دهنده افزایش پایداری و بهبود عملکرد آنزیم پس از تثبیت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم اینولیناز، تثبیت کووالانسی، نانوذرات مغناطیسی، ایزوله پروتئین سویا، سرم آلبومین گاوی.

* نویسنده مسئول: htoraby@alumni.ut.ac.ir

1- مقدمه

کربودیمید هیدروکلرید (EDC) در این نوع تثبیت به کار گرفته شده و با استفاده از گروه‌های عاملی موجود در این نوع ترکیبات برای مثال گروه‌های آلدئیدی، نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده و به آنزیم‌ها متصل می‌گردند [3]. نانوذرات مغناطیسی به دلیل سطح مقطع بالا، نسبت سطح به حجم بالا و جداسازی راحت آن از محیط واکنش، در سال‌های اخیر به عنوان حامل مورد توجه می‌باشد. روش شیمیایی هم‌رسوبی روشی ساده و کارآمد در رسیدن به نانوذرات مگنتیت است. این نانوذرات سمیت کمی داشته و زیست سازگار می‌باشند. نانوذرات مغناطیسی آهن واکنش پذیری بالایی داشته و به آسانی دستخوش تخریب تحت تماس مستقیم با محیط می‌شوند [4]. روش‌های اصلاحی متنوعی برای رسیدن به نانوذرات مغناطیسی پایدار و زیست سازگار برای تثبیت آنزیم‌ها توسعه یافته است. نانوذرات مغناطیسی به تنهایی در مقابل محلول‌های اسیدی قوی ناپایدار می‌باشند و همین امر موجب محدود نمودن قابلیت استفاده مجدد و کاهش طول عمر این نوع ترکیبات می‌باشد. بالا بودن نسبت سطح به حجم منجر به تجمع ذرات و به حداقل رسیدن انرژی سطحی می‌گردد. جاذبه قوی بین نانوذرات قابلیت پخش آن‌ها را در محلول‌های آبی و بسترها کاهش می‌دهد و تحت چنین شرایطی میزان تثبیت آنزیم بر روی سطح کاهش می‌یابد. برای مقابله با این محدودیت‌ها روش‌های مختلفی جهت اصلاح سطح نانوذرات از طریق بارگذاری مواد شیمیایی یا بیولوژیکی در حین فرایند سنتز یا بعد از آن به کار گرفته می‌شود. این تکنیک‌ها خصوصیات سطح (مانند زیست سازگار بودن و قابلیت پخش شدن) نانوذرات مغناطیسی آهن را بهینه کرده و محیطی را برای انتقال نانوذرات اکسید آهن هیدروکسیدیک به یک سیستم هیدروفیلیک ایجاد می‌کنند. پروتئین‌ها یکی از ترکیباتی هستند که جهت اصلاح سطح نانوذرات مغناطیسی به کار گرفته می‌شوند [5]. سویا یکی از منابع غنی پروتئین‌های گیاهی محسوب می‌گردد که شکل غنی شده آن به عنوان ایزوله پروتئین سویا¹ شناخته می‌شود. ایزوله پروتئین سویا از سویای چربی‌زدایی شده به دست می‌آید. این ترکیب دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی بوده و کاربردهای وسیعی در صنایع غذایی، تولید مکمل‌ها و صنایع دارویی دارد. آلبومین پروتئینی است

اینولیناز آنزیمی است که با آبکافت اینولین، فروکتوز و فروکتواولیگوساکاریدها را تولید نموده که این فراورده‌ها دارای کاربرد وسیعی در صنایع دارویی و غذایی هستند. آنزیم اینولیناز قادر به تولید شربت پرفروکتوز در یک فرایند تک مرحله‌ای آنزیمی از اینولین می‌باشد. در صورتی که روش مرسوم طی چند مرحله آنزیمی، نشاسته را به فروکتوز تبدیل می‌کند. آبکافت اینولین به دو روش اسیدی و آنزیمی امکان‌پذیر است. در روش اسیدی برای تولید شربت پرفروکتوز به طور معمول مشکلاتی را از جمله کاهش کیفیت رنگ، طعم و مزه فراورده نهایی و نیز تولید فراورده‌های جانبی را به همراه دارد. اما در روش آبکافت آنزیمی اینولین کیفیت رنگ، طعم و مزه به خوبی حفظ گردیده ضمن این که، میزان بازدهی تولید فروکتوز بالاتر است [1]. در سیستم‌های مرسوم که از آنزیم آزاد استفاده می‌گردد، برگشت مجدد آنزیم به فرایند آبکافت امکان پذیر نبوده و در خاتمه فرایند، آنزیم همراه با پساب از سیستم خارج می‌شود. انجام فرایند تولید به صورت مداوم از نظر اقتصادی بسیار اهمیت داشته و قیمت تمام شده فراورده نهایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. آنزیم آزاد تحت شرایط دشوار فرایند از نظر دما، pH، فشار و سایر عوامل، دچار تغییراتی در ساختار طبیعی خود گردیده و در نتیجه سرشت طبیعی خود را از دست می‌دهد. در حالی که، آنزیم تثبیت شده تحت چنین شرایط دشواری پایدارتر بوده و ماهیت طبیعی خود را در حین فرایند به خوبی حفظ می‌کند. بنابراین، تثبیت آنزیم از نظر حفظ ساختار و فعالیت طبیعی و اصلی آنزیم، قابلیت استفاده مجدد در فرایند بعدی، صرفه جویی در مصرف انرژی، سوخت و آب و کاهش حجم پساب و فاضلاب، در نتیجه بهره‌وری بیش‌تر در فرایند تولید و افزایش راندمان فراورده نهایی دارای اهمیت می‌باشد [2]. تثبیت آنزیم بر روی حامل از طریق ایجاد پیوندهای قوی و پایدار کووالانسی بین ماده حامل و آنزیم صورت می‌گیرد. ارتباط مستحکم آنزیم و بستر براساس واکنش شیمیایی بین باقی‌مانده اسیدهای آمینه سطحی مولکول آنزیم مانند گروه افسیلن-آمینو لیزین و گروه‌های عمل‌گرای فعال در سطح حامل برقرار می‌گردد [2]. عوامل اتصال‌دهنده مانند گلوترآلدهید و یا 1-اتیل-3-(3-دی متیل آمین پروپیل)

