

بررسی تأثیر امواج فراصدا بر واکنش آوکافت نشاسته توسط آنزیم آلفا-آمیلاز

حسن صیامی^۱، محمدرضا حسین دخت^{۲*}، علی نخعی پور^۳

۱. گروه شیمی دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد

۲. مرکز پژوهش و فناوری بیومولکول‌های دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

در این پژوهش، اثر امواج فراصدا بر فعالیت و پارامترهای جنبشی (سینتیکی) آوکافت (هیدرولیز) آنزیمی نشاسته توسط آلفا-آمیلاز مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، آنزیم آلفا-آمیلاز برای بازه‌های زمانی متفاوت و بسامد ثابت ۲۰ کیلوهرتز در معرض امواج فراصدا قرار گرفت، سپس فعالیت آن سنجیده شد. نتایج نشان دادند که حداکثر فعالیت نسبی آنزیم در عدم حضور امواج بوده و افزایش زمان امواج باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. فعالیت نسبی آنزیم در زمان‌های ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه به ترتیب برابر با ۱۰۰، ۹۲/۱۳، ۳۴/۶۲ و ۷/۴۷ درصد است. پی‌اچ و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم در حضور و غیاب امواج مشابه بودند (درجه سلسیوس $T=50$ در $pH=6$). مقدار K_m تغییر قابل توجهی نداشت، در حالی که نتایج، یک کاهش در مقدار V_{max} را نشان می‌دهند. هنگامی که محلول حاوی آنزیم و نشاسته هم‌زمان در معرض امواج قرار گرفتند، در مدت زمان ۱۰ دقیقه تابش، درصد تبدیل نشاسته بیش‌تر از شرایط بدون تابش است در حالی که در مدت زمان ۲۰ و ۳۰ دقیقه تابش، این درصد کم‌تر از شرایط معمولی است. به علاوه، اثر این امواج بر روی ساختار آمیلاز توسط روش‌های طیف‌سنجی فلورسانس و لزجت‌سنجی (ویسکومتری) مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از این نتایج می‌توان اثر دوگانه‌ای از امواج را بر عملکرد آنزیم آمیلاز نتیجه گرفت؛ یک اثر تخریبی بر روی ساختار آمیلاز و یک اثر سازنده بر روی افزایش بسامد برخورد سوپسترا و آنزیم و در نتیجه افزایش آوکافت (هیدرولیز) آنزیمی مشاهده می‌شود.

کلیدواژه: آمیلاز، نشاسته، فراصدا، فعالیت، پارامترهای جنبشی (سینتیکی).

۱. مقدمه

یکی از فن‌آوری‌های جدیدی که به منظور افزایش بهره‌وری واکنش‌های آنزیمی مورد بررسی قرار گرفته، استفاده از فن‌آوری فراصدا می‌باشد. این فن‌آوری از جمله فن‌آوری‌های سبز محسوب می‌شود؛ لذا در صورت افزایش کاربری این فن‌آوری نگرانی‌های زیست‌محیطی نیز کم‌تر می‌شوند. گزارش‌های متفاوتی از تأثیر امواج فراصدا بر واکنش‌های آنزیمی ارائه شده‌اند. تأثیر امواج بسته به شرایط آزمایش از جمله نوع آنزیم مورد بررسی، دما، فشار، توان و بسامد دستگاه فراصدا و ... متفاوت هستند [۱-۳]. به عنوان نمونه استفاده از بسامد ۴۰ کیلوهرتز از سامانه‌ی فراصدا (تپی (پالسی) باعث کاهش فعالیت آنزیم سلولاز^۱ می‌شود [۴]. افزایش شدت امواج اعمال شده باعث کاهش

فعالیت آنزیم تریپسین^۲ شد [۵]. بازده واکنش آنزیم لیپاز در حضور امواج فراصدا افزایش یافت [۶-۷]. امواج فراصدا با شدت ۳۰ وات باعث افزایش بازده واکنش آنزیم لاکاز^۳ شد [۸]. در مورد آنزیم پروتئاز^۴ در اثر استفاده از امواج ثابت سرعت مربوط به آوکافت (هیدرولیز)^۵ آنزیمی حدود ۱۸ درصد افزایش و K_m بدون تغییر می‌ماند [۹]. گزارش‌های متفاوتی نیز از اثر امواج فراصدا بر روی آنزیم آمیلاز ارائه شده‌اند. امواج فراصدا تپی با بسامد ۳۰ کیلوهرتز و توان خروجی ۵۰ وات باعث غیرفعال‌سازی آنزیم آمیلاز^۶ شدند [۱۰]. استفاده از حمام فراصدا با بسامد ۴۰ کیلوهرتز و حداکثر توان خروجی ۱۳۲ وات در دمای کم‌تر از ۵۰ درجه سلسیوس باعث افزایش فعالیت آنزیم

