

اثرات امواج فراصدا بر فعالیت اوره‌آز محلول و تثبیت‌شده بر نانوذرات مغناطیسی و سیلیکا ژل

فاطمه زاهدی سالانقوج^۱، محمدرضا حسین‌دخت^{۲*}، راضیه جلال^۱، علی نخعی‌پور^۳، رضا ایزدی نجف‌آبادی^۳

۱. گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. مرکز پژوهش و فناوری بیومولکول، دانشگاه فردوسی مشهد

۳. گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

در این مطالعه، اثر امواج فراصدا با بسامد پایین بر ساختار و فعالیت آنزیم اوره‌آز بررسی شده است. برای این منظور، آنزیم اوره‌آز در بازه‌های زمانی متفاوت در معرض امواج فراصدا با بسامد ثابت ۲۰ کیلوهرتز قرار گرفت. آنزیم اوره‌آز بر روی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن (Fe_3O_4) و سیلیکا ژل فعال‌شده به ترتیب با بازده اتصال ۸۹ درصد و ۶۶ درصد تثبیت شد. فعالیت آنزیم، پارامترهای جنبشی (سینتیکی)، پی‌اچ و دمای بهینه آنزیم محلول و هم‌چنین تثبیت‌شده در شرایط متفاوت تعیین شدند. تغییر ساختار آنزیم محلول، ناشی از امواج‌دهی براساس طیف‌های فلورسانس و فرابنفش تأیید شد. فعالیت آنزیم در حضور امواج فراصدا تشدید شد. اعمال امواج فراصدا حین فعالیت آنزیمی، باعث افزایش فعالیت آنزیم شد. در اثر اعمال امواج فراصدا بر آنزیم محلول و تثبیت‌شده بر سیلیکا ژل قبل از واکنش آنزیمی، کاهش فعالیت آنزیم و V_{max} و افزایش K_m مشاهده شدند. این در حالی است که امواج فراصدا روی آنزیم تثبیت‌شده بر نانوذرات اکسید آهن (مغناطیسی) تأثیری نداشتند.

کلیدواژه: اوره‌آز، امواج فراصدا، تثبیت آنزیم، نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن، سیلیکا ژل.

۱. مقدمه

بر این، مشخصات امواج فراصدا از قبیل قدرت، بسامد و شدت امواج، خواص محیط واکنش و مدت زمان امواج‌دهی [۸] بر نوع اثر امواج فراصدا بر آنزیم‌ها موثر است. هم‌چنین امواج فراصدا بر ساختار [۹-۱۰]، فرایند تثبیت، مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌ها [۱، ۷، ۱۱]، پی‌اچ^۲ و درجه حرارت بهینه [۱۲-۱۳] و قابلیت استفاده مجدد برخی آنزیم‌ها [۱۴] مؤثر است. آنزیم اوره‌آز^۳ یک متالوآنزیم است که در بسیاری از باکتری‌ها، گیاهان، قارچ و جلبک‌ها و برخی بی‌مهرگان یافت می‌شود [۱۵]. اوره‌آز یک آنزیم مهم در کشاورزی و پزشکی است [۱۶] و اوره را به آمونیاک و دی‌اکسیدکربن تجزیه می‌کند. سنجش غلظت اوره، میزان محتوای کراتینین و آرژنین محلول آبی، اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین جی^۴، یون‌های فلزات سنگین و دیگر آلاینده‌ها و کلیه مصنوعی برخی کاربردهای آنزیم اوره‌آز هستند [۱۷-۱۹].

اخیراً، امواج فراصدا با بسامد پایین توجه روزافزونی را در پردازش‌های زیستی مانند آماده‌سازی نانوامولسیون، استخراج به کمک امواج فراصدا و کاهش لزجت^۱ به خود اختصاص داده است [۱]. به تازگی تغییر در فعالیت آنزیم در اثر امواج فراصدا نیز گزارش شده است. فعالیت کاتالیزوری برخی آنزیم‌ها پس از قرار گرفتن در معرض امواج فراصدا با شدت بالا کاهش یافته و برخی غیرفعال شده‌اند [۲-۴]. با این حال، در برخی موارد، امواج فراصدا باعث افزایش فعالیت آنزیم شده است [۵-۷]. تحمل آنزیم نسبت به امواج فراصدا ممکن است به محل آنزیم در سلول و وزن مولکولی آنزیم وابسته باشد. با این حال، با توجه به نتایج متناقضی که فعال یا غیرفعال شدن آنزیم در اثر امواج فراصدا را گزارش کرده‌اند، دانش ما در مورد اثر واقعی امواج فراصدا بر آنزیم بسیار ناچیز است [۱]. علاوه

² pH

³ Urease (EC3.5.1.5)

⁴ Immunoglobulin G

* نویسنده پاسخگو: housain@um.ac.ir

¹ Viscosity

تجزیه‌ای کافی برخوردار بوده‌اند. معرف نسلر به روش ارائه شده در کتاب آنالیز معدنی عملی ووجل^۴ تهیه شد [۳۰]. نانوذرات اکسید آهن (قطر منافذ ۲۰ نانومتر و سایز نانوذرات ۲۵ نانومتر) در مقاله قبلی گروه سنتز شد [۳۱] و در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. همه محلول‌ها در آب دیونیزه آماده شدند.

۲-۲. تعیین فعالیت آنزیم اوره‌آز

در این مطالعه از روش هدایت‌سنجی به‌عنوان یک روش معتبر و دقیق برای سنجش فعالیت آنزیم اوره‌آز استفاده شده است. آنزیم، اوره را که ترکیبی غیریونی است به ترکیبات یونی آمونیوم و بیکربنات تبدیل می‌کند و هدایت محلول در اثر تولید این یون‌ها افزایش می‌یابد [۳۲]. برای سنجش فعالیت آنزیم ۵۰۰ میکرولیتر آنزیم اوره‌آز (غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) را به ۱۰ میلی لیتر اوره با غلظت ۲۰-۱ میلی مولار اوره افزوده و هدایت الکتریکی محلول در زمان صفر تا ۵ دقیقه در ۷ پی‌اچ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ثبت گردید. تغییرات هدایت الکتریکی محلول در دقیقه معیاری از فعالیت آنزیم است [۳۳]. سنجش فعالیت آنزیم تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات نیز با افزودن ۱۰ میلی لیتر اوره به آنزیم تثبیت‌شده و ثبت تغییرات هدایت الکتریکی به مدت ۵ دقیقه انجام شد. آنزیم تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات با استفاده از آهن‌ربا به راحتی از محلول واکنش جدا می‌گردد.

برای سنجش فعالیت آنزیم تثبیت‌شده بر سطح سیلیکا ژل از روش نسلر استفاده شد. بعد از ۵ دقیقه انکوبه کردن آنزیم تثبیت‌شده با اوره (۱-۲۰ میلی مولار) مقدار آمونیاک آزادشده با سنجش شدت رنگ تولیدشده بعد از افزودن معرف نسلر (در طول موج ۴۰۵ نانومتر) تعیین شد [۳۴]. در هر دو روش یک واحد آنزیم میزانی از آن است که برای تولید یک میکرومول آمونیوم در دقیقه در شرایط آزمایش لازم است [۳۵].

