Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Stabilization of Industrial Enzymes Using Heterocyclic Compounds: Investigating the Effect of Indole and Trans-Chalcone on the Thermal Stability and Amorphous Aggregation of Bacillus *amyloliquefaciens Alpha-Amylase*

Leila Adibi Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. adibleila90@gmail.com

Parichehreh Yaghmaei Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. yaghmaei_p@srbiau.ac.ir

Parvaneh Maghami Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. maghami@srbiau.ac.ir

Azadeh Ebrahim-Habibi Biosensor Research Center, Institute of Cellular-Molecular Sciences of Endocrinology and Metabolism, Tehran University of Medical Sciences; Endocrinology and Metabolism Research Center, Institute of Clinical Sciences of Endocrinology and Metabolism, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran **(Corresponding author).** aehabibi@sina.tums.ac.ir

Abstract

Objective: Proteins can undergo structural changes leading to amyloid or amorphous aggregates. Amorphous aggregates are particularly significant for industrial or therapeutic enzymes, as they may trigger adverse reactions in biological systems. Alpha-amylase, a widely used industrial enzyme, was studied here to evaluate the stabilizing effects of indole and trans-chalcone on its thermal stability and amorphous aggregation.

Materials and Methods: The thermal stability of the enzyme was assessed by measuring its residual activity over 20 minutes at 60°C. Amorphous aggregation was kinetically monitored via turbidity measurements using a spectrophotometer. Deamidation assays and Congo red tests were performed to evaluate covalent changes and amyloid formation, respectively. These experiments were conducted in the presence and absence of trans-chalcone and indole derivatives. The amorphous aggregation state was further analyzed using transmission electron microscopy (TEM).

Findings: Indole, a nitrogen-containing heterocyclic compound, demonstrated superior stabilization and anti-aggregation effects compared to trans-chalcone, a flavonoid precursor. Enzyme deamidation was significantly lower in the presence of indole. TEM images confirmed reduced amorphous particle aggregation in indole-treated samples.

Received: 2024/03/24 ; **Revised:** 2024/05/01 ; **Accepted:** 2024/06/05 ; **Published online:** 2024/06/22

Cite: Adibi, L., Yaghmaei, P., Maghami, P. & Ebrahim-Habibi, A. (2024). Stabilization of Industrial Enzymes Using Heterocyclic Compounds: Investigating the Effect of Indole and Trans-Chalcone on the Thermal Stability and Amorphous Aggregation of Bacillus amyloliquefaciens Alpha-Amylase. *Applied Biology*, 14(2), p. 33-52. https://doi.org/10.71504/SJOAPB.2024.1189534

Article type: Research Article © the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

CC BY NC

Conclusion: Indole-based structures are proposed as promising candidates for designing compounds that inhibit amorphous aggregation in industrial enzymes.

Keywords: Industrial enzymes, heterocyclic compounds, indole, trans-chalcone, thermal stability, alpha-amylase, Bacillus amyloliquefaciens.

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

پایدارسازی آنزیم‌های صنعتی با استفاده از ترکیبات هتروسیکلیک: بررسی اثر ایندول و ترانس چالکون بر پایداری حرارتی و فرم آمورف آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکوئی فاشینس*

لیلا ادیبی گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. adibleila90@gmail.com
پریچهره یغمایی گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. yaghmaei_p@srbiau.ac.ir
پروانه مقامی گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. maghami@srbiau.ac.ir
آزاده ابراهیم حبیبی مرکز تحقیقات بیوسنسور، پژوهشکده علوم سلولی- مولکولی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران؛ مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشکده علوم بالینی غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (**نویسنده مسئول**).
aehabibi@sina.tums.ac.ir

چکیده

هدف: پروتئین‌ها می‌توانند با تغییر ساختار طبیعی، به سمت تجمعات آمیلوئیدی یا بدون شکل (آمورف) پیش روند. تجمع‌های بی‌شکل، به خصوص در مورد آنزیم‌های با کاربرد صنعتی یا درمانی، با اهمیت هستند و می‌توانند موجب بروز واکنش‌های نامطلوب در بدن شوند. آنزیم آلفا آمیلاز ازجمله آنزیم‌های صنعتی بوده و در پژوهش حاضر تاثیر ترکیبات ایندولی و ترانس- چالکون بر پایداری و تشکیل تجمعات آمورف آن بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: پایداری دمایی آنزیم با بررسی فعالیت باقیمانده آن در طول زمان (۲۰ دقیقه) در ۶۰ درجه سانتیگراد مطالعه شده است. بررسی تجمع آمورف آنزیم با استفاده از اسپکتروفوتومتر و با اندازه‌گیری کدورت محلول به صورت کینتیکی انجام شد. آزمون‌های میزان دآمیداسیون آنزیم و تست کنگو رد به ترتیب جهت بررسی تغییر کووالان و عدم تشکیل تجمع‌های آمیلوئیدی انجام شد. این آزمایش‌ها در غیاب و حضور ترانس چالکون و مشتقات ایندول انجام شدند و وضعیت تجمع آمورف آنزیم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مطالعه شد.

یافته‌ها: ایندول، که یک ترکیب هتروسیکلیک حاوی نیتروژن است، نسبت به ترانس چالکون که ساختار

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۰۵ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۳/۰۲/۱۲ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۰۳/۱۶ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۳/۰۴/۰۲
پژوهش حاضر برگرفته از: رساله دکتری، لیلا ادیبی، با عنوان: تاثیر آرژینین، تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین، ایندول، گابا، بر پایداری حرارتی و تجمع آمورف آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس آمیلو لیکوپی فاشینس در شرایط **in vitro** و **in vivo**، می‌باشد.
استناد به این مقاله: ادیبی، لیلا؛ یغمایی، پریچهره؛ مقامی، پروانه؛ ابراهیم حبیبی، آزاده (۱۴۰۳). پایدارسازی آنزیم‌های صنعتی با استفاده از ترکیبات هتروسیکلیک: بررسی اثر ایندول و ترانس چالکون بر پایداری حرارتی و فرم آمورف آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکوئی فاشینس*. *بیولوژی کاربردی*، ۱۴(۲)، ص ۳۳-۵۲. https://doi.org/10.71504/SJOAPB.2024.1189534
ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
© نویسندگان
نوع مقاله: پژوهشی

پیش‌ساز فلاونوئیدهاست، تاثیر بهتری بر پایدارسازی آنزیم و مهار تجمع آن دارد. میزان دآمیداسیون آنزیم در حضور ایندول کمتر از ترانس چالکون بود. بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نیز نشان داد که در حضور ایندول، ذرات تجمع آمورف میزان کمتری دارند.

نتیجه‌گیری: ساختار ایندولی به عنوان کاندیدای مناسبی برای طراحی ترکیبات مهارکننده تجمع آمورف پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: آنزیم‌های صنعتی، ترکیبات هتروسیکلیک، ایندول، ترانس چالکون، پایداری حرارتی، آلفا آمیلاز، باسیلوس آمیلو لیکوئی فاشینس.