² Trypsin

³ Laccase

⁴ Protease

⁵ Hydrolysis

⁶ Amylase

* نویسنده پاسخگو: houasin@um.ac.ir

¹ Cellulase

ابتدا ۶ میلی‌لیتر آب مقطر را در سل دستگاه فراصدا ریخته و با روشن کردن دستگاه هر ۳۰ ثانیه یک بار به مدت ۴ دقیقه، افزایش دمای نمونه خوانده شد و سپس نمودار تغییرات دما بر حسب زمان رسم گردید. با توجه به رابطه ۱ شدت دستگاه سنجیده شد.

$$\Phi = \frac{mC}{A} * \frac{dT}{dt} \quad (1)$$

در این رابطه m جرم آب، c ظرفیت گرمایی آب و A مساحت سطح مقطع سنجنده (پروب) دستگاه فراصدا هستند. هر چند در بازه‌ی بسامدی کیلوهرتز آثار حرارتی ناچیز است و می‌بایست با هیدروفن اندازه‌گیری شود.

۲-۳. فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیم آمیلاز با استفاده از به آوکافت (هیدرولیز) نشاسته در شرایط مختلف سنجیده می‌شود. برای این کار از نشاسته با غلظت ۰/۱ درصد در بافر^۶ فسفات (۰/۰۲ مولار) در pH=۶ و دمای ۲۷ درجه سلسیوس استفاده شد. روش کار به این صورت است که ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از آنزیم با غلظت (g/l) ۰/۰۲ در لوله آزمایش ریخته و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول نشاسته به آن اضافه شد. سامانه برای مدت ۵ دقیقه انکوبه و بعد با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر از هیدروکلریداسید یک نرمال، واکنش متوقف شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آیدین که از حل کردن یک گرم ید و ده گرم KI در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ساخته شده بود، به نمونه اضافه شد. محلول توسط ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم رسانده و جذب نمونه در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. مقدار آنزیم مورد نیاز برای تبدیل ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشاسته در pH=۶ و دمای ۲۷ درجه سلسیوس و زمان یک دقیقه به عنوان واحد فعالیت آنزیمی تعریف شد [۱۲].

۲-۴. پی‌اچ و دمای بهینه

پی‌اچ بهینه از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در حضور و غیاب امواج در پی‌اچ-های ۴ تا ۸ به دست آمد. سپس، در بازه‌ی دمایی ۲۷ تا ۷۰ درجه سلسیوس در حضور و عدم حضور امواج فعالیت آنزیم محاسبه و دمای بهینه برآورد شد.

⁶ Buffer

آمیلاز و آمیلوگلوکسیداز^۱ شد [۱۰]. با توجه به تحقیقات انجام گرفته بر روی کاربرد امواج فراصدا بر واکنش‌های آنزیمی هنوز سازوکار دقیقی از نحوه تأثیر آن ارائه نشده است. از این‌رو، لازم است تا تحقیقات بیش‌تری برای آنزیم‌های متفاوت در شرایط گوناگون انجام شوند تا بتوان تصویر روشن‌تری از تأثیر امواج فراصدا بر واکنش‌های آنزیمی بدست آورد. در این تحقیق اثر امواج فراصدا با بسامد ۲۰ کیلوهرتز و توان ۲۲/۷۹ وات و مدت زمان‌های مختلف ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بر روی فعالیت آنزیم آمیلاز (که کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف از جمله صنایع نساجی، شوینده، و صنایع غذایی دارد) بررسی شد. از فنون طیف‌سنجی فلورسانس و لزجت‌سنجی نیز برای بررسی تغییرات ساختاری آنزیم در اثر امواج، استفاده شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد

آنزیم آلفا-آمیلاز باسیلوس سابیتیلیس^۲، نشاسته، ید، سدیم یدید، محلول هیدروکلریداسید یک نرمال، سدیم هیدروژن فسفات و سود همگی مواد از شرکت مرک^۳ تهیه شدند.