اطلاعات کمی در مورد اثرات امواج فراصدا بر الگوی هیدرولیز اوره از محلول و تثبیت شده در دسترس است. غیرفعال شدن آنزیم اوره‌آز سویا تحت اثر امواج با بسامد پایین و بالا (به ترتیب ۲۷ کیلوهرتز، ۶۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲/۶۴ مگاهرتز، ۳۵-۵۶ درجه سانتی‌گراد) گزارش شده است [۲۰].

تثبیت آنزیم اغلب بهترین راه برای بهینه‌سازی عملکرد عملیاتی یک آنزیم در فرایندهای صنعتی است [۲۱-۲۲]. روش‌های مختلف برای تثبیت آنزیم وجود دارد، که شامل به دام انداختن، جذب و اتصال کووالانسی می‌شود. در این مطالعه، از روش‌های جذب و اتصال کووالانسی استفاده شد. اوره‌آز بر روی مواد مختلفی مانند شیشه با منافذ کنترل‌شده^۱، سیلیکا ژل و پوراور [۲۳]، کپسول چیتوسان/ پلی (وینیل الکل) [۲۴] فسفونات متصل‌شده به نانوذرات اکسید آهن [۲۵]، نانوذرات مغناطیسی پوشیده‌شده با لایه پلی‌سیلوکسان [۲۶]، و غیره تثبیت شده است. نانوذرات مغناطیسی ارزان، غیرسمی و دارای سازگاری زیستی بوده، و به آسانی آماده می‌شوند. به‌سرعت توسط میدان مغناطیسی خارجی جدا می‌شوند و سطح بالایی برای تثبیت دارند. براین اساس، تثبیت آنزیم کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده است [۲۷-۲۹].

هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات امواج فراصدا با شدت کم بر فعالیت کاتالیزوری آنزیم محلول و تثبیت شده می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد

آنزیم جک بین اوره‌آز، اوره، آلبومین سرم گاوی، پودر سیلیکا ژل (با اندازه ذرات ۶۳-۲۰۰ میکرومتر و مش ۷۰-۲۳۰، اندازه منافذ ۱۰۰ آنگسترم و سطح مقطع ۳۰۰ m^۲/g)، ۳-آمینوپروپیل تری اتوکسی سیلان و گلو تار آلدهید (۲۵ درصد حجمی/ حجمی) از شرکت مرک^۲ خریداری شد. سایر مواد شامل: مونوپتاسیم فسفات^۳، آمونیوم کربنات، تولوئن ۹۹ درصد، دی‌اتیل‌اتر، هیدروژن کلرید (۱۲N)، یدید جیوه، یدید پتاسیم و سود از خلوص

¹ Controlled pore glass

² Merck

³ KH₂PO₄

⁴ Vogel

۲-۳. تثبیت آنزیم اوره‌آز

در این پژوهش آنزیم اوره‌آز به دو روش جذب سطحی و اتصال کوالان به‌ترتیب بر سطح نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن و سیلیکاژل تثبیت شد. نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن در پژوهش قبلی گروه [۳۱] سنتز شد و به مدت ۱۶ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار، پی‌اچ، حاوی آنزیم با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت. سپس نانوذرات به‌راحتی توسط آهنربا جدا و دوبار با بافر فسفات شسته شد تا آنزیم‌های متصل‌نشده به بستر جدا گردند.

به‌منظور تثبیت آنزیم بر سطح سیلیکاژل، فعال‌سازی سیلیکاژل [۳۶]، سیلان کردن سطح سیلیکاژل [۳۷-۳۸]، فعال کردن گروه‌های آمین سطح با گلو تار آلدهید^۱ [۳۹-۴۰]، تشکیل اتصال شیف-باز بین گروه کربونیل بستر فعال شده و گروه‌های آمین آزاد آنزیم اوره‌آز (۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انجام شد [۴۱]. مقدار آنزیم تثبیت‌شده بر بستر نانوذرات مغناطیسی و سیلیکا ژل به روش برادفورد [۴۲] تعیین شد و پارامترهای جنبشی (سینتیکی)، دما و پی‌اچ بهینه و قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت‌شده اندازه‌گیری و با حالت محلول مقایسه شد. در زمانی که آنزیم تثبیت‌شده استفاده نمی‌شد در ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات نگهداری گردید.

۲-۴. امواج‌دهی آنزیم

به‌منظور بررسی اثر امواج فراصدا بر آنزیم اوره‌آز، ۵ میلی‌لیتر آنزیم (امواج‌دهی قبل از واکنش آنزیمی) یا محلول آنزیم و سوپسترا (در اعمال امواج طی فعالیت آنزیمی) با استفاده از دستگاه فراصدای تپی (پالسی) مدل ساینترز آی آی دی^۲ تحت اثر امواج فراصدا با بسامد ۲۰ کیلوهرتز (با ۲ ثانیه اعمال موج و ۲ ثانیه بدون آن) به مدت ۳-۲ دقیقه قرار گرفت. انرژی امواج فراصدا دمای محلول را تا حدی بالا می‌برد. برای اجتناب از اثر دما، دمای محلول آنزیم توسط گردش آب سرد^۳ کنترل شد. حداکثر دمای محلول در زمان امواج‌دهی ۳۷ درجه

سانتی‌گراد بود. بعد از امواج‌دهی، به منظور حفظ تغییرات محلول به سرعت در یخ قرار داده شد و مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۵. بررسی اثر امواج فراصدا با شدت کم بر ساختار آنزیم اوره‌آز

به‌منظور بررسی اثر امواج فراصدا بر ساختار آنزیم، آنزیم با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه امواج‌دهی شد. سپس جذب آنزیم بدون امواج و بعد از امواج‌دهی ۱۰ دقیقه و ۲۰ دقیقه در محدوده طول‌موج ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر ثبت شده و طیف فرابنفش آن ترسیم گردید. طیف فلورسانس آنزیم بدون امواج و با ۱۰ دقیقه و ۲۰ دقیقه امواج‌دهی با طول‌موج تهییج ۲۸۰ نانومتر و محدوده نشر ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر ثبت شد. هم‌چنین اثر امواج بر ساختار آنزیم قبل از امواج و بعد از ۱۰ و ۲۰ دقیقه امواج‌دهی به روش ژل الکتروفورز طبیعی نیز بررسی شد [۴۳].

۲-۶. بررسی اثر اعمال امواج فراصدا بر آنزیم محلول و تثبیت آن

در این بخش ابتدا به‌منظور مقایسه دو حالت اثر امواج بر آنزیم «هم‌زمان با واکنش آنزیمی» و «قبل از واکنش»، در حالت اول هم‌زمان با افزودن آنزیم به سوپسترا و شروع واکنش آنزیمی، محلول آنزیم-سوپسترا تحت اثر امواج فراصدا قرار گرفت و در حالت دوم آنزیم قبل از شروع واکنش آنزیمی امواج‌دهی شد. فعالیت آنزیم پس از ۱۰ دقیقه مجاورت با اوره (۲/۵ میلی‌مولار) و در غیاب امواج به‌عنوان شاهد یا فعالیت ۱۰۰ درصد آنزیم در نظر گرفته شد. سپس آنزیم قبل از واکنش آنزیمی به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه تحت اثر امواج قرار گرفت و پارامترهای جنبشی (سینتیکی) آنزیم، پی‌اچ و دمای بهینه آن، میزان ماندگاری آن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و اثر امواج بر این پارامترها سنجیده شد و در پایان آنزیم امواج‌دیده تثبیت گردید و اثر امواج بر فرایند تثبیت و پارامترهای جنبشی (سینتیکی) آنزیم تثبیت شده، پی‌اچ و دمای بهینه آن بررسی شد.