۱. مقدمه

آنزیم‌ها، بیوکاتالیزورهایی هستند که واکنش‌های شیمیایی خاص را با سرعت کنترل شده انجام می‌دهند. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری برای استفاده از آنزیم‌ها در صنایع مختلف انجام شده است (۱). کارایی بالای کاتالیزورهای زیستی، به علت عدم سمّیت، حلالیت در آب، سازگاری با محیط زیست، فعالیت در شرایط ملایم pH، دما و فشار، کاهش زمان و هزینه تولید، مورد توجه قرار گرفته است (۲، ۳). آمیلازها شامل آلفا آمیلازها، بتا آمیلازها و گلوکوآمیلازها، از خانواده‌های بسیار مهم آنزیمی در علوم مختلف ازجمله بیوتکنولوژی و بیوشیمی می‌باشند (۴). در این میان، آلفا آمیلازها نقش محوری در تجزیه نشاسته ایفا می‌کنند (۵). این آنزیم‌ها با هیدرولیز داخلی پیوندهای گلیکوزیدی نشاسته، گلیکوژن، آمیلوپکتین و آمیلوز، این ترکیبات را عمدتاً به مالتوز و گلوکز تبدیل می‌کنند (۶). این آنزیم‌ها از سه منبع مهم جانوری، گیاهی و میکروبی حاصل می‌شوند. ولی استفاده از منبع میکروبی به دلیل سازگاری بالا با شرایط محیطی، کارایی بهتر و محصولات با کیفیت، نسبت به سایرین ارجحیّت دارد. از بین آمیلازهای میکروبی، آمیلازهای مشتق از باسیلوس‌ها مورد مطالعه بیشتری قرار گرفته و در صنعت نیز جزو مهم‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده می‌باشند (۷). یکی از رایج‌ترین و پرکاربردترین آنها از باکتری‌های مزوفیل ترشح می‌شود و آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلو لیکوئی فاشینس* است[1] که معمولاً با نماد BAA نمایش داده می‌شود (۸). BAA در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد غیرفعال می‌شود و مانند اکثر آلفا آمیلازها برای یکپارچگی ساختاری و فعالیت آنزیمی و پایداری حرارتی آن، یون کلسیم ضروری است (۹). آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکوئی فاشینس* متعلق به خانواده GH13 می‌باشد و از ۳ دمین A وB وC تشکیل شده است. دمین A، هسته مرکزی پروتئین بوده و دارای ساختار بشکه (β/α)8 می‌باشد و دمین‌های B و C در طرفین آن قرار دارند (۱۰). اسید آمینه‌های جایگاه فعال آن شامل Asp329، Asp232 و Glu 262 هستند (۵). مطالعات آنزیم نشان داده که pH، دما و زمان واکنش بهینه فعالیت آنزیم به ترتیب ۶/۵ و ۶۰ تا ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ دقیقه است. حدود ۷۲ درصد فعالیت آنزیم پس از حرارت دادن محلول آنزیم در دمای ۵۰ درجه، به مدت ۳۰ دقیقه حفظ می‌شود. فعالیت نسبی آنزیم در حضور کلسیم ۱۴۶/۲۵ درصد افزایش می‌یابد (۱۱).

کاربردهای بالقوه این آنزیم‌ها شامل تصفیه فاضلاب، فرآوری نشاسته، تولید اتانول زیستی، و

1. Bacillus amyloliquefaciens alpha-amylase (BAA)

ساخت مخلوط‌های الیگوساکاریدی و دکسترین‌های شاخه‌دار با وزن مولکولی بالا برای تولید غذاهای پودری می‌باشد (۱۲). در حال حاضر این آنزیم‌ها در صنایع مختلف کاغذسازی، غذایی، نساجی و دارویی کاربردهای بسیاری دارند (۱۳). از آغاز تولید آنزیم در مقیاس زیاد برای کاربردهای صنعتی، روش‌های مختلف پایدار کردن آنزیم ازجمله مهندسی ژن، مهندسی پروتئین و مهندسی محیط، برای بهبود خواص آنزیم‌ها و افزایش پایداری آنها استفاده شده است (۱۴). برای عملکرد طبیعی پروتئین، در شرایط محیطی مناسب، ساختار سه‌بعدی منحصر به فردی مورد نیاز است (۱۵). این ساختار سه‌بعدی به واسطه تاخوردگی پروتئین‌ها صورت می‌گیرد، و شکل این تاخوردگی توسط توالی اسید آمینه‌ای آنها تعیین می‌شود. در داخل سلول، چاپرون‌های ملکولی، پروتئین‌های اشتباه تاخورده[1] را تا حدودی اصلاح کرده و از تجمع آنها جلوگیری می‌کنند. چاپرون‌ها، ملکول‌های پروتئینی هستند که به قسمتی از پروتئین تاخورده، متصل شده و باعث ثبات آن ناحیه می‌شوند. این ثبات باعث هدایت پلی پپتید به سوی تاخوردن صحیح سه‌بعدی خواهد شد (۱۶). شرایط سخت محیطی مانند دمای بالا یا پایین، pH بالا یا پایین، فشار بالا، وجود یون‌های فلزی، سورفاکتانت‌ها، کمک حلال ها، غلظت‌های بالای پروتئین و تغییرات شیمیایی، می‌تواند منجربه بی‌ثباتی ساختار پروتئین و هدایت آن به سمت تجمع شود (۱۷). این عوامل در فرایندهای صنعتی وجود دارند و بنابراین، پایدارسازی آنزیم‌ها جهت افزایش طول عمر آنها جزو موضوع‌های تحقیقاتی کاربردی محسوب می‌شود (۱۵).

بی‌ثباتی ساختار که منجربه بازشدگی جزئی در ساختار پروتئین‌ها می‌شود، ممکن است باعث رسوب پروتئین شده و تجمعاتی شکل گیرد که در مقایسه با حالت طبیعی پروتئین انرژی آزاد کمتری دارند و بنابراین پایدارترند (۱۵). تجمع پروتئین‌ها می‌تواند بسته به شرایط، به دو صورت آمیلوئید و یا آمورف باشد. آمیلوئید نوعی تجمع با ساختار فوق ثانویه بتای متقاطع است که به طور گسترده در زمینه‌های پاتولوژیک شناسایی و مطالعه شده است. اختلالات نورودژنریتیو، دیابت نوع ۲، آمیلوئیدوز ارثی لیزوزیم و آمیلوئیدوز سیستمیک از گروه بیماری‌های آمیلوئیدی می‌باشند. با این حال تجمعات آمورف، بسیار کمتر مطالعه شده‌اند، در حالی که آنها هم می‌توانند با بیماری‌ها مرتبط باشند. ازجمله ترکیب پروتئین تائو در بیماری آلزایمر با فیبریل‌های آمیلوئیدی، توده‌های آمورف در آلفا سینوکلئین مربوط به بیماری پارکینسون، تجمعات آمورف ایمونوگلوبولین‌های مرتبط با بیماری نارسایی کلیه و همچنین تجمعات آمورف کریستالین در بیماری کاتاراکت را می‌توان نام برد (۱۸).

