

## Protection effect of boric acid and $\beta$ -mercaptho ethanol against $H_2O_2$ inactivation of Urease

## اثر حفاظتی بوریک اسید و بتا مرکاپتو اتانول بر روی مهار شدن آنزیم اوره‌آز در برابر پراکسید هیدروژن

Sakineh Sadeghi kaji<sup>1</sup>, Behzad shareghi<sup>2\*</sup>

1. M. Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

(Received: Sep. 23, 2014 - Accepted: Feb. 18, 2017)

سکینه صادقی کاجی<sup>۱</sup>، بهزاد شارق<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۳۰)

### ABSTRACT

Urease (urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5) catalyzes the hydrolysis of urea to produce ammonia and  $CO_2$ . Kinetics studies have been performed using UV-vis spectrophotometer at  $40^\circ C$  and pHs 5.5, 7.2, 8. Result showed that urease inhibition by hydrogen peroxide is a kinetics pH-dependent, such that inhibition is maximal on the condition of pH value 8 while the inhibitory effect hydrogen peroxide at pH 5.5 was minimum. The kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  enzyme obtained from Lineweaver-Burk plot in absence of hydrogen peroxide was  $4.52mM$  and  $1.03mM.min^{-1}$  respectively. In presence of  $H_2O_2$ , increasing pH leads to decrease  $V_{max}$  and  $k_m$ . The results showed that in pH 8, boric acid and  $\beta$ -mercaptho ethanol protected urease against hydrogen peroxide. Protectable of  $\beta$ -mercaptho ethanol is more than of boric acid. Such, the results demonstrates that 30 mM boric acid and  $\beta$ -mercaptho ethanol afforded to protect 80% and 90% of urease activity from the loss as compared to the respective control samples.

**Keywords:** Hydrogen Peroxide, Kinetic parameters, Thiol groups, Urease, Urease inhibitors.

### چکیده

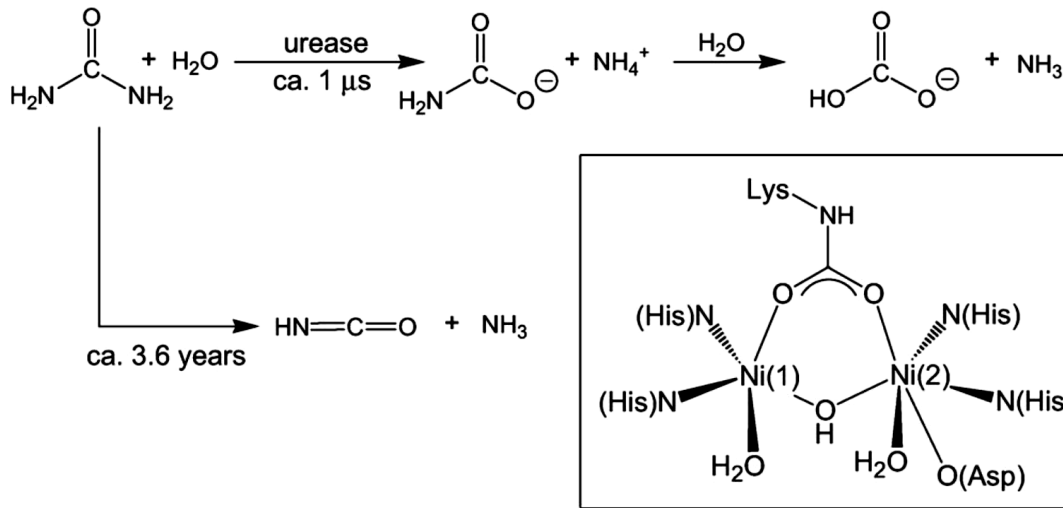
آنزیم اوره‌آز جزء خانواده آمیدو هیدرولازها (EC: 3. 5. 1. 5) می‌باشد که توسط گیاه لوبیای جک تولید می‌شود و این ارگانسیم را قادر می‌سازد که اوره را هیدرولیز و ایجاد آمونیاک و دی اکسید کربن نماید. مطالعات سینتیکی این آنزیم با استفاده از تکنیک اسپکتروفوتومتری در ناحیه ماوراء بنفش در دمای  $40^\circ C$  و در سه pH 5/5، 7/2 و 8 انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده سینتیک مهارتی وابسته به pH اوره‌آز توسط پراکسید هیدروژن می‌باشد. بیشترین اثر مهارتی در pH بازی (pH=8) اتفاق افتاد و اثر مهارتی پراکسید هیدروژن در pH اسیدی (pH=5/5) حداقل می‌باشد. در نتیجه پارامترهای سینتیکی  $K_m$  و  $V_{max}$  آنزیم اوره‌آز که توسط معادله لینویر-برگ در غیاب پراکسید هیدروژن محاسبه شده است، به ترتیب معادل  $4/52$  میلی‌مولار و  $1/03$  میلی‌مولار بر دقیقه می‌باشند. در حضور پراکسید هیدروژن و با افزایش pH مقدار  $K_m$  و  $V_{max}$  به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابند. همچنین نتایج نشان دادند که بوریک اسید و بتا مرکاپتو اتانول اثر حفاظتی در برابر مهار شدن آنزیم در pH=8 انجام می‌دهند. اثر حفاظتی بتا مرکاپتو اتانول در برابر پراکسید هیدروژن برای آنزیم اوره‌آز نسبت به بوریک اسید بیشتر می‌باشد، به طوری که بتا مرکاپتو اتانول و بوریک اسید در غلظت مشابه (30 میلی‌مولار) به ترتیب 90 و 80 درصد حفاظت در برابر پراکسید هیدروژن برای آنزیم اوره‌آز ایجاد نمودند.