^۱ Glutaraldehyde (C₅H₈O₂)^۲ ScientzII D^۳ Circulator

جدول ۱ پارامترهای جنبشی (سینتیکی) آنزیم محلول در غیاب و حضور امواج.

آنزیم	K_m/V_{max}	$1/V_{max}$ (min/ μ M ammonium)	V_{max} (μ M ammonium/min)	K_m (mM)	K_{cat} (min ⁻¹)	(k_{cat}/K_m) (mM ⁻¹ min ⁻¹)	R^2
آنزیم طبیعی	۰/۰۳۰۶	۰/۰۱۴۱	۷۰/۹۲	۲/۱۷	۱۴۴۱/۱۳	۶۶۴/۰۵	۰/۹۹۷
آنزیم امواج‌دیده به مدت ۱۰ دقیقه	۰/۰۴۷۱	۰/۰۱۹۲	۵۲/۰۸	۲/۴۵	۱۰۵۸/۳۴	۴۳۰/۹۱	۰/۹۸۹
آنزیم امواج‌دیده به مدت ۲۰ دقیقه	۰/۰۷۰۸	۰/۰۲۵۶	۳۹/۰۶	۲/۷۶	۷۹۳/۷۵	۲۸۷/۰۹۵	۰/۹۹۵

۳. بحث و نتایج

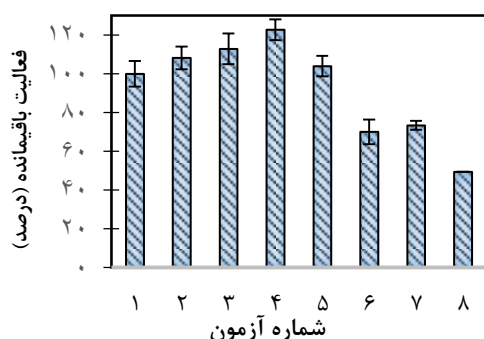
۳-۱. اثر امواج فراصدا بر فعالیت آنزیم اوره‌آز

انرژی ارتعاشی امواج فراصدا با ایجاد حباب‌های کاواک‌زایی باعث تشکیل نیروی برشی و تلاطم شدید در محلول همراه با دما و فشار بالای نقطه‌ای می‌شود. از سویی دیگر تشکیل رادیکال‌های آزاد نیز در محلول به‌عنوان اثر شیمیایی امواج مطرح می‌شود [۵]. به‌منظور دستیابی به بینش بهتری در مورد نوع اثر امواج فراصدا بر آنزیم اوره‌آز در این بخش آنزیم به دو روش (۱) امواج‌دهی آنزیم قبل از واکنش (۲) اعمال امواج فراصدا هم‌زمان با فعالیت آنزیم اوره‌آز انجام شد.

شکل ۱ نشان می‌دهد که اعمال امواج فراصدا هم‌زمان با فعالیت آنزیمی درصد فعالیت را افزایش می‌دهد و همراه با افزایش زمان اعمال امواج تا ۱۰ دقیقه فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد، حباب‌های ایجادشده در اثر کاواک‌زایی انتقال مواد در محلول را آسان‌تر و احتمال برخورد آنزیم و سوبسترا را افزایش می‌دهد [۵]. هم‌چنین می‌توان گفت که حضور سوبسترا سبب مقاومت ساختار آنزیم در برابر امواج‌دهی می‌شود؛ نتایج مشابهی در اعمال امواج فراصدا طی فعالیت آنزیمی بر آنزیم لپاز و آلکالاز گزارش شده است [۴۴-۴۵]. اما اعمال امواج قبل از فعالیت آنزیمی باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. حضور رادیکال‌های آزاد و تغییر ساختار در اثر امواج می‌تواند دلیل احتمالی کاهش فعالیت باشد که در ادامه به آن پرداخته می‌شود.

پارامترهای جنبشی (سینتیکی) آنزیم و اثر اعمال امواج بر آنزیم قبل از واکنش آنزیمی بر پارامترهای جنبشی (سینتیکی) که در جدول ۱ مشخص است، امواج فراصدا باعث کاهش V_{max} و افزایش K_m شده است. هم‌چنین k_{cat} و (k_{cat}/K_m) که بیان‌گر میزان کارایی آنزیم هستند در

حضور امواج کاهش یافته‌اند و این تغییرات با افزایش زمان اعمال امواج چشمگیرتر می‌شود. امواج فراصدا باعث ایجاد دما و فشار بالا و رادیکال‌های آزاد در محل ترکیدن حباب کاواک‌زایی و ایجاد نیروی برشی^۱ در محلول می‌شوند. شرایط ایجادشده ممکن است باعث تغییر ساختار آنزیم در حضور امواج و پنهان شدن جایگاه فعال آنزیم گردد. در نتیجه جایگاه فعال کم‌تر در دسترس سوبسترا قرار دارد و فعالیت آنزیم در حضور امواج نسبت به شرایط مشابه کاهش می‌یابد [۲، ۱۰]. مشابه رفتار آنزیم اوره‌آز در آنزیم گلوکز اکسیداز نیز مشاهده شده است [۴۶].



شکل ۱ اثر اعمال هم‌زمان و قبل از فعالیت آنزیمی امواج فراصدا بر فعالیت آنزیم اوره‌آز (۱: شاهد بدون فراصدا، ۲: ۳ دقیقه فراصدا هم‌زمان با فعالیت آنزیم، ۳: ۵ دقیقه فراصدا هم‌زمان با فعالیت آنزیم، ۴: ۱۰ دقیقه فراصدا هم‌زمان با فعالیت آنزیم، ۵: ۵ دقیقه فراصدا هم‌زمان و ۵ دقیقه فراصدا قبل از فعالیت آنزیم، ۶: ۱۰ دقیقه فراصدا هم‌زمان و ۱۰ دقیقه فراصدا قبل از فعالیت آنزیم، ۷: ۱۰ دقیقه فراصدا قبل از فعالیت آنزیم، ۸: ۲۰ دقیقه فراصدا قبل از فعالیت آنزیم).

در مورد اثر امواج فراصدا بر ماندگاری آنزیم می‌توان گفت که در ابتدا آنزیم اوره‌آز امواج دیده (به مدت ۱۰ دقیقه) فعالیت کم‌تری نسبت به آنزیم شاهد دارد؛ اما سرعت

¹ Shear force

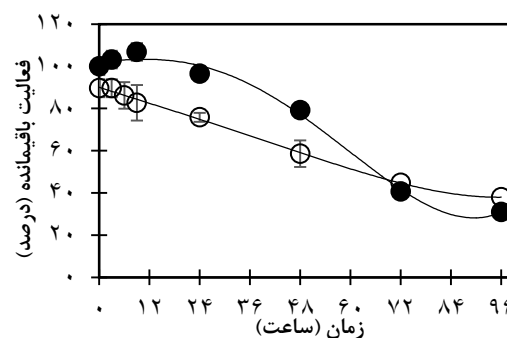
است [۴۸]. هم‌چنین آنزیم اوره‌آز بر بستر سیلیکا ژل فعال‌شده با گروه‌های اپوکسی و آمین به‌ترتیب مقدار ۱۱/۱۵ و ۱۹/۸۷ میلی گرم بر گرم بستر تثبیت شده است [۴۹].