1. Misfold

اسمولیت‌ها، افزودنی‌هایی با وزن ملکولی کم هستند، که بر روی حلالیت و پایداری پروتئین‌ها موثر بوده، این پارامترها را افزایش می‌دهند، و امکان استفاده از برخی پروتئین‌ها را در صنایع مختلف، ازجمله صنایع دارویی، غذایی، و نساجی فراهم آورده‌اند (۱۵). به طور مثال اثر پایدارکننده گلوتامات، هیستیدین، گلایسین و آرژینین بر روی فعال‌کننده پلاسمینوژن بافت انسانی، هورمون رشد انسانی، استرپتوکیناز و فاکتور انعقادی را می‌توان نام برد که در صنعت داروسازی کاربرد دارند. همچنین هیستیدین باعث پایداری آنزیم لاکتات دهیدروژناز می‌شود (۱۷). در این تحقیق اثر دو افزودنی ایندول و ترانس چالکون بر پایداری آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکویی فاشینس* و تجمع آمورف آن در شرایط *in vitro* بررسی شده است. علی‌رغم وجود مطالعات گسترده در زمینه پایداری پروتئین‌ها، به ویژه آنزیم‌های کاربردی در چندین دهه اخیر و اهمیت پایداری آلفا آمیلازها و نقش کلیدی این آنزیم‌ها در صنایع مختلف، ایجاد پایداری در آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکویی فاشینس* و ممانعت از تشکیل تجمعات آمورف در آن، با استفاده از ترکیبات افزودنی ایندولی و چالکون، برای اولین بار در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفته است.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد و تجهیزات آزمایشگاهی

آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکویی فاشینس*، نشاسته محلول، معرف ۳و۵ دی نیترو سالیسیک اسید[1] از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا و کیت آمونیوم از شرکت زیست شیمی ایران، تهیه شد. ایندول، ایندول ۳-کربینول[2]، ایندول ۲-کربوکسیلیک اسید[3]، ایندول ۳- بوتیریک اسید[4]، ترانس چالکون، دی متیل سولفوکسید DMSO، هیدروکسید سدیم NaOH، دی پتاسیم هیدروژن فسفات K2HPO4، پتاسیم دی هیدروژن فسفات KH2PO4، سدیم پتاسیم تارتارات (نمک راشل)، از نمایندگی‌های شرکت مرک آلمان در ایران تهیه شد. دستگاه‌های اسپکترفتومتر UV-Vis مجهز به کنترل‌کننده دما از شرکت شیما دزو ژاپن Shimadzu UV- 1800 spectrophotometer، ترموشیکر Biometra آلمان، ترازوی آنالایتیکال Sartorius آلمان و دستگا ه pH متر Metrohm مورد استفاده قرار گرفتند.

1. DNS
2. Indole-3-Carbinol
3. Indole-2-carboxylic acid
4. Indole-3-butyric acid

۲-۲. ارزیابی فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکوئی فاشینس* (۰/۰۷۰mg/ml) از طریق اندازه‌گیری مقدار قندهای آزاد شده (مالتوز) از نشاسته، با اتصال به معرف DNS، با روش برنفلد سنجیده شد. این معرف با قندهای احیاءکننده‌ای که در نتیجه تجزیه نشاسته تولید شده، ایجاد کمپلکس رنگی ۳ آمینو ۵ نیتروسالیسیلیک اسید نموده که در طول موج ۵۴۰ نانومتر دارای جذب است. با قرار دادن جذب‌های بدست آمده در منحنی استاندارد مالتوز، فعالیت آنزیم براساس تعداد میکرومول مالتوز تولید شده در مدت یک دقیقه بررسی شد (۱۹-۲۱). در این روش به لوله‌های تست بافرفسفات پتاسیم (۲۰ میلی مولار، pH: ۷) و آنزیم اضافه شد، در حالی‌که در لوله بلانک، فقط بافر ریخته شد. سپس به لوله‌ها محلول نشاسته اضافه گردید. پس از گذشت ۳ دقیقه، فعالیت آنزیم به وسیله محلول DNS متوقف شد. سپس لوله‌ها در حمام آب جوش برای مدت ۵ دقیقه حرارت داده شدند. پس از سرد شدن لوله‌ها، جذب آنها در طول موج ذکر شده خوانده شد. فعالیت آنزیم براساس منحنی استاندارد مالتوز به صورت میکرومول بر دقیقه اندازه‌گیری گردید (۲۱-۲۳).

۲-۲-۱. سنجش پایداری دمایی آنزیم در حضور و عدم حضور افزودنی‌ها

برای سنجش پایداری دمایی، آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکوئی فاشینس* با غلظت ۰/۰۷۰mg/ml، در محدوده زمانی ۵ تا۳۰ دقیقه، در دمای غیرفعال‌سازی ۶۵ درجه سانتیگراد، در بافرفسفات پتاسیم ۲۰ میلی مولار با pH: ۷ قرار داده شد. سپس نمونه‌های برداشت شده از لوله‌ها، به داخل یخ منتقل شده و پس از نیم‌ساعت، درصد فعالیت باقیمانده نمونه‌ها با استفاده از روش برنفلد، در مقایسه با نمونه کنترل آنزیمی (که از ابتدای آزمایش داخل یخ بود)، با سه تکرار در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد. درنهایت میانگین و SD و CV برای هریک محاسبه شد. CV زیر ۵ درصد قابل قبول گزارش شد. اثر افزودنی‌های ایندول و مشتقات آن و ترانس چالکون محلول در DMSO ۱٪ بر پایداری دمایی آنزیم در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به روش فوق بررسی شد (۲۴).

۲-۲-۲. آمیداسیون (تاییدی بر اثر افزودنی‌ها بر روی پایداری دمایی) ارزیابی میزان آمونیاک

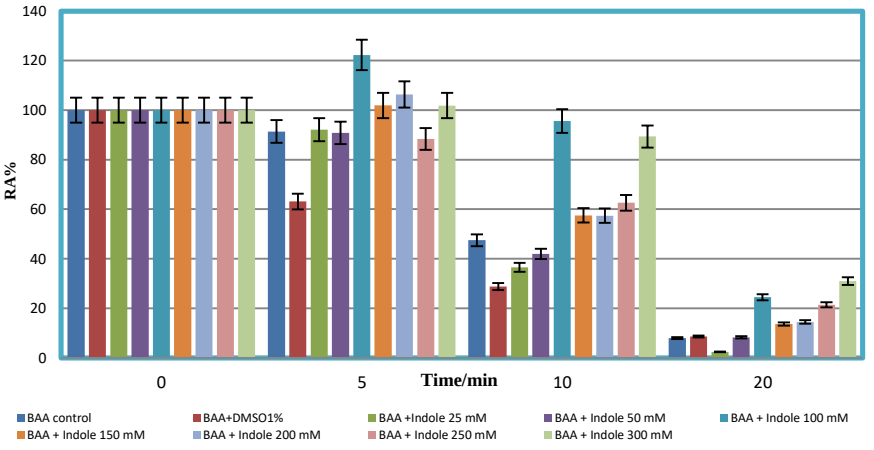
اندازه‌گیری میزان آمونیاک توسط کیت (Ziest Chem Diagnostics، تهران) انجام شد. نمونه آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکوئی فاشینس* (کنترل) و نمونه‌های آنزیم به همراه ایندول و آنزیم به همراه ترانس چالکون پس از آماده‌سازی در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند و پس از خنک شدن، میزان آمونیاک تولید شده در هریک با استفاده از کیت، اندازه‌گیری شد (۲۵).