1. Soy Protein Isolate (SPI)

با استفاده از تکنولوژی خشک کن پاششی تمرکز کردند. آنزیم تثبیت شده پایداری دمایی خوبی در مقایسه با اینولیناز آزاد داشت [14]. کوگتو و همکاران اینولیناز را بر روی حامل مونت موریلونیت طبیعی تثبیت کردند. فعالیت آنزیم تثبیت شده بعد از 1968 ساعت تحت شرایط انبارمانی در دماهای پایین و بعد از 456-1826 ساعت در دماهای بالا حفظ شد [15]. یویل و همکاران آنزیم اینولیناز را با استفاده از پیوند کووالانت طی دو مرحله بر روی بستری از کیتوزان تثبیت کردند. در pHهای پایین (3 و 2/5) فعالیت نسبی آنزیم تثبیت شده بالاتر از آنزیم آزاد بود. همچنین مقاومت دمایی در دمای 50 و 60 درجه سانتی گراد پس از تثبیت بر روی کیتوزان افزایش یافت [16]. میسائو و همکاران، اینولیناز تجاری را به طور موثری بر روی گرانولهای آلژینات-کیتوزان با استفاده از گلوترآلدئید تثبیت نمودند. بهترین فعالیت آنزیم در 50 درجه سانتی گراد به دست آمد. آنزیم تثبیت شده 76٪ فعالیت خود را به مدت 6 روز در دمای اتاق حفظ نمود [17].

در این پژوهش جهت افزایش سطح تماس آنزیم با نانوذرات مغناطیسی حامل، از نانوذرات پروتئینی ایزوله پروتئین سویا و سرم آلبومین گاوی جهت پوشش دهی سطح و عامل دار کردن سطوح ذرات بهره گرفته شد. بدین منظور در مرحله اول نانوذرات مغناطیسی به روش هم رسوبی تهیه گردید. پس از آن در مرحله دوم، نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی به روش حلال زدایی تهیه و سپس جهت اصلاح سطح و پایداری سازی نانوذرات مغناطیسی، فرایند پوشش دهی سطح انجام گرفت. در مرحله سوم، فرایند تثبیت آنزیم بر روی سطوح بستر مغناطیسی، با ایجاد اتصالات کووالانس بین ریشه های اپسین-آمینو لیزین سطحی در مولکول آنزیم و ریشه های لیزین و گروه های NH_2 موجود در سطوح پروتئینی بستر با استفاده از گلوترآلدئید صورت گرفت. ماده حامل پروتئینی به کار گرفته شده در این تحقیق زیستی و بدون سمیت بوده و امکان به کارگیری آن در صنعت غذا وجود دارد [18].

2- مواد و روش ها

2-1- مواد و تجهیزات

آنزیم اینولیناز ساخت شرکت سیگما آلد ریچ امریکا، سرم

که از منابع مختلف مانند سفیده تخم مرغ، سرم خون گاوی و سرم خون انسان به دست می آید [6، 7].

تاکنون بر روی تثبیت آنزیم اینولیناز به روش های مختلف تحقیقات بسیاری انجام شده است. کیم و بیان اینولیناز را بر روی بستر 2-آمینو اتیل سلولز تثبیت کردند. فعالیت آنزیم تثبیت شده 39/3 واحد اینولیناز در گرم واحد ماتریکس خشک بود و مقاومت خوبی را در حضور سوبسترای اینولین یا عصاره غده گیاه کنگر فرنگی از خود نشان داد [8]. اطالایی و همکاران آنزیم اینولیناز مقاوم به حرارت را از طریق پیوند کووالانسی روی بسترهای شیشه ای منفذ دار با اندازه منافذ مختلف (دامنه ی قطر منفذ 1170-125 آنگستروم) تثبیت کردند. دمای اپتیمم آنزیم تثبیت شده، 70 درجه سانتی گراد، در مقایسه با آنزیم آزاد، 60 درجه سانتی گراد، بالاتر بود، در حالی که تغییری در pH فعالیت آنزیم نشان داده نشد [9]. ناکامورا و همکاران شربت فروکتوز را از اینولین با استفاده از اینولیناز تثبیت شده به روش مداوم به دست آوردند. پایداری آنزیم تثبیت شده تا دمای 60 درجه سانتی گراد حفظ شد [1]. در کیم و همکاران، اینولیناز را بر روی آمینو-سلوفاین تثبیت کردند. فعالیت آنزیم در pH برابر با 5/4-6 در دمای 60 درجه سانتی گراد ثابت نگاه داشته شد. 100٪ از فعالیت آنزیم حتی بعد از انکوباسیون به مدت 24 ساعت در 60 درجه سانتی گراد حفظ گردید [10]. کوالوا و همکاران، اینولیناز را بر روی رزین تبادل یون ماکروپوروس AV-16-GS با روش های فیزیکی و شیمیایی تثبیت کردند. اتصال آنزیم به حامل به وسیله روش های مطالعه شده سبب تغییر دمای بهینه ی آنزیم به دماهای بالاتر و افزایش دامنه pH اپتیمم منجر شد [11]. الناشار و همکاران اینولیناز را بر روی بستر جدید پلیمر زیستی پیوندی تثبیت کردند. پایداری آنزیم به مدت 2 ساعت در 60 درجه سانتی گراد با حفظ 78٪ از فعالیت خود در مقایسه با 7٪ فعالیت آنزیم آزاد قابل توجه بود [12]. نگویان و همکاران، اندواینولیناز تجاری را به طور موفقیت آمیزی بر روی حامل کیتین با بازدهی 66٪ تثبیت کردند. اندواینولیناز تثبیت شده بالاترین فعالیت را در دمای 65 درجه سانتی گراد که 5 درجه سانتی گراد بالاتر از دمای بهینه آنزیم آزاد بود، را نشان داد [13]. زمولین و همکاران بر روی تثبیت آنزیم اینولیناز به دست آمده از تخمیر

2-3- تهیه نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی با روش حلال‌زدایی

0/2 گرم از ایزوله پروتئین سویای چربی‌زدایی شده و 0/1 گرم سرم آلبومین گاوی در 100 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل گردید و توسط همزن به مدت 15 دقیقه کاملاً یکنواخت گردید. در مرحله بعد برای افزایش میزان حلالیت ایزوله پروتئین سویا در آب با استفاده از هیدروکسید سدیم (NaOH) یک مولار و 0/1 مولار pH آن روی 9/5 تنظیم گردید. سپس 20 میلی‌لیتر از آن را برداشته و 80 میلی‌لیتر استن به صورت قطره قطره به آن اضافه گردید. با استفاده از تبخیرکننده چرخشی تحت خلا استن موجود در محیط تبخیر گردید و به همان میزان استن خارج شده، آب جایگزین آن شد. پس از آن به مدت 15 دقیقه در 9677 g سانتریفیوژ شد و رسوب نهایی جداسازی گردید. حدود 370 میکرولیتر گلوترآلدئید (میزان آن با توجه به تعداد لیزین موجود در ساختار مولکولی ایزوله پروتئین سویا و سرم آلبومین گاوی با استفاده از روش بیوانفورماتیک توسط نرم افزار Getarea و تعیین تعداد کل ریشه‌های اسید آمینه لیزین قابل دسترس در سطح مولکول با تخمین Accessible surface area توسط نرم‌افزار ذکر شده مشخص گردیده است) به محلول نهایی به صورت قطره قطره اضافه شد و به مدت 2 ساعت بر روی همزن مگنتیک قرار گرفت [6، 19]. در نهایت، اندازه و پتانسیل زتای نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی با استفاده از روش DLS تعیین گردید.