۲-۲. دستگاه فراصدا

در این تحقیق از دستگاه فراصدای تپی (پالسی) نمونه‌ی ساینتر-آی‌آی‌دی^۴ با بسامد ۲۰ کیلوهرتز استفاده شد. برای انجام آزمایش، ۶ میلی‌لیتر از محلول را در داخل سل دستگاه قرار داده، در حالی که سل با استفاده از گردش آب^۵ سرد می‌شد. سنجنده (پروب) دستگاه به اندازه ۲ سانتی‌متر در زیر محلول آزمایش قرار داشت. حداکثر دمای محلول در طول مدت آزمایش به ۳۷ درجه سلسیوس رسید. بعد از امواج‌دهی جهت حفظ تغییرات، محلول به سرعت، توسط یخ، سرد شده و سپس جهت تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. شدت دستگاه در شرایط آزمایش طبق روش زیر اندازه‌گیری شد [۱۱].

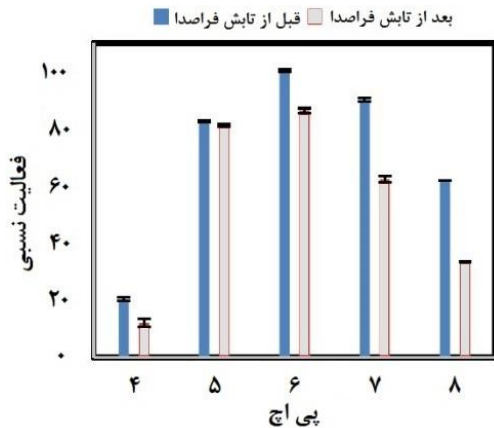
¹ Amyloglucosidase

² Bacillus subtilis

³ Merck

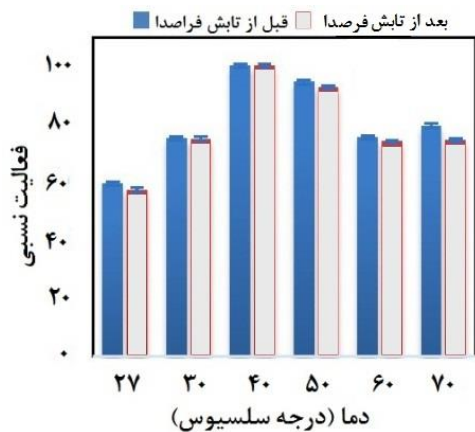
⁴ Scientz-III

⁵ Circulator



شکل ۲ فعالیت نسبی آنزیم آمیلاز در پی-های مختلف قبل و بعد از تابش فراصدا.

نتایج نشان می‌دهند که پی‌اچ بهینه برای هر دو حالت برابر ۶ است. هم‌چنین، دمای بهینه نیز با سنجش فعالیت نسبی آنزیم در دماهای مختلف اندازه‌گیری شد (شکل ۳).



شکل ۳ فعالیت نسبی آنزیم آمیلاز در دماهای مختلف تحت تابش فراصدا.

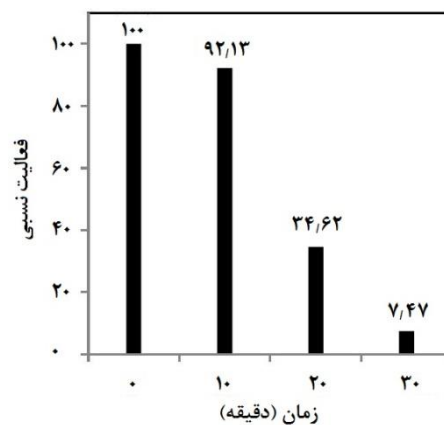
برای بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم آمیلاز ابتدا ۶ میلی‌لیتر از محلول آنزیم به لوله آزمایش انتقال داده شد. سپس، برای مدت ۱۰، ۲۰، ۳۰ دقیقه در همین دما انکوبه شد. بعد، فعالیت مشابه روش ذکر شده سنجیده شد. نتایج نشان می‌دهند که افزایش دما تا ۳۷ درجه سلسیوس تغییر فعالیت را سبب نمی‌شود. بنابراین، افزایش دمای ناشی از امواج نمی‌تواند عامل کاهش فعالیت مشاهده شده در آنزیم آمیلاز تحت تابش باشد. تأثیر افزایش دما تا ۳۷ درجه سلسیوس بر طیف فلورسانس