**واژه‌های کلیدی:** اوره‌آز، پراکسید هیدروژن، پارامترهای سینتیکی، گروه‌های تیول، مهارکننده‌های اوره‌آز.

## مقدمه

فعال آنزیم در سایبونیته  $\alpha$  قرار دارد و شامل دو یون نیکل با فاصله اتمی  $5/3 \text{ \AA}$  می‌باشد (Karplus *et al.*, 1997). یون‌های نیکل به وسیله یک لیزین کربامیله شده و یک یون هیدروکسید بهم وصل شده‌اند. یون Ni (I) با اتم نیتروژن رزیدیوی هیستیدین و یک مولکول آب احاطه شده است. یون Ni (II) از طریق دو رزیدیوی هیستیدین (از طریق یون نیتروژن)، یک آسپارتیک اسید (از طریق یون اکسیژن) و دو مولکول آب احاطه شده است (شکل ۱) (Stefano *et al.*, 1997). مولکول‌های اوره برای واکنش به جایگاه فعال متصل و جایگزین مولکول‌های آب می‌شوند. رزیدیوهای آمینواسیدی در اتصال سوبسترا (عمدتاً از طریق پیوندهای هیدروژنی)، تثبیت حالت گذر و تسریع واکنش شرکت می‌کنند. علاوه بر این رزیدیوهای آمینواسیدی، رزیدیوهای سیستئین به فراوانی در لبه متحرک جایگاه فعال آنزیم وجود دارند. این رزیدیوها در تعیین موقعیت رزیدیوهای کلیدی جایگاه فعال نقش دارند (Martin & Hausinger, 1992).

آنزیم اوره‌آز (EC:3.5.1.5) از نظر عملکردی جزء خانواده آمیدو هیدرولازها و فسفو تری استراز می‌باشد (Sina *et al.*, 2002). این آنزیم هیدرولیز اوره به کربن دی اکسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کند. به صورت اختصاصی‌تر می‌توان گفت که اوره‌آز هیدرولیز اوره به آمونیاک و کربامات را کاتالیز می‌کند، سپس کربامات به‌طور خود به خود تجزیه و ایجاد آمونیاک و کربن دی‌اکسید می‌نماید (شکل ۱) (Miroslawa *et al.*, 2009). اوره‌آز یک متالوآنزیم (حاوی نیکل) با وزن مولکولی بالا است (Barbara *et al.*, 2012). وزن مولکولی اوره‌آز ۴۸۰ یا ۵۴۵ کیلوالتون می‌باشد. هر مولکول اوره‌آز دارای ۸۴۰ آمینواسید می‌باشد که ۹۰ تای آنها سیستئین می‌باشند (Barbara, 2010). pH ایتیمم اوره‌آز ۷/۲ می‌باشد. دمای ایتیمم برای اوره‌آز ۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. اوره‌آز لوبیایی جک دارای سایبونیته‌های یکسانی است (هر کدام ۹۰ کیلوالتون) که به‌عنوان تریمر تجمع می‌یابند. جایگاه