2-4- پوشش‌دهی نانوذرات مغناطیسی با نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی از طریق جذب فیزیکی

0/1 گرم نانوذرات مغناطیسی تهیه شده وزن گردید، سپس 0/06 گرم نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی به آن افزوده و به همراه گلوترآلدئید در 50 میلی‌لیتر بافر فسفات با pH برابر 7 به صورت محلول درآمد و به مدت 10 دقیقه تحت تاثیر امواج اولتراسونیک قرار داده شد. سپس به مدت 24 ساعت عمل هم زدن ملایم در دمای اتاق ادامه یافت تا پیوندهای کووالانسی بین نانوذرات مغناطیسی آهن

آلبومین گاوی Fraction V با وزن مولکولی 66338 دالتن و اینولین حاصل از ریشه کاسنی با فرمول مولکولی $(C_6H_{10}O_5)_n$ و جرم مولکولی نسبی 5000 دالتن ساخت شرکت فلوکای امریکا استفاده گردیده‌اند. معرف ۵،۳ دی نیترو سالیسیلیک اسید با فرمول $C_7H_4N_2O_7$ از شرکت سیگما آلدריך تهیه شده است. سایر مواد شامل ایزوله پروتئین سویای چربی‌زدایی شده، تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم (نمک راشل)، گلوترآلدئید 25٪ (حجمی/حجمی در آب)، تویین 80، دی سدیم هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات، استات سدیم، سولفیت سدیم، اسید هیدروکلریک، اسید فسفریک، هیدروکسید سدیم، استن، اسید استیک و اتانول 96 درجه از نوع آزمایشگاهی بوده و از نمایندگی‌های شرکت مرک آلمان در ایران خریداری شد. دستگاه اسپکتروفتومتر مدل PerkinElmer, Lambda UV/VIS، هم‌چنین دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی FE-SEM مدل Tescan-Mira II ساخت آمریکا استفاده شده است.

2-2- سنتز نانوذرات مغناطیسی آهن به روش هم‌رسوبی

هم‌رسوبی فرایندی است که در آن یک ماده محلول در محیط به یک ساختار نامحلول تبدیل می‌شود. به‌طور عمومی، تشکیل محصولات کم محلول از فاز آبی اساس این روش است. فرایند رسوب‌گیری شیمیایی مراحل هسته‌زایی و رشد را در بر دارد. کنترل همین دو مرحله است که منجر به تولید محصولات با کیفیت می‌گردد.

نخست دو نمک آهن Fe^{2+} و Fe^{3+} با نسبت استوکیومتری 1 به 2 وزن شدند. 8/86 گرم از $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ و 3/25 گرم $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ به صورت جداگانه وزن و هر کدام در 200 میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد. سپس هر دو محلول با استفاده از همزن مغناطیسی با هم مخلوط شده و تحت گاز نیتروژن، 10 میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم به صورت قطره قطره به آن اضافه شد که با افزودن آن محلول از آبی تیره به رنگ سیاه تبدیل می‌شود. نانوذرات مغناطیسی آهن، سه بار با آب دیونیزه شستشو داده شد و سپس در خشک کن با دمای 72 درجه سانتی‌گراد خشک گردید [3، 4].

2-7- میزان پروتئین آنزیم آزاد و تثبیت شده با روش برادفورد

روش برادفورد، روشی برای اندازه گیری پروتئین ها می باشد که بر اساس تغییر ماکزیمم جذب نوری کوماسی بریلیانت بلو G-250 از 465 نانومتر به 595 نانومتر در هنگام اتصال به پروتئین عمل می نماید. در تعیین محتوای آنزیم تثبیت شده از روش برادفورد بهره گرفته شد. در ابتدا محلول استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA) با غلظت های 0/1، 0/2، 0/3، 0/4، 0/5، 0/6، 0/7، 0/8، 0/9 و 1 میلی گرم در هر میلی لیتر تهیه گردید. میزان جذب رقت های تهیه شده پس از آماده سازی نمونه ها با روش اسپکتروفتومتری در طول موج 595 نانومتر اندازه گیری شد. میزان جذب هر نمونه بر روی محور عمودی و میزان غلظت سرم آلبومین گاوی بر روی محور افقی نشان داده می شود. جهت تهیه محلول ذخیره برادفورد، 100 میلی گرم از رنگ کوماسی بریلیانت بلو در 50 میلی لیتر اتانول 95 درجه حل کرده و سپس 100 میلی لیتر اسید فسفریک غلیظ به آن اضافه گردید. محلول حاصله با آب مقطر به حجم 1000 میلی لیتر رسانیده شده و به عنوان استوک جهت انجام تست برادفورد استفاده شد. مقدار 100 میکرولیتر از آنزیم با 5 میلی لیتر از محلول ذخیره مخلوط کرده تا رنگ آبی شفاف ایجاد شود. با ایجاد ورتکس نمونه ها یکنواخت و برای 10 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شده و قبل از 30 دقیقه جذب آن ها را در طول موج 595 نانومتر در مقایسه با شاهد خوانده می شود. اعداد جذب در منحنی استاندارد قرار گرفته و غلظت پروتئین به دست می آید [18، 21].

2-8- بررسی مقاومت حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده

به منظور بررسی پایداری حرارتی آنزیم اینولیناز قبل و بعد از تثبیت، میزان فعالیت باقیمانده آنزیم در دماهای 35، 45، 55، 65 و 75 درجه سانتی گراد تعیین گردید، سپس نمودار درصد باقیمانده فعالیت (فعالیت آنزیم در دماهای ذکر شده در فوق نسبت به فعالیت آنزیم در دمای بهینه) نسبت به دما رسم شد [18].