۲-۳. تجمعات آمورف

جهت تشکیل تجمعات آمورف، آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلو لیکویی فاشینس* با غلظت (mg/ml۰/۴۱) در بافر دی هیدروژن فسفات پتاسیم (۱۰۰ میلی مولار در pH: ۵) تحت تأثیر دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پیگیری تشکیل تجمعات پروتئینی از روش کدورت‌سنجی در دستگاه اسپکتروفتومتر UV-vis مجهز به کنترل‌کننده دما (Shimadzu TCC-240 A) در طول موج ۴۰۰ نانومتر از طریق سینتیک نرم‌افزار (UV probe) بررسی گردید. با استفاده از رنگ‌آمیزی کنگورد در محیط آزمایشگاه و استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تشکیل تجمعات آمورف آنزیم تایید شد. همچنین تجمعات آمورف در حضور ایندول به عنوان یک افزودنی موثر در پایداری بررسی گردید. نتایج هریک از آزمایش‌ها با سه مرتبه تکرار انجام و گزارش شده و نمودار جذب بر علیه زمان رسم گردید (۱۵، ۲۶، ۲۷).

۳. یافته‌ها

به منظور بررسی پایداری دمایی آنزیم BAA در حضور غلظت‌های مختلف افزودنی‌ها، غلظت‌های ۲۵ تا ۲۵۰ میلی مول در حضور و عدم حضور آنزیم (کنترل) بررسی شد. در مواردی که بازه غلظتی محدودتر شده است، دلیل این امر عمدتاً بروز مشکل در انحلال افزودنی بوده است. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که فعالیت باقیمانده آنزیم در حضور ایندول (نمودار ۱) در غلظت‌های ۱۰۰ و بالای ۱۰۰ میلی مول بهتر از غلظت‌های پایین۱۰۰ میلی مول حفظ می‌شود.



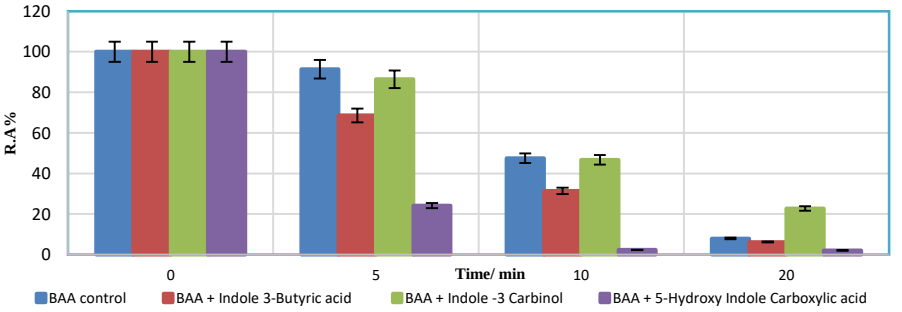
نمودار ۱ - تاثیر غلظت‌های مختلف (۲۵-۳۰۰ میلی مولار) از ایندول بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلو لیکویی فاشینس*

در حضور ۱۰۰ میلی مول ایندول، بعد از ۵ دقیقه، حدود ۱۲۰ درصد و بعد از ۱۰ دقیقه ۹۵ درصد است و این نشان‌دهنده پایداری نسبی آنزیم در حضور ایندول ۱۰۰ میلی مولار بوده و البته بین دوزهایی که مطالعه شده‌اند، در مجموع، ۱۰۰ میلی مول بهتر از سایر غلظت‌ها فعالیت را پایدار نگه داشته است. فعالیت مطلق آنزیم نیز در حضور ایندول حفظ می‌شود (جدول ۱). البته فعالیت مطلق به صورت وابسته به دوز در مجاورت ایندول افزایش مختصری را نشان می‌دهد، ولی با توجه به نتایج آزمون پایداری دمایی، در آزمایش تکمیلی از همان غلظت ۱۰۰ میلی مول استفاده شد.

جدول ۱ – تاثیر غلظت‌های مختلف (۲۵-۳۰۰ میلی مولار) ایندول بر فعالیت مطلق آنزیم BAA

غلظت‌های ایندول	درصد فعالیت
۰	۱۰۰
ایندول ۲۵ میلی مولار	۱۰,۹۸
ایندول ۵۰ میلی مولار	۳۰,۹۳
ایندول ۱۰۰ میلی مولار	۳۳,۹۴
ایندول ۱۵۰ میلی مولار	۲۲,۹۸
ایندول ۲۰۰ میلی مولار	۱۹,۱۱۹
ایندول ۲۵۰ میلی مولار	۱۳۲,۸۴
ایندول ۳۰۰ میلی مولار	۱۱۵,۴۸

با توجه به نتایج بدست آمده برای ایندول، غلظت ۱۰۰ میلی مول سه ترکیب مشتق از ایندول به نام‌های ایندول ۳- بوتیریک اسید، ایندول ۳- کاربینول (I -C3) و ۵- هیدروکسی ایندول کربوکسیلیک اسید (I -C5) مورد بررسی قرار گرفتند (نمودار ۲). نتایج حاکی از آن است که از بین این مشتقات، ایندول C3 کمی بهتر از سایرین، آنزیم را پایدار کرده است، اما در مجموع تاثیر پایدارکننده آنها از ایندول بهتر نبود.