جدول ۲ مشخصات آنزیم تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات و سیلیکا ژل.

فعالیت unit/g (support)	بازدهی اتصال (درصد)	mg/g support	آنزیم
۱۰۸/۶۱	۸۹	۱۰/۰۲	وره‌آز تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات
۱۰۱/۹۳	۹۶	۱۰/۷۸	وره‌آز امواج‌دیده تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات
۲۷۷/۳۳	۶۶/۵۱	۱۴/۹۵	وره‌آز تثبیت‌شده بر سطح سیلیکا ژل
۱۹۰/۴۴	۶۵/۳۲	۱۴/۶۹	وره‌آز امواج‌دیده تثبیت‌شده بر سطح سیلیکا ژل

پارامترهای جنبشی (سینتیکی) آنزیم تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات مغناطیسی و سیلیکا ژل و اثر امواج بر آن‌ها در جدول ۳ آمده است. معمولاً، مقدار K_m در اثر تثبیت آنزیم افزایش می‌یابد، اما در تثبیت بر سطح نانوذرات مغناطیسی کاهش اندکی در میزان K_m نسبت به آنزیم محلول مشاهده شده است. این نتیجه می‌تواند به‌معنی افزایش نسبی تمایل آنزیم و سوبسترا باشد. هم‌چنین به این دلیل که نانوذرات آهن مهارکننده غیررقابتی آنزیم اوره‌آز هستند [۵۰] و تثبیت آنزیم باعث محدودیت دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم می‌شود V_{max} نسبت به حالت آزاد کاهش نشان می‌دهد [۵۱]. تثبیت آنزیم بر دانه‌های آلژینات، فیلم پارافین [۵۲] و بستر چیتوسان-آلژینات و پلی (اکریل‌امید-اکریلیک‌اسید) نیز نتایج مشابهی نشان داده و باعث کاهش K_m و V_{max} آنزیم شده است [۵۳].

کاهش فعالیت طی زمان در آنزیم امواج‌دیده کم‌تر است. به‌طوری‌که حدود ۷۲ ساعت بعد از تهیه آنزیم و نگهداری آن در ۲۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت هر دو آنزیم برابر است و پس از آن فعالیت آنزیم امواج‌دیده از آنزیم شاهد بدون امواج‌دهی بالاتر است (شکل ۲).



شکل ۲ میزان ماندگاری آنزیم محلول در دمای ۲۵°C و اثر امواج فراصدا بر آن (دایره توپر: شاهد بدون امواج؛ دایره توخالی: آنزیم امواج‌دیده).

۲-۳. تثبیت آنزیم و اثر امواج فراصدا

نتایج تثبیت آنزیم بر نانوذرات اکسید آهن و سیلیکاژل و اثر امواج بر مشخصات آنزیم تثبیت‌شده در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان می‌دهد، امواج فراصدا بر میزان تثبیت آنزیم بر سطح سیلیکا ژل و نانوذرات مغناطیسی تاثیر ناچیزی داشته است. فعالیت آنزیم تثبیت‌شده بر نانوذرات در حضور امواج تقریباً ثابت بوده اما فعالیت آنزیم امواج‌دیده پس از تثبیت بر سیلیکا ژل کم‌تر از آنزیم بدون فراصدا است و فرایند تثبیت نتوانسته اثر امواج را بپوشاند. پوگوریلی^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۶ آنزیم اوره‌آز را به روش سل-ژل^۲ در سیلیکا ژل تثبیت کرده و به‌ازای ۴۰/۱ mg/g آنزیم اضافه شده میزان ۸/۱ میلی گرم بر گرم بستر یعنی معادل ۲۰ درصد آن تثبیت شده است [۴۷]. در مطالعه‌ای دیگر سیلیکا ژل فعال شده با توسیل کلرید^۳ با پیوند کوالانسی به آنزیم اوره‌آز متصل شده است و از ۳/۲ میلی گرم آنزیم که به ۱ گرم بستر اضافه شده است، مقدار ۱/۶ میلی گرم آن به سیلیکا ژل متصل شده است و آنزیم بعد از اتصال ۵۰ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ کرده

¹ R. P. Pogorilyi

² Sol-gel

³ Tosyl chloride

جدول ۳ پارامترهای جنبشی (سینتیکی) آنزیم تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات و سیلیکا ژل.

آنزیم	K_m/V_{max}	$1/V_{max}$ (min/ μ M ammonium)	V_{max} (μ M ammonium/min)	K_m (mM)	R^2
اوره‌آز تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات	۰/۰۴۷۷	۰/۰۲۸۴	۳۵/۲۱۱	۱/۶۸	۰/۹۹۲
اوره‌آز تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات در حضور امواج	۰/۰۵	۰/۰۲۸۵	۳۵/۰۹	۱/۷۵	۰/۹۸۹
اوره‌آز تثبیت‌شده بر سطح سیلیکا ژل	۰/۱۲۸۶	۰/۰۲۱۲	۴۷/۱۷	۶/۰۶۶	۰/۹۹۲۴
اوره‌آز تثبیت‌شده بر سطح سیلیکا ژل در حضور امواج	۰/۱۶۴۳	۰/۰۲۵۹	۳۸/۶۱	۶/۳۴	۰/۹۹۷

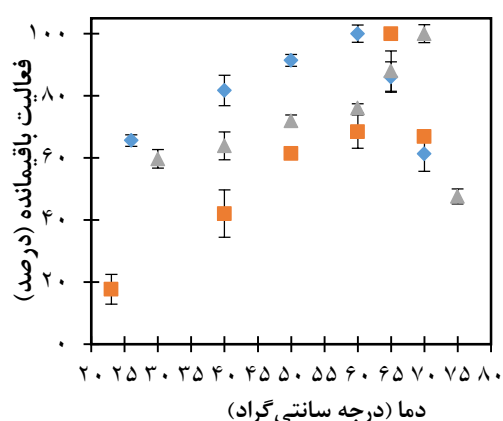
از مزایای تثبیت آنزیم قابلیت استفاده مجدد از آن است که هزینه‌ها را به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد. برای سنجش این مشخصه از آنزیم تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات مغناطیسی ده بار استفاده شد و فعالیت باقی‌مانده اندازه‌گیری گردید. آنزیم تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات پس از هفت بار استفاده ۹۷ درصد فعالیت خود را حفظ می‌کند؛ اما از تکرار بعدی کاهش فعالیت نشان می‌دهد، به‌طوری‌که در بار دهم، ۵۵ درصد فعالیت باقی می‌ماند (شکل ۳). آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده بر نانوذرات آهن اصلاح شده با فسفونومتیل ایمینودی‌استیک اسید بعد از شش بار استفاده ۶۷/۳ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ کرده است [۵۴]. آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده بر روی ذرات کلئیدی و کاتیونی پلی (۴- و نیل پیریدین) پس از ده بار استفاده ۱۰۰ درصد فعالیت خود را حفظ کرده است [۵۵].



شکل ۳ قابلیت استفاده مجدد آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات.