2-9- نیمه عمر آنزیم آزاد و تثبیت شده

نیمه عمر آنزیم ($t_{1/2}$) مدت زمانی است که فعالیت آنزیم به

و نانوذرات پروتئینی تشکیل گردند. محلول نهایی جهت جداسازی نانوذراتی که هیچ گونه پیوندی ایجاد نکرده اند در 11357 g سانتریفیوژ گردید و توسط بافر فسفات شستشو داده شد [20].

2-5- تثبیت آنزیم اینولیناز بر روی نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده با نانوذرات پروتئینی

میزان مشخصی از نانوذرات مغناطیسی عامل دار شده و 100 میلی مول بافر استات با pH برابر با 5/5-5، به همراه گلوترآلدئید با هم مخلوط گردید و به مدت 10 تا 30 دقیقه تحت امواج اولتراسونیک قرار داده شد. پس از آن 4 میلی لیتر از آنزیم اینولیناز به مخلوط اضافه شد و با سرعت ملایم، 100-300 rpm، در دمای یخچال، 3-4 درجه سانتی گراد، هم زده و پس از آن مخلوط تهیه شده در سه مرحله توسط بافر فسفات با pH برابر با 7، شستشو شد. آنزیم تثبیت شده به روش کووالانسی تا زمان استفاده در فریزر با دمای 18- درجه سانتی گراد نگهداری گردید [1].

2-6- میزان فعالیت آنزیم اینولیناز آزاد و تثبیت شده با روش DNS¹

میزان قند احیا کننده آزاد شده طی واکنش آنزیمی با روش اسپکتروفتومتری نقطه پایانی تعیین می شود. از 5 و 3 دی نیترو سالیسیلیک اسید برای تشخیص وجود گروه های کربونیل آزاد (C=O) مربوط به قندهای احیا کننده استفاده می گردد. 5 و 3 دی نیترو سالیسیلیک اسید با قندهای احیا کننده که در نتیجه تجزیه اینولین تشکیل شده اند در محیط قلیایی واکنش داده و تولید 3-آمینو-5-نیترو سالیسیلیک اسید با رنگ قهوه ای روشن تا تیره می کند که قادر به جذب نور در 575 نانومتر می باشد. این واکنش در دمای مطلوب آنزیم اینولیناز یعنی 39-40 درجه سانتی گراد، این آزمون در محیط بافری استات سدیم با pH مطلوب 5/5-6، محلول 1٪ سوبسترای اینولین، میزان 100 میکرولیتر آنزیم اینولیناز و با مدت زمان آبکافت 60 دقیقه انجام گرفت. فعالیت آنزیم به صورت میکرومول محصول تولید شده و یا سوبسترای مصرف شده در هر دقیقه بیان می گردد [18].

1. Dinitrosalicylic acid

مغناطیسی (آهن‌ربا) و سانتریفیوژ 11357 g از محیط واکنش جداسازی گردید و توسط بافر فسفات با pH برابر 7 شستشو داده شد. در پایان هر سیکل فعالیت باقی‌مانده در هر سیکل براساس نسبت فعالیت آنزیم به فعالیت آن در سیکل اول بر اساس درصد بیان می‌شود. از مزایای تثبیت آنزیم جداسازی آسان و استفاده مجدد از آن می‌باشد.

3- نتایج و بحث

3-1- تعیین اندازه نانوذرات پروتئینی با استفاده از روش DLS و بررسی مورفولوژی سطح آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی

اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه‌ها با استفاده از آنالیز DLS¹ تعیین شد. متوسط اندازه ذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی 85 نانومتر به‌دست آمد. پتانسیل زتای آن نیز 36- تعیین گردید که نشان از پایداری بالای محصول نسبت به تجمع و آگلومره شدن داشت. بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی² نانوذرات نشان از تشکیل ذراتی کروی و یکنواخت در ابعاد نانو داشت و نتایج حاصل از DLS را تایید نمود (شکل 1).

3-2- تعیین میزان فعالیت آنزیم اینولیناز آزاد و تثبیت شده با روش DNS³

میزان فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده اینولیناز با استفاده از روش DNS اسپکتروفتومتری جذبی اندازه‌گیری شد. با توجه به میزان محصول تولید شده در زمان‌های مختلف، میزان فعالیت آنزیم مشخص شد. میزان فعالیت بهینه آنزیم آزاد مربوط به مدت زمان 3 دقیقه آبکافت بوده در حالی که بر اساس نمودار، بهینه فعالیت آنزیم تثبیت شده بعد از 5 دقیقه آبکافت می‌باشد (شکل 2).

3-3- تعیین محتوای پروتئینی آنزیم آزاد و تثبیت شده

در تعیین محتوای آنزیم آزاد و تثبیت شده از روش برادفورد بهره گرفته شد [21]. در جدول (1) میزان پروتئین آنزیم آزاد و تثبیت شده نشان داده شده است.

میزان 50٪ کاهش یافته و به نصف فعالیت اولیه برسد. برای محاسبه نیمه عمر آنزیم در ابتدا می‌بایست نمودار لگاریتم طبیعی درصد باقیمانده فعالیت آنزیم نسبت به زمان رسم گردد. در این نمودار شیب خط برابر است با مقدار ثابت دنا توره شدن یا کاهش فعالیت آنزیم که با k_{in} نشان داده می‌شود در این آزمون نیمه عمر آنزیم در دماهای 35، 55، 65 و 75 درجه سانتی‌گراد با استفاده از فرمول (1) محاسبه گردید [18].

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_{in} \quad (1)$$

2-10- تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم تثبیت شده

مهم‌ترین پارامترهای سینتیکی واکنش آبکافت اینولین توسط آنزیم تثبیت شده و آنزیم آزاد یعنی K_m ، غلظتی از سوبسترا که در آن غلظت سرعت واکنش 1/2 سرعت بیشینه است، و V_{max} تعیین گردید. برای تعیین پارامترهای سینتیکی غلظت‌های مختلف از سوبسترای اینولین تهیه گردید، سپس به همراه 100 میکرولیتر آنزیم در بافر استات سدیم با pH برابر 6، در زمان بهینه فعالیت آنزیم آبکافت انجام گرفت. سپس به‌وسیله روش DNS مقدار محصول تولید شده در طول موج 575 نانومتر تعیین گردید. پس از آن نمودار غلظت محصول تولید شده نسبت به مدت زمان هیدرولیز رسم شد. سرعت واکنش آنزیمی V با استفاده از شیب خط به‌دست آمده برای هر غلظت به‌طور جداگانه مشخص شد. سپس نمودار لینور-برک¹ براساس عکس غلظت سوبسترا $1/[S]$ و عکس سرعت واکنش $1/V$ رسم گردید. در این معادله $C = 1/V_{max}$ بوده یعنی محل تلاقی خط با محور yها برابر با مقدار C و در نتیجه برابر با $1/V_{max}$ است. شیب خط یا m برابر با K_m/V_{max} می‌باشد [18].