۲-۵. پارامترهای جنبشی (سینتیکی)

پارامترهای جنبشی (سینتیکی) (V_m و K_m) با استفاده از اندازه‌گیری سرعت اولیه واکنش آنزیمی در غلظت‌های ۰٫۲، ۰٫۴، ۰٫۶، ۰٫۸ و ۱٫۰ گرم بر لیتر نشاسته در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و $pH=6$ سنجیده شدند.

۳. نتایج

نتایج فعالیت آنزیمی تحت تابش فراصدا به مدت ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه در شکل ۱ ملاحظه می‌شود.



شکل ۱ فعالیت نسبی آنزیم آمیلاز در زمان‌های مختلف تابش فراصدا.

بعد از تابش ۱۰ دقیقه امواج فراصدا، فعالیت آنزیم تقریباً ۸ درصد کاهش می‌یابد؛ این کاهش فعالیت بعد از ۲۰ و ۳۰ دقیقه تابش به ترتیب برابر ۶۵٫۵ و ۸۲٫۵ درصد است. فعالیت مطلق مربوط به این نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱ فعالیت مطلق آنزیم در زمان‌های مختلف امواج دهی.

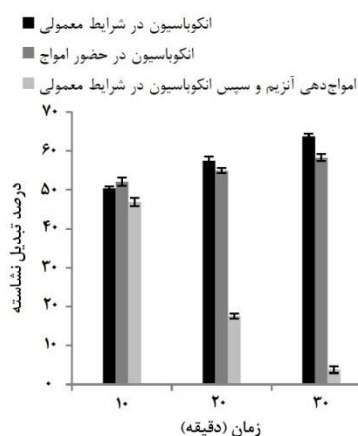
زمان امواج دهی (دقیقه)	فعالیت (unit/mg)
۰	۱۹٫۰۴
۱۰	۱۷٫۵۴
۲۰	۶٫۵۹
۳۰	۱٫۴۲

سپس فعالیت نسبی آنزیم محلول و امواج دیده (به مدت ۱۰ دقیقه) در پی‌اچ-های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲).

جدول ۲ پارامترهای جنبشی (سینتیکی) آنزیم در زمان‌های مختلف تابش با امواج فراصدا.

انحراف استاندارد	V_{max}	انحراف استاندارد	K_m	زمان (دقیقه)
۰٫۱۸	۱٫۳۰	۰٫۵۲	۵٫۰۶	۰
۰٫۸	۰٫۷۴	۰٫۶۵	۶٫۵۵	۱۰
۰٫۱	۰٫۷۴	۰٫۲۴	۶٫۵۵	۲۰

مقدار K_m آمیلاز محلول (g/l) ۵٫۰۶ به دست آمد که در محدوده‌ی مقادیر گزارش شده در تحقیقات قبلی است [۱۳-۲۲]. مقدار K_m برآورد شده در اثر تابش امواج تغییر محسوسی نکرد، ولی V_{max} کاهش یافت. در ادامه درصد تبدیل نشاسته در شرایط مختلف برآورد شد (شکل ۵). همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود؛ هنگامی که محلول حاوی آنزیم و سوبسترا (هم‌زمان) در معرض امواج قرار می‌گیرد، تجزیه سوبسترا در زمان ۱۰ دقیقه به مقدار جزئی ۲ درصد افزایش می‌یابد؛ در صورتی که ۲۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه تابش نسبت به ۲۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه انکوباسیون در عدم حضور امواج باعث تجزیه کم‌تر سوبسترا شده است. علاوه بر این، هنگامی که آنزیم به تنهایی در معرض امواج قرار می‌گیرد و سپس درصد تبدیل نشاسته سنجیده می‌شود، مقدار نشاسته کم‌تری در هر سه زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه نسبت به شرایط معمولی تجزیه می‌شود.