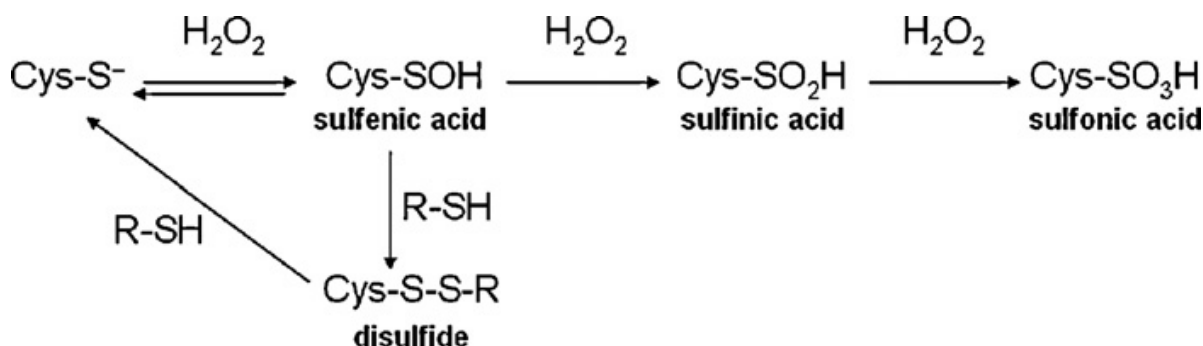
شکل ۱. واکنش کاتالیز شده بوسیله اوره‌آز و تصویری از جایگاه فعال آنزیم (Barbara & Stefano, 2005).

SH منجر به ایجاد سولفینیک اسید (Cys-SOH) می‌شود که معمولاً بی‌ثبات است و با هر گروه تیول در دسترس برای تشکیل پیوند دی سولفیدی (-S-S-) واکنش می‌دهد. تحت پیشرفت اکسیداسیون، سولفینیک

واکنش پراکسید هیدروژن با پروتئین‌ها واکنش پراکسید هیدروژن با پروتئین‌ها شامل اکسیداسیون گروه‌های تیول رزیدیوهای سیستئینیل می‌باشد. کمترین حالت اکسیداسیون Cys-SH

غیرقابل برگشتند در حالی که سولفونیک اسید و پیوند دی سولفیدی براحتی واکنش برگشتی را طی می کنند و به Cys-SH تبدیل می شوند (Barbara, 2010).

اسید (Cys-SO<sub>2</sub>H) یا سولفونیک اسید (Cys-SO<sub>3</sub>H) ایجاد می شود (شکل ۲). از چهار مرحله اکسیداسیون گفته شده، اکسیداسیون سولفونیک اسید و سولفونیک اسید



شکل ۲. میانکنش پراکسید هیدروژن با گروه های تیول پروتئین

فعالیت آنزیم به وسیله اندازه گیری غلظت آمونیاک آزاد شده به استفاده از روش ایندوفنول - بلو ( Ga et al., 2009; Sonila et al., 2010; Winterbourne et al., 1967) تعیین گردید.

۲. بررسی سینتیک مهاری آنزیم اوره آز در حضور پراکسید هیدروژن در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و pH های گوناگون: برای این منظور غلظت های مختلف (۴-۳۰ میلی مولار) از پراکسید هیدروژن را به محلول اوره آز با غلظت ۰/۰۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر اضافه گردید و سینتیک آنزیم در pH های ۵/۵، ۷/۲ و ۸ بررسی گردید. محلول آنزیمی به مدت ۳۰ دقیقه با پراکسید هیدروژن اینکوبه گردید و بعد از ۴۰ دقیقه برای از بین بردن اثر مداخله گرانه پراکسید هیدروژن بر روی روش ایندوفنول - بلو از محلول کاتالاز استفاده گردید (Barbara, 2010) و در نهایت جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر محاسبه گردید.