2-11- تعیین قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده

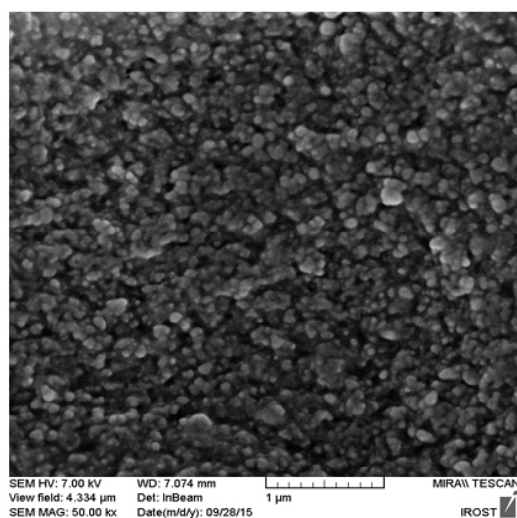
قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بعد از هر بار استفاده بررسی می‌شود. تعیین میزان فعالیت آنزیم تثبیت شده براساس روش DNS به‌دست می‌آید. تعیین فعالیت به تعداد 15 سیکل پی‌درپی با مدت زمان هیدرولیز 60 دقیقه اندازه‌گیری شد. در پایان هر سیکل هیدرولیز، نانوذرات مغناطیسی آنزیم تثبیت شده توسط میدان

1. Dynamic light scattering (DLS)

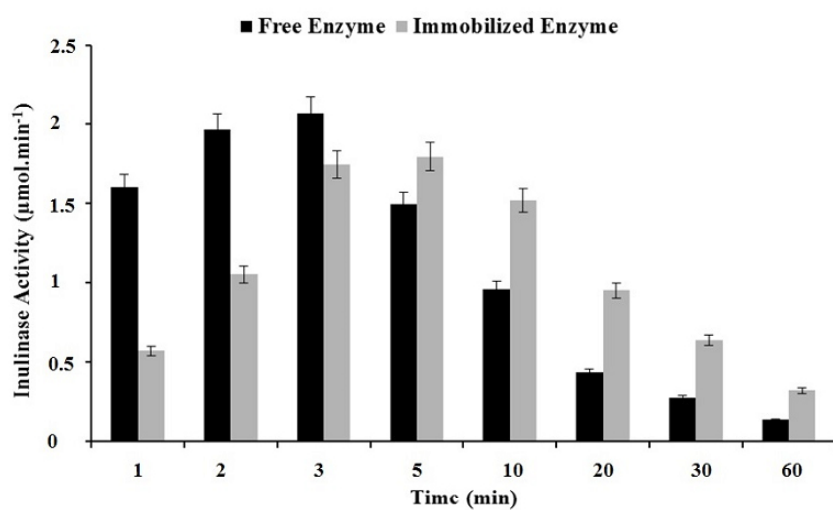
2. Scanning electron microscope (SEM)

3. Dinitrosalicylic acid

1. Lineweaver- Burk Plot



شکل (1) تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوذرات ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی



شکل (2) نمودار مقایسه میزان فعالیت آنزیم اینولیناز آزاد و تثبیت شده

جدول (1) میزان پروتئین آنزیم آزاد و تثبیت شده

نوع آنزیم	غلظت پروتئین (میلی گرم / میلی لیتر)
آنزیم آزاد	4/48
آنزیم تثبیت شده	3/53

56 براین اساس مقدار آنزیم تثبیت شده روی نانوذرات حامل/3 میلی گرم/میلی لیتر بوده که در مقایسه با مقدار آنزیم آزاد اولیه یعنی 4/48 میلی گرم/میلی لیتر درصد بارگذاری آنزیم 79/5% بوده است.

4-3- تعیین pH بهینه آنزیم آزاد و تثبیت شده

تعیین pH بهینه در محدوده 5-8 با استفاده از محیط بافری اسید سیتریک-دی سدیم هیدروژن فسفات انجام گرفت. در این آزمون با استفاده از محلول اینولین 1% و مقدار 100 μL آنزیم اینولیناز عمل آبکافت آنزیمی در pH 5-8 در دمای 39-40 درجه سانتی گراد در مدت زمان بهینه فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده یعنی 5 دقیقه، انجام شد. نمودار فعالیت آنزیم نسبت به تغییرات pH برای آنزیم آزاد و تثبیت شده رسم گردید. به این ترتیب که فعالیت آنزیم در pH بهینه 100% در نظر گرفته شد و فعالیت آنزیم با تغییر pH نسبت به آن سنجیده شد. تعیین pH بهینه در تولید شربت پر فروکتوز مهم می باشد، چرا که می توان به این شکل از تغییر رنگ ناخواسته محصول جلوگیری کرد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که، بهینه فعالیت آنزیم آزاد در pH برابر با 6 و بهینه فعالیت آنزیم تثبیت شده در pH برابر با 5/5 بوده است. تغییر مقدار بهینه pH در آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد، 0/5 واحد به سمت محیط اسیدی بود.

دقت شود که میزان پروتئین آنزیم تثبیت شده پس از کسر میزان پروتئین سطح نانوذرات مغناطیسی (ایزوله پروتئین سویا به همراه سرم آلبومین گاوی) به دست آمده است. میزان فعالیت ویژه¹ آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده بر اساس مقادیر پروتئین محاسبه شده و فعالیت هر یک از آنزیم ها تعیین گردید که به ترتیب 4/62 و 5/07 میکرومول/ در دقیقه/ به ازاء هر میلی گرم بوده است.