تثبیت آنزیم بر سیلیکا ژل سبب کاهش V_{max} و افزایش K_m آنزیم نسبت به حالت آزاد شده است. دلیل

این مشاهده کاهش سرعت در اثر محدودیت انتشار است. افزایش K_m بعد از تثبیت می‌تواند به دلیل تغییر دسترسی سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم در اثر محدودیت انتشار و یا تغییر ساختاری آنزیم بعد از تثبیت باشد [۵۴]. تثبیت آنزیم اوره‌آز بر دانه‌های شیشه‌ای آریل آمین [۵۶] دانه‌های ژلاتین فعال‌شده با گلوآلدهید [۲۴] و قرص‌های آگار [۵۷] نتایج مشابهی نشان داده است. تثبیت آنزیم سلولاز در حضور امواج فراصدا بر روی میکروساختارهای چیتوسان باعث اتصال سست‌تر آنزیم فراصدا دیده به بستر و افزایش سطح آنزیم و واکنش بهتر با سوبسترا و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم می‌شود [۱]. اثر امواج فراصدا بر تثبیت آنزیم دکستراناز بر بستر کلسیم آلزینات نیز نشان داد که میزان آنزیم تثبیت‌شده در حضور موج با قدرت ۴۰ وات و بسامد ۲۵ کیلوهرتز برای مدت زمان ۱۵ دقیقه به میزان ۱۸/۷۷ درصد نسبت به عدم حضور موج افزایش یافته است. افزایش K_{cat} ، K_m و V_{max} نسبت به آنزیم تثبیت‌شده بدون حضور موج نیز از نتایج دیگری است که در تحقیق فوق ارائه شده است [۷]. همان‌طور که در جدول ۳ آمده است امواج فراصدا بر V_{max} و K_m آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده بر نانوذرات اثری نداشته است و این روند با افزایش زمان اعمال امواج نیز به چشم می‌خورد (نتایج ۲۰ دقیقه امواج‌دهی در جدول نیامده). اثر کاهشی که امواج بر فعالیت آنزیم محلول داشتند در حالت تثبیت‌شده بر نانوذرات دیده نمی‌شود. به‌نظر می‌رسد، تثبیت آنزیم بر سطح نانوذرات اثر امواج فراصدا بر فعالیت آنزیم را خنثی کرده است. اما امواج باعث کاهش V_{max} و افزایش K_m اوره‌آز تثبیت‌شده بر سطح سیلیکا ژل شده است. به‌نظر می‌رسد امواج اعمال‌شده بر آنزیم قبل از تثبیت باعث



شکل ۵ اثر دما بر فعالیت آنزیم اوره‌آز محلول و تثبیت‌شده بر نانوذرات و سیلیکا ژل (در شکل دایره: آنزیم محلول؛ مثلث: آنزیم تثبیت‌شده بر سیلیکا ژل؛ مربع: آنزیم تثبیت‌شده بر نانوذرات را نشان می‌دهد).

۳-۵. اثر امواج فراصدا بر ساختار آنزیم

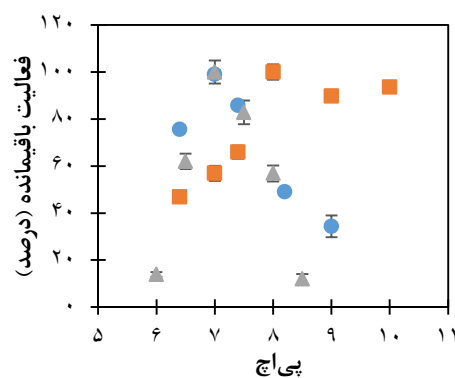
امواج فراصدا می‌تواند باعث تجمع آنزیم‌ها، غیرطبیعی شدن نسبی آنزیم و یا واکنش‌های جانبی‌ای گردد که اسیدآمینه‌های دارای جذب فرابنفش را درگیر کند و در نتیجه در طیف فرابنفش آنزیم تغییراتی را سبب شود. پیوند پپتیدی در زنجیر اصلی پروتئین دارای یک پیک در ۲۳۰-۱۸۰ نانومتر است و اسیدآمینه‌های آروماتیک نور را در این محدوده و در محدوده ۲۴۰-۳۰۰ نانومتر جذب می‌کنند [۶۰]. همان‌طور که در شکل ۶-الف مشخص است، در تمام طول‌موج‌های محدوده ۳۰۰-۲۰۰ نانومتر افزایش جذب در اثر امواج فراصدا مشاهده می‌گردد و این افزایش جذب با افزایش زمان اعمال امواج از ۱۰ به ۲۰ دقیقه افزایش می‌یابد. اما در هر دو مورد امواج دیده جابه‌جایی نسبت به نمونه شاهد بدون فراصدا دیده نمی‌شود که نشان از تغییرات جزئی در ساختار آنزیم است.

همان‌طور که در شکل ۶-ب آمده است، در این مطالعه امواج فراصدا باعث کاهش نشر فلورسانس آنزیم در محدوده ۳۰۰ تا ۴۵۰ نانومتر شده است و با افزایش زمان اعمال امواج از ۱۰ به ۲۰ دقیقه این کاهش ادامه دارد. به‌علاوه، امواج هیچ جابه‌جایی آبی یا قرمزی در طیف فلورسانس آنزیم ایجاد نکرده‌اند. فلورسانس ذاتی پروتئین به‌دلیل حضور اسیدآمینه‌های آروماتیک تیروزین، فنیل

کاهش فعالیت آن شده و تثبیت بر سیلیکا ژل نیز اثر چندانی بر این کاهش فعالیت نداشته است.

۳-۴. اثر دما و پی‌اچ بر فعالیت آنزیم محلول و تثبیت‌شده و اثر امواج بر دما و پی‌اچ بهینه آنزیم

پی‌اچ بهینه آنزیم تثبیت‌شده بر سطح نانوذرات اکسید آهن، از ۷ درصد حالت محلول به سمت پی‌اچ قلیایی تغییر و دمای بهینه از ۶۰ درجه سانتی‌گراد در حالت محلول به ۶۵ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. پی‌اچ بهینه آنزیم پس از تثبیت بر سیلیکا ژل تغییری نشان نداده و دمای بهینه آن ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد.



شکل ۴ اثر پی‌اچ بر فعالیت آنزیم اوره‌آز محلول و تثبیت‌شده بر نانوذرات مغناطیسی و سیلیکاژل (در شکل دایره: آنزیم محلول؛ مثلث: آنزیم تثبیت‌شده بر سیلیکا ژل؛ مربع: آنزیم تثبیت‌شده بر نانوذرات را نشان می‌دهد).

الویزا و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که امواج فراصدا باعث تغییر پی‌اچ بهینه آنزیم آمیلوگلوکوزیداز از ۳/۸ به ۴/۷ می‌شود [۵۸]. اما پی‌اچ بهینه آنزیم فسفولیپاز A در حضور امواج فراصدا تغییری نشان نمی‌دهد. پی‌اچ بر وضعیت یونیزاسیون آنزیم موثر است و در نتیجه با تغییر جایگاه فعال آنزیم، فعالیت آنزیم و تمایل واکنش آنزیم و سوبسترا تغییر می‌یابد [۵۹]. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پی‌اچ بهینه آنزیم در حضور و غیاب امواج برابر ۷ است. لذا به نظر می‌رسد امواج فراصدا تاثیری بر وضعیت یونیزاسیون جایگاه فعال آنزیم اوره‌آز نداشته است.