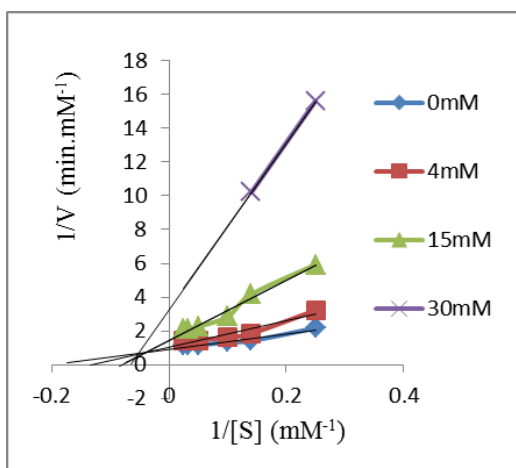
۳. بررسی اثر حفاظتی بوریک اسید و بتا مرکاپتو اتانول بر اوره آز در برابر پراکسید هیدروژن در pH ۸ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد: برای بررسی اثر حفاظتی بوریک اسید و بتا مرکاپتو اتانول بر روی فعالیت اوره آز ابتدا آنزیم با غلظت های مختلف بوریک اسید و بتا مرکاپتو اتانول (۴-۳۰ میلی مولار) به مدت ۱۵ دقیقه اینکوبه

## مواد و روش ها

اوره آز (jack bean)، اوره، بتا مرکاپتو اتانول، بوریک اسید و کاتالاز (سیگما)، پراکسید هیدروژن (۳۰٪ p.a.)، ۲۰ میلی مولار بافر فسفات با pH های ۵/۵، ۷/۲ و ۸ به وسیله تنظیم pH بافر با محلول سدیم هیدروکسید آماده شده است. به هر مخلوط آنزیمی ۱ میلی مولار EDTA اضافه شده است. اینکوبه کردن آنزیمی در دمای اتاق و در شرایط حفاظت شده از نور خورشید انجام شده است. اندازه گیری طیفی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر فارماسیا مدل ۴۰۰۰ صورت گرفت.

## روش ها

۱. بررسی سینتیک آنزیم اوره آز در عدم حضور پراکسید هیدروژن در pH ۷/۲ و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد: برای تعیین فعالیت آنزیم در شرایط استاندارد، غلظت های مختلف اوره (۳۰-۴ میلی مولار) را با ۲۰ میلی مولار بافر فسفات و ۱ میلی مولار EDTA مخلوط گردید. واکنش زمانی آغاز می شود که حدود ۰/۰۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم به مخلوط سنجش اضافه گردد. واکنش در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انجام می شود. بعد از ۵ دقیقه



**نمودار ۳.** اثر غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن بر آنزیم اوره‌آز در pH=۸، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد

پارامترهای سینتیکی  $V_{max}$  و  $K_m$  با استفاده از نمودارهای لاینویور-برگ محاسبه گردیدند که مقادیر این پارامترها در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ آورده شده است.

**جدول ۱.** تغییرات  $V_{max}$  (فعالیت آنزیم) و  $K_m$  (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره‌آز در حضور پراکسید هیدروژن در pH=۵/۵، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.

$V_{max}$ ( $mM \cdot min^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	غلظت پراکسید هیدروژن (میلی مولار)
۱/۰۳	۴/۵۲	۰
۱/۰۳	۴/۶۰	۴
۱/۰۲	۵/۸۶	۱۵
۱/۰۰۷	۶/۶۵	۳۰

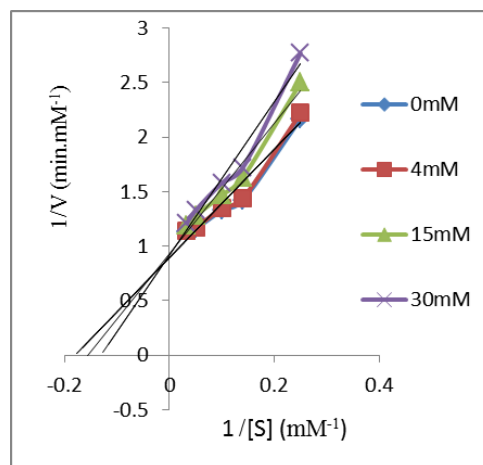
**جدول ۲.** تغییرات  $V_{max}$  (فعالیت آنزیم) و  $K_m$  (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره‌آز در حضور پراکسید هیدروژن در pH=۷/۲، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.