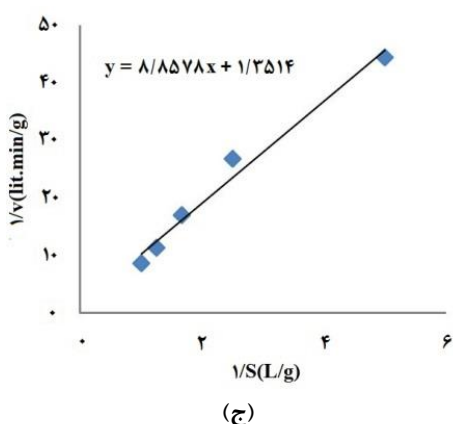
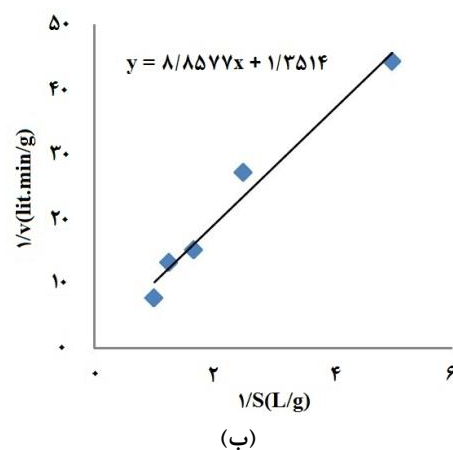
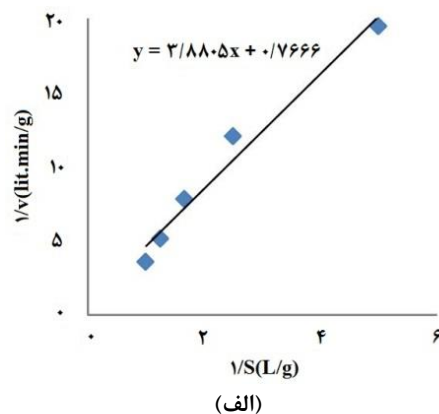


شکل ۵ درصد تبدیل نشاسته در شرایط مختلف.

مقدار کاهش تجزیه سوبسترا در زمان‌های ۲۰ و ۳۰ دقیقه به طور چشم‌گیری بیش‌تر از شرایطی است که در آن

آنزیم بررسی گردید و نتایج تغییری را نشان نمی‌دهند (شکل ۷).

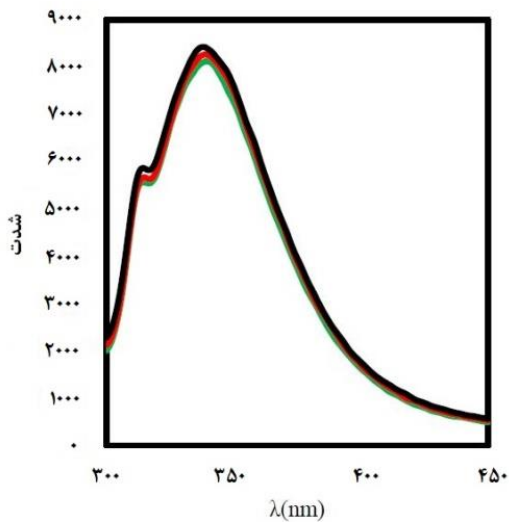
پارامترهای جنبشی (سینتیکی) برای آنزیم قرار گرفته در معرض امواج تحت تابش ۱۰ و ۲۰ دقیقه، جدول ۲، با استفاده از رسم نمودار لاینوروبرک، شکل ۴، برآورد گردید.



شکل ۴ نمودار لاینوروبرک (الف) قبل از تابش (ب) بعد از ۱۰ دقیقه تابش (ج) بعد از ۲۰ دقیقه تابش.

تیروزین و تریپتوفان هستند [۲۴-۲۵]. جابجایی کمی در حد ۳ نانومتر به سمت طول موج کم تر (شیفت آبی)^۱ برای قله مربوط به اسید آمینه تریپتوفان و دو نانومتر هم برای اسید آمینه تیروزین؛ بعد از ۳۰ دقیقه تابش امواج فراصدا مشاهده می شود. شدت طیف نیز با افزایش زمان تابش کاهش می یابد که می تواند ناشی از فرآیند خاموشی فلورسانس به دلیل تولید رادیکال های آزاد توسط امواج فراصدا باشد.