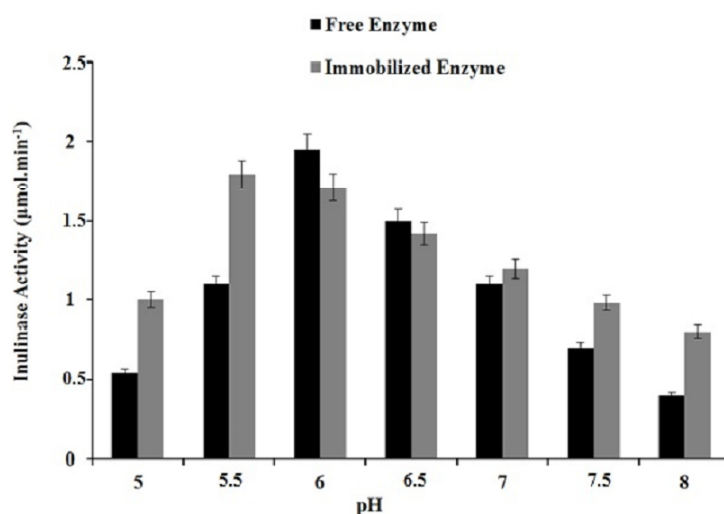
میزان آنزیم متصل شده به نانوذرات پروتئینی با استفاده از مقایسه غلظت آنزیم اولیه با میزان آنزیم باقی مانده در محلول بافر پس از جداسازی ذرات آنزیمی تثبیت شده با سانتریفوژ محاسبه می گردد. میزان آنزیم تثبیت شده (لود شده روی ساپورت) را از طریق فرمول (2) می توان محاسبه نمود.

$$Q = \frac{(C_1 - C_2)V}{W} \quad (2)$$

که Q مقدار آنزیم تثبیت شده روی حامل، C_1 غلظت اولیه آنزیم، C_2 (mg/ml) غلظت آنزیم باقی مانده در محلول پس از پایان فرایند تثبیت V (mg/ml) حجم کل محلول بافری (میلی لیتر)، و W وزن مواد حامل (ساپورت) بر حسب mg می باشد.

$$Q = [(48/4 - 21/0) \times 50] / 60 = 3/55$$

1. Specific activity



شکل (3) نمودار فعالیت آنزیم اینولیناز آزاد و تثبیت شده در مدت زمان 5 دقیقه در محدوده pH بین 5-8

3-5- تعیین دمای بهینه و بررسی مقاومت حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده

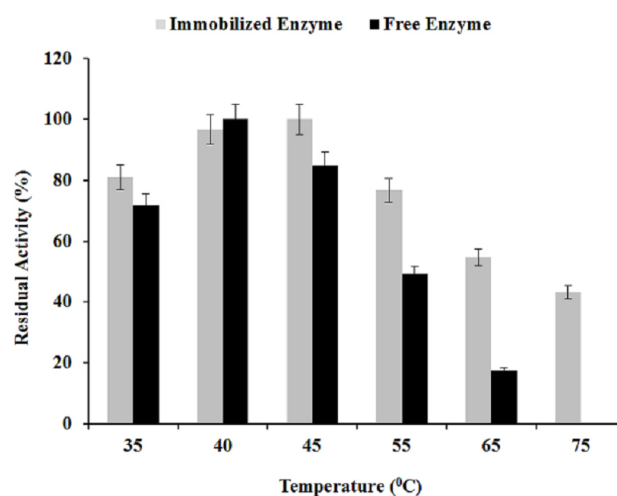
براساس نتایج به دست آمده، دمای بهینه فعالیت آنزیم اینولیناز آزاد 39-40 درجه سانتی گراد تعیین گردید که پس از تثبیت این دمای مطلوب فعالیت آنزیم به 45 درجه سانتی گراد افزایش پیدا کرد. به عبارت دیگر، دمای بهینه آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد 5 درجه سانتی گراد افزایش یافت که به دلیل افزایش استحکام و ثبات ساختار آنزیم طی تثبیت با شکل گیری پیوندهای کووالانسی بیش تر و افزایش مقاومت حرارتی آنزیم بوده است. ایجاد اتصالات کووالانسی بین مولکول آنزیم و بستر (ماده حامل) در چند نقطه صورت می گیرد که همین امر موجب افزایش پایداری ساختار آنزیم و کاهش احتمال تغییر ساختار طبیعی آن بوده است. همچنین، پیوندهای کووالانسی بین آنزیم و حامل، ساختار جایگاه فعال را نسبت به تغییر شکل در اثر دمای بالا محافظت می کند. همان طور که از شکل (4) مشخص است، مقاومت حرارتی آنزیم پس از تثبیت به طور قابل ملاحظه ای نسبت به آنزیم آزاد افزایش می یابد. آنزیم تثبیت شده نسبت به غیرفعال سازی حرارتی مقاوم تر است. با توجه به این که در صنعت از دماهای بالای 60 درجه سانتی گراد به منظور جلوگیری از ایجاد آلودگی های میکروبی طی انجام فرایندهای تولید استفاده می گردد، استفاده از آنزیم

تثبیت شده اینولیناز در صنعت برای تولید شربت پرفروکتوز از نقطه نظر مقاومت حرارتی بالاتر کاربردی تر بنظر می رسد. همچنین آبکافت آنزیمی اینولین در دماهای بالا به علت بهبود حلالیت سوبسترا و افزایش سرعت واکنش بهتر انجام می گیرد. در آزمون بررسی مقاومت حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده که به طور هم زمان برای تعیین میزان باقیمانده فعالیت آنزیم های آزاد و تثبیت شده در دماهای 35، 40، 45، 55، 65، 75 درجه سانتی گراد با مدت زمان هیدرولیز ثابت 60 دقیقه انجام گرفت، درصد باقیمانده فعالیت آنزیم ها نسبت به 5 دقیقه اول شروع هیدرولیز که حداکثر میزان فعالیت آنزیم در این زمان بوده است، تعیین و مورد مقایسه قرار گرفت.

همان طور که نتایج نشان می دهد، در دمای 65 درجه سانتی گراد آنزیم تثبیت شده بیش از 50٪ درصد از فعالیت اولیه خود را دارا بوده در حالی که، آنزیم آزاد تنها 17٪ از فعالیت خود را حفظ کرده است.