$V_{max}$ ( $mM \cdot min^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	غلظت پراکسید هیدروژن (میلی مولار)
۱/۰۳	۴/۵۲	۰
۰/۹۸۶	۵/۱۳	۴
۰/۶۲۵	۶/۵۴	۱۵
۰/۳۳۳	۹/۵۱	۳۰

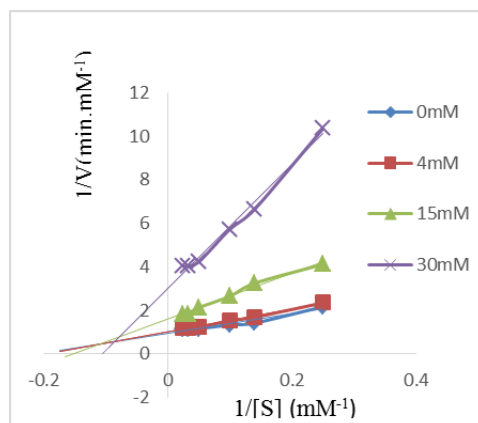
گردید و سپس مخلوط سنجش با ۳۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن به مدت ۴۰ دقیقه اینکوبه گردید و فعالیت آنزیم با استفاده از متد ایندوفنول - بلو اندازه‌گیری و با نمونه کنترل مقایسه گردید.

### نتایج و بحث

در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در سه pH ۵/۵، ۷/۲ و ۸ بر سینتیک آنزیم اوره‌آز بررسی شده است. نتایج این آزمایش در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ آورده شده است.

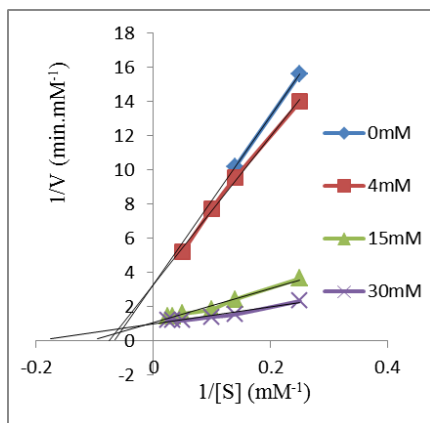


**نمودار ۱.** اثر غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن بر آنزیم اوره‌آز در pH=۵/۵، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد

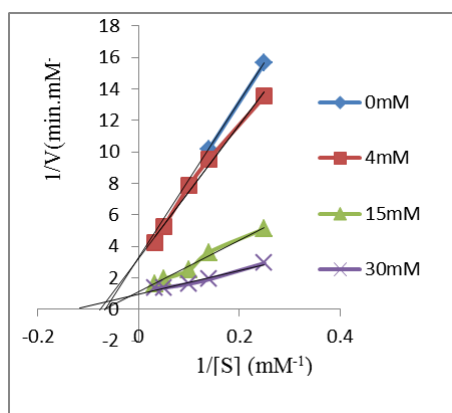


**نمودار ۲.** اثر غلظت‌های مختلف پراکسید هیدروژن بر آنزیم اوره‌آز در pH=۷/۲، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد

غیر پروتئینه شدن گروه‌های تیول می‌گردد که این ساختار تقریباً ناپایدار است، این مسئله نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که گروه‌های تیول به‌صورت آبیون نسبت به گروه‌های تیول پروتینه شده تمایل بیشتری به اکسید شدن با پراکسید هیدروژن دارند که این خود گزارشی از قدرت نوکلئوفیلی تیولیت در مقابل تیول می‌باشد (Barbara, 2010; Barbara *et al.*, 2005). در قسمت دوم مطالعه اثر حفاظتی بتامرکاپتواتانول و بوریک اسید بر روی فعالیت آنزیم اوره‌آز در برابر پراکسید هیدروژن بررسی شد که نتایج به ترتیب در نمودارهای ۴ و ۵ آورده شده است.



**نمودار ۴.** اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف بتامرکاپتواتانول بر مهار شدن آنزیم اوره‌آز در برابر پراکسید هیدروژن (۳۰ میلی مولار) در pH=۸، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد



**نمودار ۵.** اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف بوریک اسید بر مهار شدن آنزیم اوره‌آز در برابر پراکسید هیدروژن (۳۰ میلی مولار) در pH=۸، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد

**جدول ۳.** تغییرات  $V_{max}$  (فعالیت آنزیم) و  $K_m$  (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره‌آز در حضور پراکسید هیدروژن در pH=۸، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.