طیف فلورسانس مربوط به دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه در مقایسه با دمای ۲۷ درجه سلسیوس در شکل ۷ ارائه شده است. با توجه به این طیف نیز مشخص است که افزایش دما تأثیری در ساختار سوم آنزیم نداشته است.

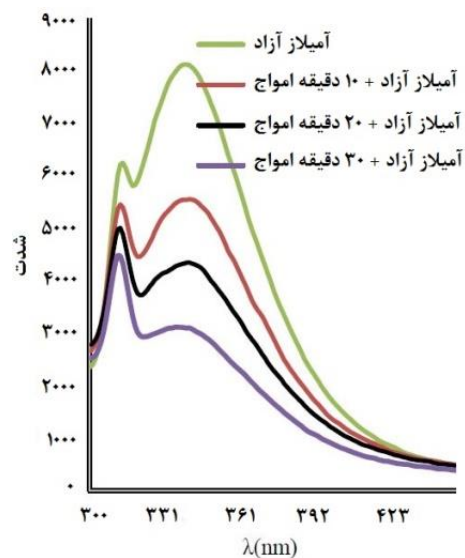


شکل ۷ طیف فلورسانس آمیلاز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس بدون تابش (سیز)، ۱۰ دقیقه (قرمز) و ۲۰ دقیقه (سیاه) تابش فراصدا در دمای ۳۷ درجه سلسیوس.

لزجت مربوط به نمونه های آنزیمی در شرایط مختلف با استفاده از لزجت سنج استوالد^۲ سنجیده شد. شکل ۸ نشان می دهد که لزجت نمونه آنزیمی بعد از تابش با امواج فراصدا به طور جزئی کاهش می یابد.

محلول حاوی آنزیم و سوبسترا (هم زمان) در معرض امواج فراصدا قرار می گیرد. به این صورت، تجزیه نشاسته توسط آنزیمی که برای ۲۰ دقیقه تابش داشته است ۳۹ درصد نسبت به شرایط معمولی کاهش می یابد. در صورتی که این کاهش برای محلول حاوی آنزیم و سوبسترای که (هم زمان) در معرض امواج قرار می گیرد، فقط ۲٫۵ درصد است. در مدت زمان ۳۰ دقیقه تابش این تفاوت بسیار بیش تر می شود به گونه ای که درصد تجزیه نشاسته برای آنزیمی که ۳۰ دقیقه تابش داشته، ۵۹ درصد نسبت به شرایط معمولی کم تر است. برای نمونه محلول حاوی آنزیم و سوبسترای (که هم زمان) در معرض تابش امواج فراصدا قرار می گیرد، فقط ۵٫۵ درصد کاهش، نسبت به شرایط معمولی مشاهده می شود.

تجزیه و تحلیل فلورسانس یک تجزیه و تحلیل مناسب جهت بررسی تغییر در ساختار سوم پروتئین می باشد [۲۳]. طیف فلورسانس (با طول موج برانگیختگی ۲۸۰ نانومتر) در زمان های مختلف تابش امواج فراصدا در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۶ طیف فلورسانس آنزیم آمیلاز در زمان های مختلف تابش امواج فراصدا.

این طیف دارای دو قله در طول موج های ۳۱۳ و ۳۳۸ نانومتر می باشد که به ترتیب مربوط به اسید آمینه های