آزاد هیدروکسیل تولیدشده در اثر امواج فراصدا می‌توانند زنجیر جانبی اسیدآمینه‌های تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین و هیستیدین را اکسید نموده و باعث تغییر ساختار اولیه پروتئین شوند. برخی از محصولات این اکسیداسیون شامل: آسپاراتات، حاصل از اکسیداسیون هیستیدین و O- تیروزین و m- تیروزین، حاصل از هیدروکسیله شدن فنیل آلانین است. علاوه بر این، امواج می‌توانند باعث آسیب برهم‌کنش‌های هیدروفوب پروتئین و باز شدن ساختار آن و به سطح آمدن برخی گروه‌ها از داخل پروتئین به سطح آن شوند که نتیجه مجموع این اتفاقات کاهش نشر در طیف فلورسانس آنزیم است [۶۳-۶۴].

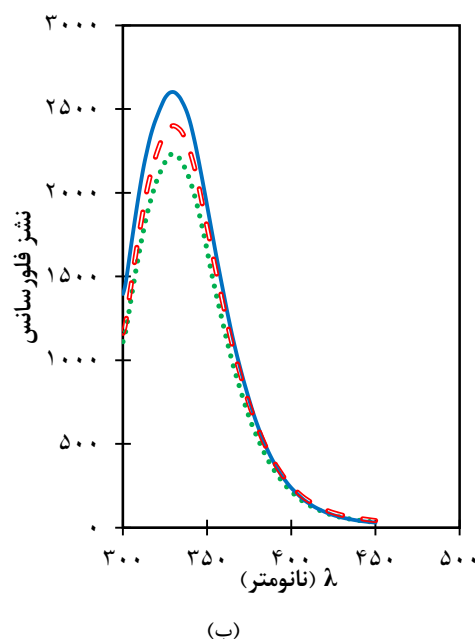
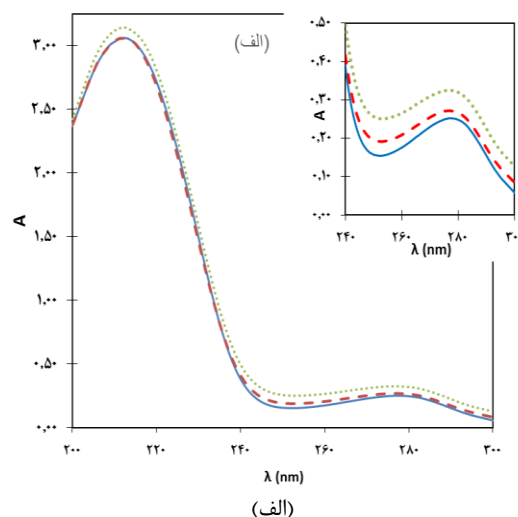
برای تشخیص وجود قطعات، تجمعات یا تغییرات بار الکتریکی سطح آنزیم اوره‌آز در اثر امواج از ژل الکتروفورز طبیعی استفاده شد. حرکت الکتروفورتیکی آنزیم بعد از امواج‌دهی مشابه حرکت آنزیم شاهد بود و اثری از تکه‌تکه شدن یا تجمع آنزیمی پس از امواج‌دهی مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). نتایج نشان می‌دهد کاهش فعالیت آنزیم در اثر امواج در نتیجه تجمع یا تکه‌تکه شدن آنزیم یا تغییرات بار الکتریکی سطح آن نیست [۴۳].

۴. نتیجه‌گیری

اثر امواج فراصدا بر ساختار و فعالیت آنزیم اوره‌آز بررسی شد. ساختار کلی آنزیم در اثر اعمال امواج تغییر نمی‌کند، اما تغییرات جزئی در طیف فلورسانس و جذب آن قابل مشاهده است. در اثر اعمال امواج قبل از واکنش آنزیمی فعالیت آنزیم محلول و V_{max} آن کاهش و K_m افزایش نشان داد و این اثر با افزایش زمان امواج‌دهی افزایش یافت. با وجود کاهش فعالیت در اثر امواج، سرعت افت فعالیت طی زمان در آنزیم امواج‌دیده کم‌تر است. همچنین اعمال امواج حین فعالیت آنزیمی، فعالیت آنزیم را افزایش داد.

تثبیت آنزیم اوره‌آز، بهترین راه برای حذف و یا بررسی میزان اوره در محلول است. در مرحله‌ی بعدی این پژوهش، آنزیم اوره‌آز بر نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن با روش جذب سطحی و با بازده اتصال ۸۹ درصد تثبیت شد. مقادیر V_{max} و K_m آنزیم بعد از تثبیت بر نانوذرات

آلانین و به خصوص تریپتوفان در ساختار آن است [۶۱]. تغییر در طیف فلورسانس اسیدآمینه تریپتوفان می‌تواند به دلیل اکسیداسیون آن و یا تغییر در یونیزاسیون گروه‌های اطراف یا تغییرات کنفورماسیونی باشد [۶۲].



شکل ۶ الف) طیف UV ب) طیف فلورسانس آنزیم اوره‌آز بدون فراصدا و با اعمال ۱۰ و ۲۰ دقیقه فراصدا (در شکل خط: آنزیم طبیعی و امواج‌دیده، خط چین‌ها: آنزیم امواج‌دیده به مدت ۱۰ دقیقه و نقطه‌چین‌ها: آنزیم ۲۰ دقیقه امواج‌دیده را نشان می‌دهند).

نشر آنزیم‌های سلولاز [۶۱]، دکستراناز [۶۳] و فوماراز [۶۴] در حضور و غیاب امواج ثبت‌شده و کاهش نشر فلورسانس در اثر امواج گزارش شده است. رادیکال‌های

- Technology, vol. 39, no. 6, pp. 1177-1182, 2006.
- [5] M. Galesio, J. Lourenço, D. Madeira, M. Diniz, J.L. Capelo, "Unravelling the role of ultrasonic energy in the enhancement of enzymatic kinetics," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 74, no. 1, pp. 9-15, 2012.
- [6] S.H. Lee, H.M. Nguyen, Y.-M. Koo, S. Ho Ha, "Ultrasound-enhanced lipase activity in the synthesis of sugar ester using ionic liquids," *Process Biochemistry*, vol. 43, no. 9, pp. 1009-1012, 2008.
- [7] M. Bashari, P. Wang, A. Eibaid, Y. Yian, X. Xu, Z. Jin, "Ultrasound-assisted dextranase entrapment onto Ca-alginate gel beads," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 20, no. 4, pp. 1008-1016, 2013.
- [8] H. Ma, L. Huang, J. Jia J. Jia, R. He, L. Luo, W. Zhu, "Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18, no. 1, pp. 419-424, 2011.
- [9] S.M. Hoseini, M.R. Housaindokht, M. Izadyar, R. Izadi-Najafabadi, "Effect of ultrasound on the stability of alpha-lactalbumin," *Journal of Acoustical Engineering Society of Iran*, vol. 5, no. 1, pp. 56-63, 2017.
- [10] L. Hao, R. Wang, K. Fang, J. Liu, "Ultrasonic effect on the desizing efficiency of α -amylase on starch-sized cotton fabrics," *Carbohydrate Polymers*, vol. 96, no. 2, pp. 474-480, 2013.
- [11] J. Wang, Y. Cao, B. Sun, C. Wang, Y. Mo, "Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18, no. 2, pp. 534-540, 2011.
- [12] X. Jiang, M. Chang, X. Wang, Q. Jin, X. Wang, "The effect of ultrasound on enzymatic degumming process of rapeseed oil by the use of phospholipase A1," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 21, no. 1, pp. 142-148, 2014.
- [13] E.X. Leaes, D. Lima, L. Miklasevicius, A.P. Ramon, V.D. Pra, M.M. Bassaco, L.M. Terra, M.A. Mautti, "Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 21-25, 2013.
- [14] A.B. Martins, M.F. Schein, J.L.R. Friedrich, R. Fernandez-Lafuente, M.A.Z. Ayub, R.C. Rorigues, "Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym 435: Enhanced activity and operational stability,"

مغناطیسی کاهش یافتند. پی‌اچ بهینه آنزیم تثبیت شده هشت بوده و یک واحد به سمت پی‌اچ قلیایی تغییر یافت و در پی‌اچ‌های بالاتر نیز مقاومت بیش‌تری نسبت به آنزیم محلول نشان داد. دمای بهینه آنزیم تثبیت شده با ۵ درجه افزایش از ۶۰ درجه سانتی‌گراد در حالت محلول به ۶۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و پس از هفت بار استفاده ۹۷ درصد فعالیت آنزیم حفظ شد.