$V_{max}$ ( $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\text{mM}$ )	غلظت پراکسید هیدروژن (میلی مولار)
۱/۰۳	۴/۵۲	۰
۰/۹۵۵	۷/۴۹	۴
۰/۶۸۷	۱۲/۲۳	۱۵
۰/۳۰۵	۱۴/۴۵	۳۰

همانطور که در این نمودارها و جدول‌های دیده می‌شود، با افزایش pH (از ۵/۵ تا ۸) و افزایش غلظت پراکسید هیدروژن از ۴ تا ۳۰ میلی‌مولار،  $V_{max}$  کاهش می‌یابد و  $K_m$  افزایش می‌یابد. آنزیم اوره‌آز دارای ۹۰ رزیدو سیستئینیل است. بنابراین پراکسید هیدروژن به‌راحتی می‌تواند روی گروه‌های تیول اوره‌آز تأثیر بگذارد و موجب اکسیداسیون این گروه‌های تیول شود. اکسیداسیون رزیدوهای لبه جایگاه فعال اوره‌آز برای از بین بردن فعالیت آنزیم کفایت می‌کند زیرا این گروه‌های تیول در تعیین موقعیت رزیدوهای کاتالیز نقش مهمی دارند ایفای نقش می‌کنند (Barbara, 2010; Wiesława *et al.*, 2001). بنابراین، زمانی که فعالیت سینتیکی اوره‌آز در حضور پراکسید هیدروژن بررسی شد، نتایج نشان دادند که مهار شدن اوره‌آز به‌وسیله پراکسید هیدروژن یک سینتیک وابسته به pH است به‌طوری‌که با افزایش pH قدرت مهارکنندگی پراکسید هیدروژن بیشتر می‌شود. می‌توان چنین گفت که به دلیل این که  $pK_a$  گروه تیول حدود ۸/۵ می‌باشد (Barbara & Stefano, 2005). بنابراین در pH=۸ تقریباً نیمی از گروه‌های تیول به‌صورت دیپروتونه هستند بنابراین وقتی توسط پراکسید هیدروژن اکسید می‌شوند، سولفینیک اسید ( $\text{Cys-SO}_2\text{H}$ ) یا سولفونیک اسید ( $\text{Cys-SO}_3\text{H}$ ) را ایجاد می‌کنند که همانطور که در بالا گفته شد این ترکیبات تقریباً پایدارند، در صورتی که در pH=۵/۵ بیشتر گروه‌های تیول به‌صورت پروتئینه شده می‌باشند و بنابراین اکسید شدن آنها توسط پراکسید هیدروژن سبب

می‌باشد به طوری که بتامرکاپتو اتانول در غلظت ۳۰ میلی مولار تا حدود ۹۰ درصد سبب حفاظت اوره‌آز در برابر مهار شدن شده در صورتی که بوریک اسید در همین غلظت (۳۰ میلی مولار) تا حدود ۸۰ درصد سبب حفاظت اوره‌آز در برابر مهار شدن به وسیله پراکسید هیدروژن شده است. در این مورد می‌توان چنین گفت که بتا مرکاپتو اتانول با گروه‌های تیول اوره‌آز پیوند کوالان برقرار می‌کند و مانع دسترسی پراکسید هیدروژن به گروه تیول آنزیم می‌شود. بتامرکاپتواتانول همچنین می‌تواند در مخلوط اینکوبه به‌عنوان اشغال‌کننده پراکسید هیدروژن عمل کند. در این زمینه داده‌ها پیشنهاد می‌کنند که تحت شرایط آزمایش (pH=۸) پراکسید هیدروژن با میل بیشتری نسبت به بتامرکاپتواتانول با اوره‌آز واکنش می‌دهد. بوریک اسید جایگاه فعال آنزیم را اشغال می‌کند و دسترسی پراکسید هیدروژن به گروه‌های عملکردی جایگاه فعال اوره‌آز را محدود می‌کند (Barbara., 2010; Nana, 2012; Om et al., 2003). بوریک اسید به تنهایی جایگزین مولکول‌های آب متغییر جایگاه فعال آنزیم می‌شود و به‌عنوان یک آنالوگ برای سوبسترا عمل می‌کند (Barbara, 2010; Barbara & Stefano, 2005). تحقیقاتی که به منظور بررسی اثر بوریک اسید بر روی فعالیت اوره‌آز انجام گرفته، ثابت کردند که به هر واحد فعال آنزیم فقط یک مولکول بوریک اسید متصل می‌شود (Stefano et al., 1999). تحقیقات فلوریمتری انجام‌شده بر روی اوره‌آز نشان دادند که بوریک اسید منجر به تغییراتی در اسیدهای آمینه تریپتوفان و تیروزین می‌شود که این تغییرات سبب تغییر در ساختار اوره‌آز و در نتیجه کاهش فعالیت اوره‌آز می‌گردد (Stefano et al., 1999). اخیراً تیتراسیون اوره‌آز با ۵ و ۵- دی تیوبیس- (۲- نیترو بنزوات)، حضور دو نوع از گروه‌های سولفات آزاد در اوره‌آز را نشان داد که یک گروه سولفات به آسانی در دسترس است اما گروه دیگر سولفات‌ها فقط بعد از این که پروتئین دناتوره شد قابل تیتراسیون