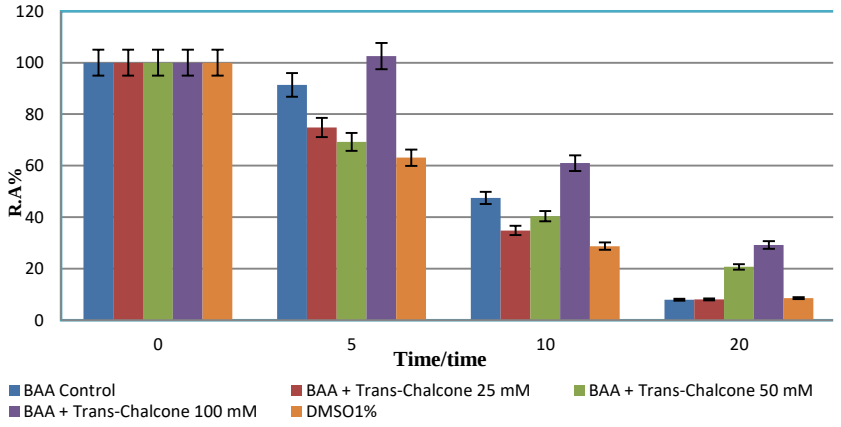
نمودار ۲- تاثیر غلظت ۱۰۰ میلی مولار از مشتقات ایندول برفعالیت BAA

از طرف دیگر، مشاهده شد که ایندول C5 تاثیر مهاری زیادی بر فعالیت مطلق آنزیم دارد و علی‌رغم اینکه آنزیم در مجاورت ایندول C3 و ایندول بوتیریک اسید، فعالیت مطلق بالاتری را نشان می‌دهند، همچنان از جهت تاثیر بر پایداری، ایندول مناسب‌تر عمل می‌کند.

جدول -۲ تاثیر غلظت ۱۰۰ میلی مولار مشتقات ایندول بر فعالیت مطلق آنزیم BAA

غلظت مشتقات ایندول	درصد فعالیت
۰	۱۰۰
ایندول C5 ۱۰۰ میلی مولار	۴۹,۵۸
ایندول C3 ۱۰۰ میلی مولار	۲۹,۹۹
ایندول بوتیریک اسید ۱۰۰ میلی مولار	۶۲,۸۹

پایداری آنزیم BAA در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف ۲۵ تا ۱۰۰ میلی مول ترانس چالکون بررسی شد (نمودار ۳). نتایج حاکی از آن است که ۱۰۰ میلی مول ترانس چالکون پایداری را تا حد زیادی حفظ کرده است. با توجه به لزوم انحلال ترانس چالکون در حلال DMSO، تاثیر حلال به تنهایی هم بررسی شد که مطابق نتایج بدست آمده، تاثیری بر پایدارسازی آنزیم نداشت.



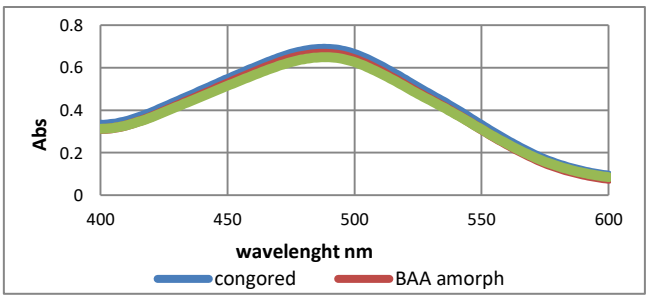
نمودار ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف (۲۵-۱۰۰ میلی مول) از ترانس چالکون بر فعالیتBAA

در خصوص فعالیت مطلق نیز، نتایج حاکی از آن است که غلظت‌های مختلف ترانس چالکون می‌توانند فعالیت مطلق را تا حدودی افزایش دهند (جدول ۳). با این وجود، غلظت ۱۰۰ میلی مولار هم فعالیت مطلق و هم پایداری را در حد بالایی حفظ کرده است.

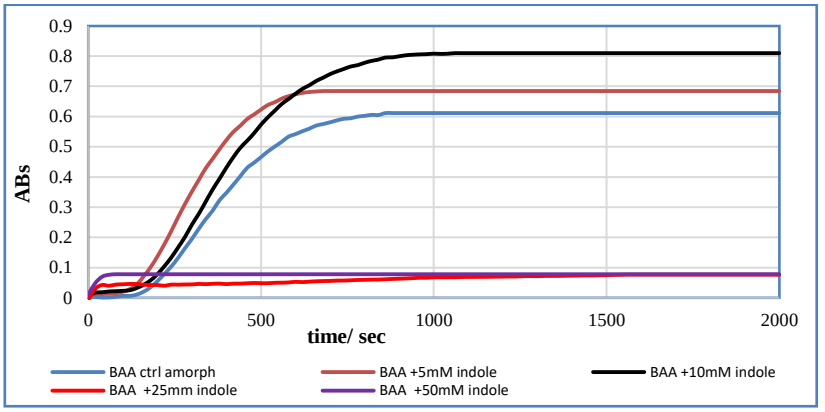
جدول ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف (۲۵-۱۰۰ میلی مول) ترانس چالکون بر فعالیت مطلق آنزیم BAA

غلظت‌های ترانس چالکون	درصد فعالیت
۰	۱۰۰
ترانس چالکون۲۵ میلی مولار	۶۳,۱۱۸
ترانس چالکون۵۰ میلی مولار	۱۴۰
ترانس چالکون۱۰۰ میلی مولار	۸۳,۱۲۶

در مرحله بعد، ترکیباتی که بهترین پایدارکنندگی را بر آنزیم داشتند، از جهت تاثیر بر میزان آمونیاک آزاد شده از آنزیم، در اثر قرار گرفتن در دمای بالا نیز بررسی شدند. میزان آمونیاک تولید شده در حضور ایندول ۱۰۰ میلی مولار (۷۳۹٫۵ microgram/dl) و کمتر از ۱۰۰ میلی مولار ترانس چالکون (۱۷.۲۱۷ microgram/dl) می‌باشد که نشان‌دهنده تاثیر بهتر ایندول نسبت به ترانس چالکون به عنوان پایدارکننده آنزیم BAA می‌باشد. در مرحله بعد، تاثیر ایندول بر مهار تجمعات آمورف BAA بررسی شد. ایجاد تجمع آمورف در BAA در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۳۰ دقیقه رخ داد و جهت تایید ماهیت این تجمع‌ها (عدم ایجاد تجمع آمیلوئید)، از آزمون کنگورد استفاده شد. بررسی تغییر در میزان جذب کنگورد در محلول کنگورد به تنهایی، محلول کنگورد به همراه پروتئین طبیعی و محلول کنگورد حاوی پروتئین آمورف، نشان‌دهنده عدم اختلاف طیف جذبی (هم در شدت جذب و هم عدم شیفت) است (نمودار ۴). این مشاهده موید احتمال بیشتر تشکیل تجمع‌های آمورف و فقدان فیبریل‌های آمیلوئیدی در نمونه حاوی تجمع‌های آمورف می‌باشد. اصولاً کنگورد قابلیت اتصال به ساختارهای بتای آمیلوئیدی را دارد و در صورت اتصال، λ max را افزایش می‌دهد (۲۸). در نهایت غلظت‌های مختلف ایندول در کنار BAA قرار داده شدند و تاثیر آنها بر فرایند تجمع آنزیم بررسی شد. نتایج (نمودار ۴) حاکی از آن است که ایندول در غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی مولار به خوبی کل تجمعات آمورف را کاهش داده و آن را مهار کرده است.