3-6- تعیین نیمه عمر آنزیم آزاد و تثبیت شده

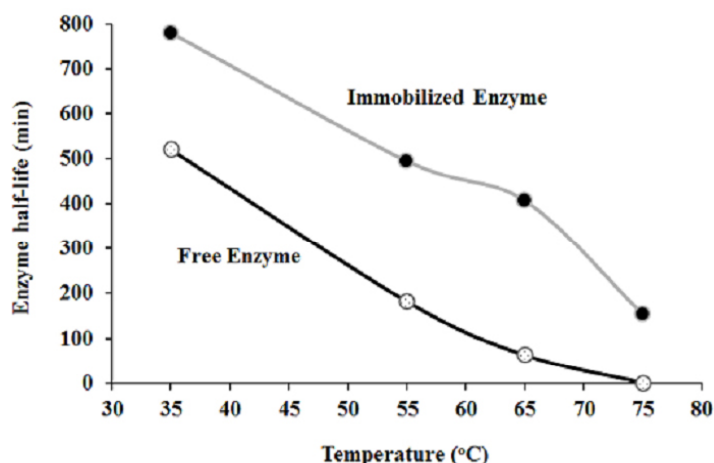
نتایج مربوط به مقایسه نیمه عمر آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد نشان داد که نیمه عمر آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد افزایش یافته است بطوریکه، در دمای 35 درجه سانتی گراد این افزایش حدود 1/5 برابر و در دمای 65



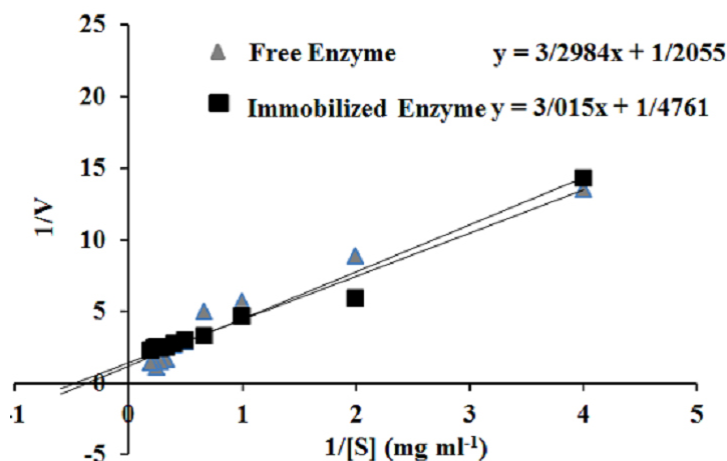
شکل (4) درصد باقیمانده فعالیت آنزیم اینولیناز قبل و بعد از تثبیت در دماهای مختلف با مدت زمان هیدرولیز ثابت 60 دقیقه

درجه سانتی‌گراد نیمه عمر آنزیم تثبیت شده 6/5 برابر نسبت به آنزیم آزاد افزایش داشته است. همچنین نیمه عمر آنزیم تثبیت شده در دمای 75 درجه سانتی‌گراد 5/13 برابر آنزیم آزاد بوده است. واضح است که نیمه عمر آنزیم با افزایش دمای انکوباسیون کاهش می‌یابد. نتایج در شکل (5) نمایش داده شده است.

7-3- تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم تثبیت شده
پارامترهای سینتیکی مربوط به واکنش آبکافت اینولین توسط آنزیم آزاد و تثبیت شده انجام شده پارامترهای سینتیکی برای آنزیم آزاد و تثبیت شده طبق جدول (2) تعیین گردید.



شکل (5) نیمه عمر آنزیم آزاد و تثبیت شده در 4 دمای 35، 55، 65 و 75 درجه سانتی‌گراد



شکل (6) نمودار Lineweaver-Burk مربوط به آبکافت اینولین توسط آنزیم اینولیناز آزاد و تثبیت شده

جدول (2) پارامترهای سینتیکی آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت شده

نوع آنزیم	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	K_m (mg ml^{-1})
آنزیم آزاد	0/83	2/72
آنزیم تثبیت شده	0/67	2/03

4- نتیجه گیری

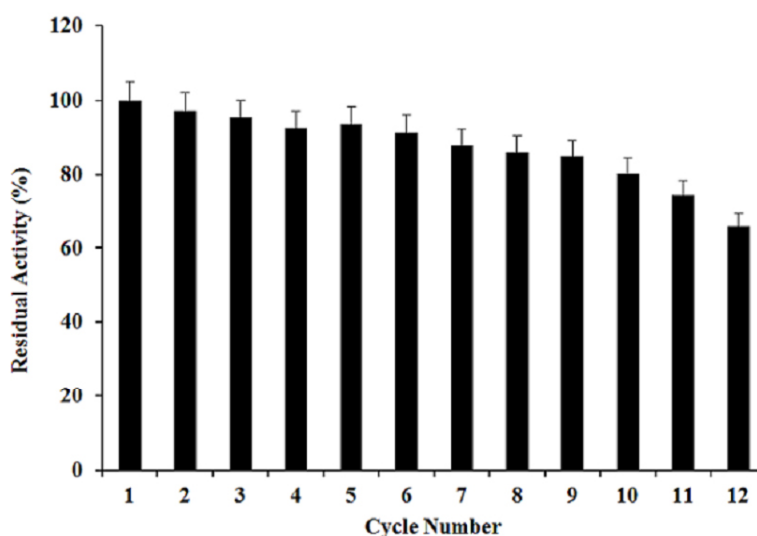
اگرچه فعالیت آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد اندکی کاهش یافته اما مقاومت آن نسبت به شرایط محیطی از جمله دما و pH به میزان قابل توجهی بهبود پیدا کرده است. آنزیم تثبیت شده قادر به تحمل دماهای بالا بوده و بیش از 50٪ از فعالیت خود را در دمای 65 درجه سانتی گراد به مدت 60 دقیقه حفظ کرده است. از آنجا که در کاربردهای صنعتی استفاده از دمای بالا برای محافظت میکروبی مواد غذایی لازم و ضروری است، استفاده از این روش تثبیت موجب افزایش بهینه دمای آنزیم تثبیت شده نسبت به بهینه دمای آنزیم آزاد به میزان 5 درجه سانتی گراد گردیده که نشان دهنده بهبود استحکام و ثبات ساختار پروتئینی آنزیم و در نهایت افزایش مقاومت حرارتی آن گردیده است. همچنین بهینه pH آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد به میزان 0/5 واحد کاهش یافته و نشان از مقاومت بالاتر آنزیم تثبیت شده در شرایط اسیدی دارد. نیمه عمر ($t_{1/2}$) آنزیم تثبیت شده به میزان چشمگیری از آنزیم آزاد بالاتر است. بر اساس نتایج به دست آمده نیمه عمر آنزیم تثبیت شده به میزان 6 برابر در دمای 65 درجه سانتی گراد افزایش یافته است. از دیگر نتایج مهم این تحقیق می توان به قابلیت استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده در فرایند

کاهش K_m پس از تثبیت آنزیم نشان می دهد که غلظت کم تر سوپسترا نسبت به آنزیم آزاد جهت رسیدن به 1/2 سرعت بیشینه مورد نیاز است که می توان آن را به در دسترس بودن بیش تر سوپسترا در ناحیه سایت فعال 1 آنزیم تثبیت شده در اثر انجام فرایند تثبیت نسبت داد. تغییر محدود V_{max} به احتمال زیاد به علت تغییر در بار موثر سایت فعال آنزیم بعد از اتصال به حامل است که انتقال جرمی سوپسترا و دسترسی آن به جایگاه فعال آنزیم افزایش یافته است. هر چند فرایند تثبیت تاثیر معنی داری را روی V_{max} آنزیم نداشته، اما تمایل سایت فعال آنزیم جهت اتصال به سوپسترای اینولین افزایش داشته است.