هم‌چنین آنزیم بر بستر سیلیکا ژل آمینه شده، به روش کوالانسی با بازدهی اتصال ۶۶ درصد تثبیت شد. تثبیت آنزیم بر سیلیکا ژل باعث کاهش V_{max} و افزایش K_m آن می‌شود. پی‌اچ بهینه آنزیم پس از تثبیت بر سیلیکا ژل تغییری نشان نداد؛ اما دمای بهینه آن ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت.

امواج فراصدا بر فعالیت و شرایط بهینه آنزیم تثبیت شده بر نانوذرات تأثیری نداشتند، اما تأثیر امواج در آنزیم تثبیت شده بر سطح سیلیکا ژل مشابه حالت محلول بوده و V_{max} کاهش و K_m افزایش یافت. امواج بر پی‌اچ و دمای بهینه آنزیم در هیچ‌یک از حالت‌های محلول و تثبیت شده تأثیری نداشتند.

۵. قدردانی و تشکر

این تحقیق مربوط به طرح پژوهشی با کد ۳/۲۸۸۹۴ مربوط به معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی بوده که بدین وسیله از آن حوزه تقدیر می‌گردد.

۶. فهرست منابع

- [1] 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.
- [2] H. Siami, M.R. Housaindokht, A. Nakhaeipour, "The effect of ultrasound on the enzymatic hydrolysis of starch with alpha-amylase enzyme," *Journal of Acoustical Engineering Society of Iran*, vol. 3, no. 2, pp. 37-43, 2016.
- [3] E.V. Rokhina, P. Lens, J. Virkutyte, "Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art," *Trends in Biotechnology*, vol. 27, no. 5, pp. 298-306, 2009.
- [4] P. Mañas, B. Muñoz, D. Sanz, S. Condón, "Inactivation of lysozyme by ultrasonic waves under pressure at different temperatures," *Enzyme and Microbial*

- Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 59, no. 1, pp. 22-40, 2009.
- [25] B. Sahoo, S.K. Sahu, P. Pramanik, "A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 69, no. 3, pp. 95-102, 2011.
- [26] R.P. Pogorilyi, I.V. Melnyk, Y.L. Zub, G.A. Seisenbaeva, V.G. Kessler, "Immobilization of urease on magnetic nanoparticles coated by polysiloxane layers bearing thiol- or thiol- and alkyl-functions," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, no. 18, pp. 2694-2702, 2014.
- [27] J. Wang, G. Meng, K. Tao, M. Feng, X. Zhao, Z. Li, H. Xu, D. Xia, J.R. Lu, "Immobilization of lipases on alkyl silane modified magnetic nanoparticles: Effect of alkyl chain length on enzyme activity," *PLOS ONE*, vol. 7, no. 8, pp. e43478, 2012.
- [28] M. Faraji, Y. Yamini, M. Rezaee, "Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications," *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 7, no. 1, pp. 1-37, 2010.
- [29] E. Azhir, R. Etefagh, N. Shahtahmasebi, M. Mashreghi, P. Pordeli, "Preparation, characterization and antibacterial activity of manganese oxide nanoparticles," *physical Chemistry Research*, vol. 3, no. 3, pp. 197-204, 2015.
- [30] J.G.H. Jeffery, J. Mendham, R.C. Denney, "Vogel's - Textbook of Quantitative Chemical Analysis," John Wiley and Sons Inc, 605 Third Avenue, 1989.
- [31] A. Nakhaeipour, M.R. Housaindokht, H. Monhemi, "Effect of solvent surface tension on the radius of hematite nanoparticles," *Colloid Journal*, vol. 76, no. 6, pp. 782-787, 2014.
- [32] A. Zoheir, F. Talkhan, I. Hammad, "Urease activity and induction of calcium carbonate precipitation by *sporosarcina pasteurii* NCIMB 8841," *Journal of Applied Sciences Research*, vol. 9, no. 3, pp. 1525-1533, 2013.
- [33] D. Oancea, A. Raducan, B. Mihaela, "Conductometric investigation of enzymatic urea hydrolysis in a self-buffering system," *Analele Universităţii din Bucureşti-Chimie*, vol. 14, no. I-II, pp. 309-314, 2005.
- [34] K. Gabrovska, T. Godjevargova, "Optimum immobilization of urease on modified acrylonitrile copolymer membranes: Inactivation by heavy metal ions," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 60, no. 1, pp. 69-75, 2009.
- [15] Z.-P. Xiao, Z.-Y. Peng, J.-J. Dong, R.-C. Deng, X.-D. Wang, H. Ouyang, P. Yang, J. He, Y.-F. Wang, M. Zhu, X.-C. Peng, W.-X. Peng, H.-L. Zhu, "Synthesis, molecular docking and kinetic properties of β -hydroxy- β -phenylpropionyl-hydroxamic acids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 68, pp. 212-221, 2013.
- [16] Y.M. Cui, Y. Li, Y.J. Cai, W.Chen, H.L. Zhu, "Synthesis, molecular docking, and activity of Schiff-base copper(II) complex with N-n-butylsalicylaldiminate as *Helicobacter pylori* urease inhibitor," *Journal of Coordination Chemistry*, vol. 64, no. 4, pp. 610-616, 2011.
- [17] M. Singh, N. Verma, A.K. Garg, N. Redhu, "Urea biosensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 134, no. 1, pp. 345-351, 2008.
- [18] Y. Qin, J.M.S. Cabral, "Review properties and applications of urease," *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 20, no. 1, pp. 1-14, 2002.
- [19] G.A. Zhylyak, S.V. Dzyadevich, Y.I. Korpan, A.P. Soldatkin, A.V. El'skaya, "Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 24, no. 1, pp. 145-148, 1995.
- [20] E.I. Tarun, I.E. Adzerikho, D.I. Metelitsa, "Inactivation of urease under the action of ultrasonically induced cavitation," *Russian Journal of Physical Chemistry*, vol. 77, no. 3, pp. 468-476, 2003.
- [21] R.A. Sheldon, "Enzyme immobilization: the quest for optimum performance," *Advanced Synthesis & Catalysis*, vol. 349, no. 8-9, pp. 1289-1307, 2007.
- [22] N. Rasouli, N. Sohrabi, E. Zamani, "Influence of a novel magnetic recoverable support on kinetic, stability and activity of beta-amylase enzyme," *physical Chemistry Research*, vol. 4, no. 2, pp. 271-283, 2016.
- [23] W. Limbut, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, P. Asawatreratanakul, C.Limsakul, B. Wongkittisuksa, "Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver® for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, no. 8, pp. 813-821, 2004.
- [24] B. Krajewska, "Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review," *Journal of Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 20, no. 5, pp. 1155-1160, 2013.