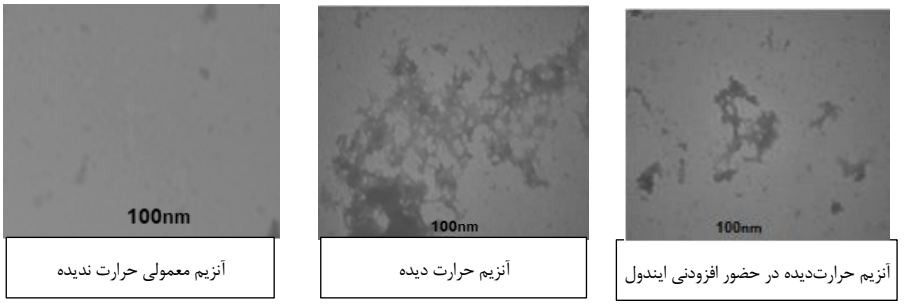


نمودار ٤- بررسی تغییرات جذب نوری کنگورد در تجمع‌های آمورف BAA



نمودار-۵ تاثیر غلظت‌های مختلف (۵-۵۰ میلی مولار) ایندول بر تجمع آمورف BAA

بررسی دقیق‌تر تجمع‌ها می‌تواند با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM ورت گیرد. چنانکه در شکل (۱) مشخص است، در نمونه آنزیم معمولی که در معرض میکروسکوپ TEM قرار داده شد، تجمعی دیده نشد. در نمونه آنزیم حرارت دیده، تجمعات فراوانی از ذرات آمورف مشاهده شد و همچنین هنگامی که افزودنی ایندول در کنار آنزیم حرارت دیده بررسی گردید، کاهش چشمگیر ذرات آمورف کاملاً مشهود بود.



شکل ۱- بررسی تجمع آمورف آنزیم در حضور و عدم حضور افزودنی ایندول با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (بزرگنمایی: ۱۰۰)

٤. نتیجه‌گیری

به کارگیری بیوکاتالیزها در سال‌های اخیر، از نظر تجاری بسیار مورد توجه قرار گرفته و توانسته در صنایع مختلف از قبیل صنایع دارویی، غذایی، نساجی و حتی پزشکی جایگاه ویژه‌ای کسب کند. از این‌رو مطالعات گسترده‌ای در راستای بهبود رفتار آنزیم‌ها، پایداری پروتئین‌ها و حلالیت آنها در شرایط مختلف صورت گرفته است (۲۹). پروتئین‌ها برای پاسخ به تغییرات محیطی، اتصال لیگاند و

تغییرات شیمیایی، به انعطاف‌پذیری متکی هستند و به طور بالقوه، عواملی که انعطاف‌پذیری پروتئین را تغییر دهند، ممکن است در عملکرد آن اختلال ایجاد کنند. برای تعیین جزئیات مولکولی عملکرد پروتئین‌ها، جهش‌های متعددی و مطالعات in vivo وin vitro وin silico انجام شده است. تعدادی از این جهش‌ها با اتصال یک لیگاند خاص با یک اثر همزمان بر روی پایداری داربست پروتئینی، اطلاعات مفیدی در اختیار قرار می‌دهند (۲۹). نتایج مطالعات حاکی از آن است که علاوه‌بر پارامترهای فیزیکی مانند دما و فشار و pH، تنوع ساختاری و ملکولی، پایداری پروتئین‌ها و تجمعات پروتئینی، به شدت تحت تاثیر حضور حلال‌ها قرار می‌گیرند. در طول فیبریلاسیون، آب نقش مهمی در فرآیند هسته‌زایی دارد. بنابراین، تغییر خواص بافر، توسط اسمولیت‌ها مانند قندها، پلی‌آمین‌ها، پلی‌ال‌ها، اسیدهای آمینه و سایر اسمولیت‌ها، یک استراتژی مهم و موثر برای افزایش پایداری و مهار تجمع خواهد بود. در شرایط آزمایشگاهی اسمولیت‌های خاص یا چاپرون‌های شیمیایی مانند کازئین، نقش مهمی در جلوگیری از تجمع در طول تاخوردگی پروتئین ایفا می‌کنند (۱۵-۱۷). فنیل آلانین با تاثیر بر روی آنزیم لیزوزیم، باعث ثبات آن شده و تجمع را کاهش می‌دهد (۱۸). قندها و پلی ال‌ها با تقویت برهمکنش‌های آبگریز بین باقیمانده اسیدآمینه‌های زنجیره پلی‌پپتیدی، به همراه پیوندهای هیدروژنی، یونی و واندروالسی، به حفظ ساختار طبیعی آنزیم‌ها کمک می‌کنند (۳۰).

تحقیقات انجام شده در راستای بررسی تاثیر دو افزودنی ایندول و تریپتوفان بر پایداری آنزیم لیگنین پراکسیداز نشان داد که هر دو ترکیب به پایدار شدن آنزیم کمک می‌کنند. حضور این دو افزودنی در محیط کشت قارچ ترشح‌کننده آنزیم لیگنین پراکسیداز، به آنزیم کمک می‌کند تا بتواند فعالیت کاتالیزوری خود را کامل کند. همچنین حلقه ایندول موجود در تریپتوفان به عنوان عامل احیاءکننده عمل کرده و نقطه از دست دادن الکترون، نیتروژن موجود در ایندول می‌باشد که به نقش حلقه پیرول در ایجاد پایداری اشاره دارد (۳۱). در آزمایش دیگری، اثر افزودنی‌ها بر پایداری دمایی آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس استئاروترموفیلوس*[1] بررسی شد. نتیجه حاکی از این بود که پلی ال‌ها، پلی فنل‌ها مانند ترانس چالکون، دی متیل فرمالدئید و دی متیل سولفوکسید، همگی نیمه‌عمر آنزیم BStA را تا دو برابر افزایش داده و ساختار آنزیم، در برابر دناتوره شدن حرارتی از طریق فعل و انفعالات یونی تثبیت شد (۳۲). همچنین تاثیر افزودنی‌های مختلف مانند الکل‌های پلی هیدریک، قندها، پلی اتیلن گلیکول و سوبستراها، بر آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس لکنیفورمیس*[2]، یک اثر

1. Bacillus stearothermophilus α -amylase (BStA)
2. Bacillus licheniformis α-amylase (BLA)

پایدارکنندگی دمایی را نشان داد. ضمن اینکه پایداری حرارتی آنزیم BLA در حلال‌های آلی مانند اکتان هم پایداری قابل‌توجهی را نشان داد، به طوری که در دمای ۷۵ درجه، آنزیم حداقل ۹۰ دقیقه همچنان فعال بود (۲۴).