3-8- تعیین قابلیت استفاده مجدد 2 آنزیم تثبیت شده

با توجه به نتایج به دست آمده، مشخص گردید که آنزیم تثبیت شده پس از 10 سیکل پی در پی با مدت زمان هیدرولیز 60 دقیقه در دمای 39-40 و pH برابر با 5/5 در هر سیکل، 80٪ از فعالیت خود را حفظ نموده است (شکل 7).

قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده منجر به صرفه جویی در زمان و مقدار آنزیم مصرف شده در فرایند آبکافت گردیده و فرایند را از نظر اقتصادی به صرفه تر ساخته و در نهایت قیمت تمام شده فراورده نهایی را کاهش خواهد داد.



شکل (7) میزان فعالیت باقیمانده آنزیم تثبیت شده طی استفاده در سیکل های متناوب

مغناطیسی می‌باشند. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان ادعا نمود که تثبیت آنزیم اینولیناز با استفاده از اتصالات کووالانسی به نانوحامل‌های پروتئینی مغناطیسی روشی کارآمد برای تثبیت آنزیم آزاد است. دارا بودن قابلیت برگشت مجدد و استفاده از آنزیم تثبیت شده به میزان 12 سیکل همراه با باقیمانده فعالیت کاتالیتیکی بیش از 50٪ توام با راندمان بالا جهت آبکافت اینولین و تبدیل آن به فروکتوز با حفظ مقاومت حرارتی در دمای 75 درجه سانتی‌گراد و افزایش قابل توجه نیمه عمر آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد، تاییدی بر این ادعا می‌باشند.

و حفظ فعالیت آن نسبت به فعالیت اولیه اشاره نمود. آنزیم تثبیت شده پس از 12 سیکل انجام فرایند آبکافت، بیش از 60٪ فعالیت خود را حفظ نموده است. این نوع قابلیت منجر به صرفه‌جویی در زمان فرایند، امکان استفاده از بیورآکتورهای با سیستم مداوم، کاهش آلودگی‌های پروتئینی در محصول نهایی و در نتیجه، کاهش زمان و قیمت فرایندهای تصفیه فرآورده نهایی و کاهش مقدار آنزیم مصرف شده گردیده که کلیه موارد ذکر شده فرایند را از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌سازند. پارامترهای سینتیکی آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد نشان از بهبود دسترسی جایگاه فعال آنزیم به سوبسترای اینولین در نتیجه اتصال کووالانسی آنزیم به نانوحامل‌های

منابع

2014, 1-15.

[7] Sundar, S., Kundu, J., Kundu, S.C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Sci. Tech. Adv. Mater.*, 11, 1-13.

[8] Kim, W.Y., Byun, S.M., Uhm, T.B. (1982). Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminoethylcellulose. *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 239-244.

[9] Ettalibi, M., Baratti, J.C. (1992). Immobilization of *Aspergillus ficuum* inulinases on porous glass. *Biocatal. Biotransformation*, 5, 175-182.

[10] Kim, D.H., Choi, Y.J., Song, S.K., Yun, J.W. (1997). Production of inulo-oligosaccharides using endo-inulinases from a *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.*, 19, 369-371.

[11] Kovaleva, T.A., Holyavka, M.G., Bogdanova, S.S. (2009). Inulinase immobilization on macroporous anion-exchange resins by different methods. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 148, 39-41.

[12] Elnashar, M.M., Danial, E.N., Awad, G.E. (2009). Novel carrier of grafted alginate for covalent immobilization of inulinase. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 9781-9785.

[1] Nakamura, T., Ogata Y., Akichika S., Nakamura A., Ohta K. (1995). Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 164-169.

[2] Datta, S., Christena, L.R., Rani, Y., Rajaram, S. (2012). Enzyme immobilization: An verview on techniques and support materials. *Biotechnol.*, 3, 1-9.

[3] Liang, X., Shi, H., Jia, X., Yang, Y., Liu, X. (2011). Dispersibility, shape and magnetic properties of nano-Fe₃O₄ particles. *Mater. Sci. Appl.*, 2, 1644-1653.

[4] Gupta, A., Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 3995-4021.

[5] Reddy, L., Arias, J., Nicolas, J., Couvreur, P. (2012). Magnetic nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.*, 112, 5818-5878.

[6] Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y.C., Rojana-sakul, Y. (2014). Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *J. Biomed. Biotechnol.*,



Eng., 436, 1145-1151.

[21] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

[13] Nguyen, Q.D., Rezessy, J.M., Czukor, B., Horschke, A. (2011). Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. *Process Biochem.*, 46, 298-303.

[14] Zemolin, G.P., Gazoni, M., Zobot, G.L., Golunski, S.M., Astolfi, V., Pra, V.D. (2012). Immobilization of inulinase obtained by solid-state fermentation using spray-drying technology. *Biocatal. Biotransformation*, 30, 409-416.

[15] Coghetto, C.C., Scherer, R.P., Silva, M.F., Golunski, S., Pergher, S.B.C., Oliveira, D.D., Oliveira, J.V., Treichel, H. (2012). Natural montmorillonite as support for the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 1, 284-289.

[16] Yewale, T., Singhal, R.S., Vaidya, A.A. (2013). Immobilization of inulinase from *Aspergillus niger* NCIM 945 on chitosan and its application in continuous inulin hydrolysis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2, 96-101.

[17] Missau, J., Scheid, A.J., Foletto, E.L., Jahn, S.L., Mazutti, M.A., Kuhn, R.C. (2014). Immobilization of commercial inulinase on alginate-chitosan beads. *Sustain. Chem. Process.*, 2, 2-13.

[18] Torabizadeh, H., Tavakoli, M., Safari, M. (2014). Immobilization of thermostable Alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* by cross-linked enzyme aggregates method using calcium and sodium ions as additives. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 108, 13-20.

[19] Teng, Z., Luo, Y., Wang, Q. (2012). Nanoparticles synthesized from soy protein: Preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 2712-2720.

[20] Zhanfeng, L., Linhui, Q., Shuangling, Z., Hongyan, W., Xuejun, C. (2013). Synthesis and characterization of monodisperse magnetic Fe_3O_4 @BSA core-shell nanoparticles. *Colloids Surf. A Physicochem.*