- of pharmaceuticals, vol. 205, no. 1, pp. 23-34, 2000.
- [44] J. Jia, H. Ma, W. Zhao, J. Jia, H. Ma, W. Zhao, Z. Wang, W. Tian, L. Luo, R. He, "The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein," *Food Chemistry*, vol. 119, no. 1, pp. 336-342, 2010.
- [45] F. Wang, H. Zhang, J. Wang, G. Chen, X. Fang, Z. Wang, L. Wang, "Ultrasound irradiation promoted enzymatic transesterification of (R/S)-1-chloro-3-(1-naphthylthioxy)-2-propanol," *Molecules* (Basel, Switzerland), vol. 17, no. 9, 2012.
- [46] A. Guiseppi-Elie, S.-H. Choi, K.E. Geckeler, "Ultrasonic processing of enzymes: Effect on enzymatic activity of glucose oxidase," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 58, no. 1-4, pp. 118-123, 2009.
- [47] R.P. Pogorilyi, E.Y. Siletskaya, V.P. Goncharik, L.I. Kozhara, Y.L. Zub, "Immobilization of urease on the silica gel surface by sol-gel method," *Russian Journal of Applied Chemistry*, vol. 80, no. 2, pp. 330-334, 2007.
- [48] S.C, "Studies on immobilization of urease and Co immobilization of cholesterol Esterase cholesterol oxidase and Peroxidase and their clinical Applications," *Faculty of Science and Humanities, Anna University*, 2014.
- [49] A. Wójcik, J. Öobarzewski, T. BlaszczyłSka, "Immobilization of enzymes to porous-bead polymers and silica gels activated by graft polymerization of 2,3-epoxypropyl methacrylate," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 48, no. 3, pp. 287-301, 1990.
- [50] S. Sadeghi- kaji, B. Shareghi, M. Salavati, "Urease Activity Protection With EDTA Against Nanoparticles (Fe₂O₃ and Fe₃O₄) Inactivation," *Journal of NanoStructures*, vol. 4, no. 2, pp. 217-226, 2014.
- [51] S.Y. Shaw, Y.-J. Chen, J.J. Ou, J.-J. Ou, L. Ho, "Preparation and characterization of Pseudomonas putida esterase immobilized on magnetic nanoparticles," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, no. 5, pp. 1089-1095, 2006.
- [52] K. Pithawala, N. Mishra, A. Bahadur, "Immobilization of urease in alginate, paraffin and lac," *Journal of the Serbian Chemical Society*, vol. 75, no. 2, pp. 175-183, 2010.
- [53] F. Kara, G. Demirel, H. Tümtürk, "Immobilization of urease by using chitosan-alginate and poly(acrylamide-co-
- [35] M. Monier, A.M.A. El-Sokkary, "Modification and characterization of cellulosic cotton fibers for efficient immobilization of urease," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 51, no. 1, pp. 18-24, 2012.
- [36] X. Chen, Q. Li, S. Yu, B. Lin, K. Wu, "Activated silica gel based carbon paste electrodes exhibit signal enhancement for quercetin," *Electrochimica Acta*, vol. 81, pp. 106-111, 2012.
- [37] S. Seyhan, Y. Turgut, M. Merdivan, H. Hosgoren, "Chiral separation of amino acids using a chiral crown ether by impregnation on a polymeric support and monoamine modified silica gel," *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 17, no. 11, pp. 1700-1704, 2006.
- [38] A. Goswami, A.K. Singh, "Silica gel functionalized with resacetophenone: synthesis of a new chelating matrix and its application as metal ion collector for their flame atomic absorption spectrometric determination," *Analytica Chimica Acta*, vol. 454, no. 2, pp. 229-240, 2002.
- [39] L.D. Lee JH, J.S. Lim, B.H. Um, C. Park, S.W. Kang, S.W. Kim, "Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized rhizopus oryzae and candida rugosa lipases," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 18, no. 12, pp. 1927-1931, 2008.
- [40] J.H. Lee, S.B. Kim, H.Y. Yoo, et al., "Co-immobilization of Candida rugosa and Rhizopus oryzae lipases and biodiesel production," *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 30, no. 6, pp. 1335-1338, 2013.
- [41] W. Limbut, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, P. Asawatreratanakul, C. Limsakul, B. Wongkittisuksa, "Comparative study of controlled pore glass, silica gel and Poraver for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, no. 8, pp. 813-821, 2004.
- [42] M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1, pp. 248-254, 1976.
- [43] R. Krishnamurthy, J.A. Lumpkin, R. Sridhar, "Inactivation of lysozyme by sonication under conditions relevant to microencapsulation," *International Journal*

- techniques,” *Journal of Solution Chemistry*, vol. 40, no. 3, pp. 458-469, 2011.
- [63] M. Basharia, A. Eibaid, J. Wang, Y. Tian, X. Xu, Z. Jin, “Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase,” *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 20, no. 1, pp. 155-161, 2013.
- [64] M. Barteri, M. Diociaiuti, A. Pala, S. Rotella, “Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production,” *Biophysical Chemistry*, vol. 111, no. 1, pp. 35-42, 2004.
- acrylic acid)/κ-carrageenan supports,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 29, no. 3, pp. 207-211, 2006.
- [54] P.P.S.K.S. Banalata Sahoo, “A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 69, no. 3-4, pp. 95-102, 2011.
- [55] J. Zhou, J. Cao, W. Huang, L. Huang, Y. Wang, S. Zhang, Y. Yuan, D. Hua, “Preparation and Property of Urease Immobilization with Cationic Poly (4-vinylpyridine) Functionalized Colloidal Particles,” *Chem. Biochem. Eng. Q.*, vol. 27, no. 4, pp. 431-437, 2013.
- [56] K. Mangaldas, Y. Rajput, R. Sharma, “Urease immobilization on arylamine glass beads and its characterization,” *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 73-77, 2010.
- [57] S. Mulagalapalli, S. Kumar, R. Kalathur, A.M. Kayastha, “Immobilization of urease from pigeonpea (*cajanus cajan*) on agar tablets and its application in urea assay,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 142, no. 3, pp. 291-297, 2007.
- [58] E.X. Leaes, D. Lima, L. Miklasevicius, A. P. Ramon, V.D. Prá, M.M. Bassaco, L. Terra, M. Mazutti, “Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α-amylase and amyloglucosidase,” *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 21-25, 2013.
- [59] X. Jiang, M. Chang, X. Wang, Q. Jin, X. Wang, “The effect of ultrasound on enzymatic degumming process of rapeseed oil by the use of phospholipase A1,” *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 21, no. 1, pp. 142-148, 2014.
- [60] C. Zhou, H. Ma, Q. Dinga, L. Lin, X. Yu, L. Luo, C. Dai, A.E.-G. Yaghoub, “Ultrasonic pretreatment of corn gluten meal proteins and neutrals: Effect on protein conformation and preparation of ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory peptides,” *Food and Bioprocess Processing*, vol. 91 no. 4, pp. 665-671, 2013.
- [61] B. Subhedar, R. Gogate, “Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations,” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* vol. 101, pp. 108-114, 2014.
- [62] Y.-Q. Wang, G.-C. Zhang, H.-M. Zhang, “Study on the interaction of pentachlorophenol with urease in aqueous solution by multiple spectroscopic