تحقیقات مختلفی بر تاثیر ترکیبات شیمیایی ازجمله ترکیبات فنولی، ایندولی و چالکونی تاکید دارند. این ترکیبات به دلیل داشتن حلقه‌های آروماتیکی و ایجاد مداخله در میانکنش‌های هیدروفوبیک، با قرار گرفتن در بین صفحات بتا، منجربه کاهش تجمعات پروتئین‌ها (عمدتاً فرم آمیلوئیدی) و افزایش حلالیت آنها می‌شوند. از این‌رو ترکیبات دارای حلقه‌های آروماتیکی می‌توانند ترکیبات افزودنی ارزشمندی در حفظ پایداری ساختاری و عملکرد بیولوژیک پروتئین‌ها و کاهش سمّیت ناشی از تشکیل تجمعات پروتئینی باشند (۳-۳۶). ایندول، یک ترکیب هتروسیکلیک حاوی نیتروژن است که از دو حلقه پیرول و بنزن با یک بند دوگانه تشکیل شده است که در بسیاری از تحقیقات به عنوان مهارکننده انواعی از آلفا آمیلازها شناسایی شده، تا جایی که در تحقیقات برای بیماران دیابتی جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده است (۳۷-۳۸) و در بسیاری از آلکالوئیدهای طبیعی یافت می‌شود. این ترکیب هتروسیکلیک دارای پتانسیل‌های دارویی و پزشکی مختلفی است. مشتقات ایندول طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی ازجمله فعالیت ضد میکروبی، سیتوتوکسیک، ضد مالاریا، ضد التهابی، ضد سل و ضد سرطان را نشان داده است (۳۹-۴۱). ایندول به نوعی یک فارماکوفور مهم برای انواع بیماری‌ها به حساب می‌آید. همه این تحقیقات باعث شده که در شیمی دارویی و بسیاری زمینه‌های دیگر به عنوان یک ماده حیاتی محسوب شود (۵). در تحقیقی سعادتی اسکندری و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی اثر ایندول بر تجمعات آنزیم لیزوزیم پرداختند. نتایج نشان داد که ایندول نتوانسته آنزیم لیزوزیم را پایدار کند و منجربه افزایش تجمع این پروتئین می‌شود (۱۸).

چالکون‌ها نیز به دلیل ساختار آروماتیک و ساده و سنتز آسان و همچنین مشتقات پلی فنلی که دارند، به منظور پایدارسازی آنزیم‌ها، قابل توجه هستند (۴۲). ترانس چالکون‌ها دارای یک هسته دو فنولی و پیش‌ساز فلاوونوئیدها می‌باشند، که به طور گسترده در گیاهان بیوسنتز می‌شوند. تحقیقات نشان داده که دارای خواص بیولوژیک بسیار وسیعی مانند فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، سیتوتوکسیک، ضد سرطان، ضد میکروبی، ضد تک‌یاخته‌ای‌ها، آنتی هیستامینیک و ضد التهابی می‌باشند (۴۳). آدلوسی و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهشی تاثیر ترانس چالکون بر مسیرهای سیگنالینگ و آنزیم‌ها، به خصوص آلفا آمیلازها را بررسی کردند. نتایج نشان داد که ترانس چالکون، تا حدودی قادر به پایدار

کردن آنزیم و مهار تجمع آن می‌شود (۴۴). همچنین عزیز احمد و همکاران (۲۰۲۲) در پژوهشی اثر افزودنی‌های مختلف را بر تاخوردگی مجدد[1] زنجیره پلی پپتیدی آلفا آمیلازها بررسی کردند. نتایج نشان داد که تغییرخواص بافرآنزیم توسط اسمولیت‌ها مانند قندها، پلی آمین‌ها، پلی ال‌ها، اسید آمینه‌ها، ایندول و ترانس چالکون بر پایداری پروتئین‌ها موثر بوده و از تجمع آنزیم آلفا آمیلاز جلوگیری می‌کند (۱۶).

در پژوهشی نیز اثر ترانس چالکون بر روی آمیلوئیدهای انسولین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از این بود که افزودن ترانس چالکون به انسولین، منجربه کاهش مقادیر فیبریل می‌شود که این یافته توسط تیوفلاوین S و طیف جذبی کنگورد مورد تایید قرار گرفت. کاهش تجمعات پروتئین در برابر افزودنی‌ها، پایداری پروتئین در برابر استرس محیطی مانند حرارت را نشان می‌دهد (۴۵). با توجه به اهمیت آلفا آمیلازها در عرصه‌های مختلف، در مطالعه حاضر اثر ایندول و ترانس چالکون بر پایداری دمایی آنزیم آلفا آمیلاز *باسیلوس آمیلولیکویی فاشینس*[2] و تجمعات آن بررسی شد. نتایج حاکی از آن است که فعالیت باقیمانده آنزیم در حضور ایندول ۱۰۰ میلی مولار بعد از ۵ دقیقه، حدود ۱۲۰ درصد فعالیت مطلق و بعد از ۱۰ دقیقه، ۹۵ درصد فعالیت مطلق حفظ شده و این نشان‌دهنده پایداری نسبی آنزیم در حضور ایندول ۱۰۰ میلی مولار است. همچنین، ترانس چالکون ۱۰۰ میلی مولار از آنجایی که هم فعالیت مطلق را بالا می‌برد و هم فعالیت را تا ۱۰ دقیقه و حتی تا ۲۰ دقیقه به خوبی حفظ کرده، می‌توانند به عنوان افزودنی مناسب برای پایداری آنزیم BAA مورد استفاده قرار گیرند. ایندول، علاوه‌بر پایدار کردن آنزیم، توانسته تجمعات آن را نیز کاهش دهد و ترانس چالکون هم تا حدودی پایدارکننده و مهارکننده تجمع آنزیم BAA می‌باشد.