¹ Blue shift

² Ostwald viscometer

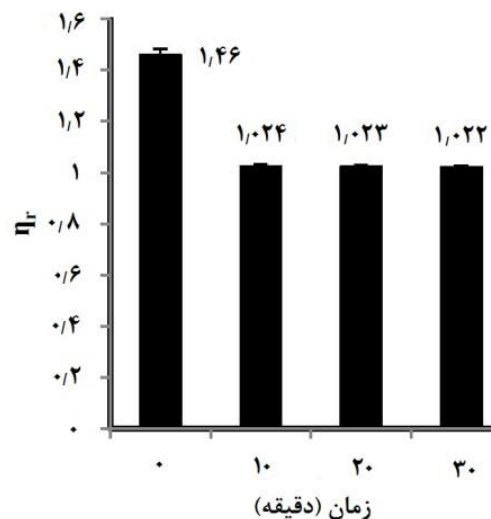
که در اثر تجزیه آب تشکیل می‌شوند [۲۶]، می‌توانند بر ساختار آنزیم تأثیر بگذارند. از طرفی، وقتی محلول حاوی آنزیم و سوبسترا (هم‌زمان) در معرض تابش امواج قرار می‌گیرد، بعد از ۲۰ و ۳۰ دقیقه تابش میزان تجزیه سوبسترا نسبت به عدم حضور امواج ۵/۵ درصد کم‌تر است، ولی میزان کاهش آن در مقایسه با تابش در غیاب سوبسترا (کاهش ۶۵ تا ۹۳ درصد) بسیار کم‌تر شده که می‌توان این رفتار را به حضور سوبسترا مرتبط نمود. البته، بعد از ۱۰ دقیقه این روند عکس می‌شود؛ این پدیده را می‌توان به نقش افزایش انتقال جرم در حضور امواج نسبت داد. به عبارت دیگر، امواج دارای اثری دوگانه می‌باشند، یعنی با تغییر ساختار آنزیم باعث کاهش بازده واکنش آنزیمی می‌شوند و از سمت دیگر، امواج با افزایش برخورد آنزیم-سوبسترا بازده واکنش را افزایش می‌دهند. تأثیر کلی امواج بر بازده واکنش بستگی به سهم هر یک از این دو اثر ذکر شده دارد.

۶. تقدیر و تشکر

این تحقیق مربوط به طرح پژوهشی با کد ۳۲۸۸۹۹ مربوط به معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی بوده که بدین وسیله از آن حوزه تقدیر می‌گردد.

۷. فهرست منابع

- [1] R. Kadkhodae, M.J. Povey, "Ultrasonic inactivation of Bacillus α -amylase. I: Effect of gas content and emitting face of probe," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 15, pp.133-142, 2008.
- [2] C. Bendicho, I.D.L. Calle, F. Pena, M. Costas, N. Cabaleiro, I. Lavilla, "Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry," *Trac Trends in Analytical Chemistry*, vol. 31, pp. 50-60, 2012.
- [3] E.S. Beach, Z. Cui, P.T. Anastas, "Green chemistry: A design framework for sustainability," *Energy and Environmental Science*, vol. 2, pp. 1038-1049, 2009.
- [4] O.E. Szabó, E. Csiszár, "The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme," *Carbohydrate Polymers*, vol. 98, pp. 1483-1489, 2013.
- [5] Z.M. Tian, M.X. Wan, S.P. Wang, J.Q. Kang, "Effects of ultrasound and additives



شکل ۸ لزجت آنزیم آمیلاز بعد از زمان‌های مختلف تابش‌دهی امواج فراصدا.

۴. بحث

تأثیر امواج فراصدا بر ساختار و فعالیت آنزیم آمیلاز به روش سنجش فلورسانس، لزجت‌سنجی و سنجش فعالیت انجام شد. با توجه به جابجایی آبی در طول موج بیشینه نشر می‌توان نتیجه گرفت که ساختار آنزیم در حضور امواج متحمل تاخوردگی جزئی می‌شود. از آنجایی که لزجت محلول آنزیمی وابسته به ساختار آنزیم است، انتظار داریم که تاخوردگی پیش‌بینی شده از فلورسانس با لزجت‌سنجی تأیید گردد. کاهش لزجت محلول آنزیمی در حضور امواج گواهِ بر تاخوردگی ساختار آمیلاز است. سنجش فعالیت آنزیم در شرایط مختلف نشان داد که در حضور امواج تغییرات ساختاری ملاحظه شده سبب کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. حضور سوبسترا در مجاورت آنزیم به هنگام امواج‌دهی اثر نامطلوب امواج را کاهش داده و به نظر می‌رسد که ساختار را در برابر امواج محافظت می‌نماید.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج نشان دادند هنگامی که محلول آنزیم به تنهایی در معرض تابش امواج فراصدا قرار می‌گیرد، با افزایش زمان تابش فعالیت آنزیم کاهش بیشتری می‌یابد (از ۸ تا ۹۳ درصد)؛ که می‌تواند حاکی از تأثیر امواج فراصدا بر روی ساختار آنزیم باشد. فشارها و دماهای زیاد ایجاد شده ناشی از پدیده کواکزیایی و هم‌چنین رادیکال‌های آزادی