پارامترهای سینتیکی  $V_{max}$  و  $K_m$  با استفاده از نمودارهای لینیویر-برگ محاسبه گردیدند که مقادیر این پارامترها در جدول‌های ۴ و ۵ آورده شده است.

**جدول ۴.** تغییرات  $V_{max}$  (فعالیت آنزیم) و  $K_m$  (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره‌آز در حضور پراکسید هیدروژن (۳۰ میلی مولار) و غلظت‌های مختلف بتامرکاپتواتانول در pH=۸، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.

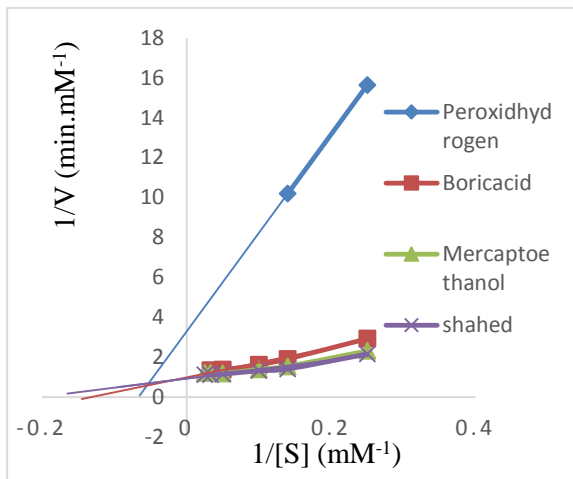
$V_{max}$ (mM.min <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	غلظت بتا مرکاپتواتانول + ۳۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن (میلی مولار)
۰/۳۰۵	۱۴/۴۵	۰
۰/۳۱۰	۱۳/۱۹	۴
۰/۹۴	۹/۴۷	۱۵
۱/۰۰۸	۴/۹۹	۳۰
۱/۰۳	۴/۵۲	استاندارد (عدم حضور افکتور)

**جدول ۵.** تغییرات  $V_{max}$  (فعالیت آنزیم) و  $K_m$  (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره‌آز در حضور پراکسید هیدروژن (۳۰ میلی مولار) و غلظت‌های مختلف بوریک اسید در pH=۸، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.

$V_{max}$ (mM.min <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	غلظت بوریک اسید + ۳۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن (میلی مولار)
۰/۳۰۵	۱۴/۴۵	۰
۰/۳۰۷	۱۳/۳۸	۴
۰/۸۱	۱۲/۴۳	۱۵
۰/۹۴	۶/۷۳	۳۰
۱/۰۳	۴/۵۲	استاندارد (عدم حضور افکتور)

همانطور که در نمودارها و جدول‌ها دیده می‌شود تیمار شدن آنزیم با غلظت‌های مختلف بوریک اسید و بتامرکاپتو اتانول قبل از اضافه شدن پراکسید هیدروژن (۳۰ میلی مولار) سبب حفاظت اوره‌آز در برابر مهار شدن به‌وسیله پراکسید هیدروژن می‌شود و همچنین همانطور که در نمودار و جدول ۶ آورده شده اثر حفاظتی بتامرکاپتو اتانول بیش‌تر از بوریک اسید

هیدروژن بر روی اوره‌آز شدند و اثر حفاظتی بتامرکاپتواتانول بیشتر از بوریک اسید می‌باشد.