1. Refolding
2. Bacillus amyloliquefaciens α amylase (BAA)

References

1. Aleem B & et al. Random mutagenesis of super Koji (Aspergillus oryzae): improvement in production and thermal stability of α-amylases for maltose syrup production. *BMC microbiology*. 2018; 18(1): 1-13.
2. Daoud F B-O, Kaddour S & Sadoun T. Adsorption of cellulase Aspergillus niger on a commercial activated carbon: kinetics and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 75(1): 93-99.
3. Yandri Y & et al. The effect of zeolite/chitosan hybrid matrix for thermal-stabilization enhancement on the immobilization of Aspergillus fumigatus α-amylase. *Emerging Science Journal*. 2022; 6(3).
4. Rodríguez V B & et al. Enzymatic Hydrolysis of Soluble Starch with an α-Amylase from Bacillus licheniformis. *Biotechnology progress*. 2006; 22(3): 718-722.
5. Sharma P & et al. Hunt for α-amylase from metagenome and strategies to improve its thermostability: a systematic review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2022; 38(11): 203.
6. Brown I & et al. Kinetic study of the thermal denaturation of a hyperthermostable extracellular α-amylase from Pyrococcus furiosus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013; 1834(12): 2600-2605.
7. Alikhajeh J & et al. Structure of Bacillus amyloliquefaciens α-amylase at high resolution: implications for thermal stability. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 2010; 66(2): 121-129.
8. Khajeh K & et al. Acidic and proteolytic digestion of α-amylases from Bacillus licheniformis and Bacillus amyloliquefaciens: stability and flexibility analysis. *Enzyme and microbial technology*. 2006; 38(3-4): 422-428.
9. Zonouzi R & et al. Role of the salt bridge between Arg176 and Glu126 in the thermal stability of the Bacillus amyloliquefaciens α-amylase (BAA). *J Microbiol Biotechnol*. 2013; 23(1): 7-14.
10. Yuan S & et al. Improving thermostability of Bacillus amyloliquefaciens alpha-amylase by multipoint mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2023; 653: 69-75.
11. Deb P & et al. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from Bacillus amyloliquefaciens P-001.*SpringerPlus*. 2013; 2: 1-12.
12. Dey T B & et al. Improvement of microbial α-amylase stability: strategic approaches. *Process Biochemistry*. 2016; 51(10): 1380-1390.
13. Hormoznejad R & et al. Optimization of the alpha-Amylase production from microbial source: A systematic review of experimental studies. *Trends in Medical Sciences*. 2022; 2(2).
14. Silva C & et al. Practical insights on enzyme stabilization. *Critical reviews in biotechnology*. 2018; 38(3): 335-350.
15. Shojaee H, Sabbaghian M & Ebrahim-Habibi A. Acarbose and the thermal aggregation of

Bacillus amyloliquefaciens alpha-amylase (BAA): protective effect of an inhibitor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2016; 91(5): 1397-1402.

16. Ahmad A & Mishra R. Differential effect of polyol and sugar osmolytes on the refolding of homologous alpha amylases: A comparative study. *Biophysical Chemistry*. 2022; 281: 106733.
17. Shiraki K & et al. Effect of additives on liquid droplets and aggregates of proteins. *Biophysical Reviews*. 2020; 12: 587-592.
18. Saadati-Eskandari N & et al. Phenylalanine and indole effects on the pathogenicity of human lysozyme amorphous aggregates. *Enzyme and Microbial Technology*. 2022; 158: 110036.
19. Torabizadeh H, Tavakoli M & Safari M. Immobilization of thermostable α-amylase from Bacillus licheniformis by cross-linked enzyme aggregates method using calcium and sodium ions as additives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014; 108: 13-20.
20. Abootalebi S N & et al. Screening, characterization and production of thermostable alpha-amylase produced by a novel thermophilic Bacillus megaterium isolated from pediatric intensive care unit. *Journal of Environmental Treatment Techniques*. 2020; 8(3): 952-960.
21. Hammami A & et al. Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated Bacillus mojavensis SA: characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International journal of biological macromolecules*. 2018; 108: 56-68.
22. Missau J & et al. Immobilization of commercial inulinase on alginate–chitosan beads. *Sustainable Chemical Processes*. 2014; 2: 1-6.
23. Mahmood Najafian The Effects of Curcumin on Alpha Amylase in Diabetics Rats. *Zahedan J Res Med Sci*. 2015; 17(12): e5198. https://doi.org/10.17795/zjrms-5198.
24. Asther M & Meunier J-C. Increased thermal stability of Bacillus licheniformis α-amylase in the presence of various additives. *Enzyme and microbial technology*. 1990; 12(11): 902-905.
25. Santos C, Tomasula P & Kurantz M. Deamidation Kinetics of Precipitated by Carbon Dioxide Compared with Commercial Caseinates. *Journal of food science*. 1999; 64(3): 400-404.
26. Haghighi-Poodeh S & et al. Monocyclic phenolic compounds stabilize human insulin and suppress its amorphous aggregation: In vitro and in vivo study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019; 518(2): 362-367.
27. Saadati-Eskandari N & et al. Amino acids as additives against amorphous aggregation: in vitro and in silico study on human lysozyme. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2019; 189: 305-317.
28. Elhaddaoui A & et al. *Mechanism of congo red binding to amyloid proteins with a beta pleated sheet structure*. In: Fifth International Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules; 1993. Springer.
29. Stepankova V & et al. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. *Acs Catalysis*. 2013; 3(12): 2823-2836.
30. Samborska K. Enhancement of thermal stability of Aspergillus oryzae alpha-amylase using stabilizing additives. *Acta Agrophysica*. 2007; 9(1): 233-244.
31. Collins P J & et al. Stabilization of lignin peroxidases in white rot fungi by tryptophan.

Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63(7): 2543-2548.
32. Brumm P J & Teague W M. Effect of additives on the thermostability of Bacillus stearothermophilus α-amylase. *Biotechnology letters.*1989; 11: 541-544.
33. Thapa P & et al. Chalcone and its analogs: Therapeutic and diagnostic applications in Alzheimer's disease. *Bioorganic chemistry*. 2021; 108: 104681.
34. Hornedo-Ortega R & et al. In vitro effects of serotonin, melatonin, and other related indole compounds on amyloid-β kinetics and neuroprotection. *Molecular nutrition & food research*. 2018; 62(3): 1700383.
35. Feng S, Song X-H & Zeng C-M. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by phenolic compounds involves quinoprotein formation. *FEBS letters*. 2012; 586(22): 3951-3955.
36. Morshedi D & et al. Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives−possible mechanism of action. *The FEBS journal*. 2007; 274(24): 6415-6425.
37. Sharma V, Kumar P & Pathak D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2010; 47(3): 491-502.
38. Taha M & et al. Synthesis, α-amylase inhibitory potential and molecular docking study of indole derivatives. *Bioorganic chemistry*. 2018; 80: 36-42.
39. El Khatabi K & et al. Identification of novel indole derivatives as potent α-amylase inhibitors for the treatment of type-II diabetes using in-silico approaches. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2023; 13(1): 17.
40. Kawde A-N & et al. Exploring efficacy of indole-based dual inhibitors for α-glucosidase and α-amylase enzymes: In silico, biochemical and kinetic studies. *International journal of biological macromolecules*. 2020; 154: 217-232.
41. Gani R S & et al. Synthesis of novel indole, 1, 2, 4-triazole derivatives as potential glucosidase inhibitors. *Journal of King Saud University-Science*. 2020; 32(8): p. 3388-3399.
42. Tran T-D & et al. A Review of the In Vitro Inhibition of α-Amylase and α-Glucosidase by Chalcone Derivatives. *Cureus*. 2023; 15(4).
43. Staurengo-Ferrari L & et al. Trans-chalcone attenuates pain and inflammation in experimental acute gout arthritis in mice. *Frontiers in Pharmacology*. 2018; 9: 1123.
44. Adelusi TI, Du L, Chowdhury A, Xiaoke G, Lu Q, Yin X. Signaling pathways and proteins targeted by antidiabetic chalcones. *Life Sci*. 2021; 284: 118982.
45. Omidi-Shahsavandi M & et al. Effect of silibinin and trans-chalcone in an Alzheimer's disease-like model generated by insulin amyloids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2023; 56: e12443.