- of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 69, pp. 8-14, 2011.
- [17] V. Swarnalatha, R.A. Esther, R. Dhamodharan, "Immobilization of α -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 96, pp. 6-13, 2013.
- [18] P. Tripathi, A. Kumari, P. Rath, A.M. Kayastha, "Immobilization of α -amylase from mungbeans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 49, pp. 69-74, 2007.
- [19] M. Sedaghat, M. Ghiaci, H. Aghaei, S. Soleimani-Zad, "Enzyme immobilization. Part 3: Immobilization of α -amylase on Nabentonite and modified bentonite," *Applied Clay Science*, vol. 46, no. 2, pp. 125-130, 2009.
- [20] S. Aksoy, H. Tumturk, N. Hasirci, "Stability of α -amylase immobilized on poly (methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres," *Journal of Biotechnology*, vol. 6, pp. 36-47, 1998.
- [21] L. Cong, R. Kaul, U. Dissing, B. Mattiasson, "A model study on Eudragit and polyethyleneimine as soluble carriers of α -amylase for repeated hydrolysis of starch," *Journal of Biotechnology*, vol. 42, pp. 75-84, 1995.
- [22] Y. Liu, S. Jia, J. Ran, S. Wu, "Effects of static magnetic field on activity and stability of immobilized α -amylase in chitosan bead," *Catalysis Communications*, vol. 11, pp. 364-367, 2010.
- [23] M.I. Viseu, T.I. Carvalho, S.M. Costa, "Conformational transitions in beta-lactoglobulin induced by cationic amphiphiles: Equilibrium studies," *Journal of Biophysics*, vol. 86, pp. 2392-2402, 2004.
- [24] H. Ma, L. Huang, J. Jia, R. He, L. Luo, W. Zhu, "Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18, pp. 419-424, 2011.
- [25] E.A. Permyakov, "Luminiescent Spectroscopy of Proteins," CRC Press Inc, Boca Raton, FL, Chapter 4, 1993.
- [26] K.S. Suslick, "Ultrasound: Its Chemical, Physical and Biological Effects," VCH Publisher, 1988.
- on the function and structure of trypsin," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 11, pp. 399-404, 2004.
- [6] N. Gharat, V.K. Rathod, "Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 20, pp. 900-905, 2013.
- [7] H.R. Lobo, B.S. Singh, D.V. Pinjari, A.B. Pandit, G.S. Shankarling, "Ultrasound-assisted intensification of bio-catalyzed synthesis of mono-N-alkyl aromatic amines," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 70, pp. 29-34 2013.
- [8] C. Basto, T. Tzanov, A. Cavaco-Paulo, "Combined ultrasound-laccase assisted bleaching of cotton," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 14, pp. 350-354, 2007.
- [9] Z. Wang, X. Lin, P. Li, J. Zhang, S. Wang, H. Ma, "Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment," *Bioresource Technology*, vol. 117, pp. 222-227, 2012.
- [10] E.X. Leaes, D. Lima, L. Miklasevicius, A.P. Ramon, V. Dal Prá, M.M. Bassaco, L.M. Terra, M.A. Mazutti, "Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 2, pp. 21-25, 2013.
- [11] V. Sivakumar, P.G. Rao, "Studies on the use of power ultrasound in leather dyeing," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 10, pp. 85-94, 2003.
- [12] P.C. Ashly, M.J. Joseph, P.V. Mohanan, "Activity of diastase α -amylase immobilized on polyanilines (PANIs)," *Food Chemistry*, vol. 127, pp. 1808-1813, 2011.
- [13] D. Meridor, A. Gedanken, "Forming nanoparticles of α -amylase and embedding them into solid surfaces," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 90, pp. 43-48, 2013.
- [14] G. Bayramoğlu, M. Yilmaz, M.Y. Arica, "Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: Kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis," *Food Chemistry*, vol. 84, pp. 591-599, 2004.
- [15] O. Türünç, M.V. Kahraman, Z.S. Akdemir, N. Kayaman-Apohan, A. Güngör, "Immobilization of α -amylase onto cyclic carbonate bearing hybrid material," *Food Chemistry*, vol. 112, pp. 992-997, 2009.
- [16] A. Kumari, A.M. Kayastha, "Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization," *Journal*