**نمودار ۶.** اثر حفاظتی بتامرکاپتواتانول و بوریک اسید بر مهار شدن آنزیم اوره‌آز در برابر پراکسید هیدروژن (۳۰ میلی مولار) در pH=۸ دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد

**جدول ۷.** تغییرات  $V_{max}$  (فعالیت آنزیم) و  $K_m$  (تمایل آنزیم به سوبسترا) اوره‌آز در حضور پراکسید هیدروژن (۳۰ میلی مولار) به همراه بتامرکاپتواتانول و بوریک اسید در pH=۸، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد.

$V_{max}$ ( $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	مواد مختلف حفاظتی + ۳۰ میلی مولار پراکسید
۰/۳۰۵	۱۴/۴۵	در غیاب مواد حفاظت کننده
۰/۹۴	۶/۷۳	بوریک اسید
۱/۰۰۸	۴/۹۲	بتامرکاپتواتانول
۱/۰۳	۴/۵۲	استاندارد (عدم حضور افکتور)

می‌باشد (Srivastava & Kayatha, 2000). مشاهدات بالا این موضوع را نشان می‌دهند که همه گروه‌های سولفات در یک زمان با افکتور وارد واکنش نمی‌شوند. گروه‌های SH در دسترس نسبت به گروه دیگر، سریع‌تر با افکتور واکنش می‌دهند. بنابراین غیرفعال شدن اوره‌آز به وسیله معرف‌های بلوکه‌کننده گروه‌های SH یک سینتیک مهاری ۲ مرحله‌ای را نشان می‌دهند که نیمی از فعالیت آنزیم در مرحله اول (مرحله سریع) و نیمه باقی‌مانده فعالیت آنزیم در مرحله دوم (مرحله آهسته) از بین می‌رود (Prakash & Upadhyay, 2003). این مشخصه رفتاری بر واکنش‌پذیری نیمی از جایگاه‌ها در آنزیم دلالت می‌کند در حالی که همه جایگاه‌ها در فعالیت شرکت می‌کنند. این بحث پخش نیمی از جایگاه‌ها در مولکول اولیگوامریک اوره‌آز به وسیله سینتیک دو فازی غیرفعال شدن حرارتی اوره‌آز بیشتر تقویت شد (Prakash & Bhushan, 1998). این پدیده تقارن مولکولی در اوره‌آز نتیجه‌ای از ساختمان چهارم آن است و به وسیله هیچ لیگاندی کاهش نمی‌یابد.

با توجه به داده‌های به دست آمده در این مطالعه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که پراکسید هیدروژن در برابر اوره‌آز به عنوان یک مهارکننده مختلط (رقابتی-غیر رقابتی) عمل می‌کند و اثر مهاری پراکسید هیدروژن وابسته به pH می‌باشد. همچنین، داده‌های به دست آمده ثابت کردند که بوریک اسید و بتامرکاپتواتانول سبب کاهش اثر مهاری پراکسید

## REFERENCES

- Barbara, K.; (2010). Hydrogen peroxide-induced inactivation of urease: Mechanism, kinetics and Inhibitory Potency.; (2011). Enzymatic 68: 262-269. DOI: 10.1016/j.molcat.2010.11.015.
- Barbara, K.; Rudi, E.; (2012). Brindell, Małgorzata (13 August 2012).
- Barbara, K.; Stefano, C.; (2005). Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease Probing acid-base groups of the active site by pH variation. *plant physiology and Biochemistry*; 43: 651- 658. DOI:10.1016/J.Plaphy-2005.05.009.
- Ga-eun, P.; Ha-na, O.; Samyoung, A.; (2009). Improvement of the ammonia analysis by the phenate method in water and wastewater. *Bull. korean chem. Soc.*; 30(9).
- Karplus, P.A.; Pearson, M.A.; Hausinger, R.P.; (1997). 70 years of crystalline urease: What have we

- learned? Accounts of Chemical Research; 30(8): 330-337.
7. Martin, P.R.; Hausinger, R.P.; (1992). Site-directed mutagenesis of the active site cysteine in *Klebsiella aerogenes* urease. The Journal of biological chemistry; 267(28): 20024-7. PMID1400317.
  8. Prakash, O.; Bhushan, G.; (1998). Molecular asymmetry in urease of watermelon (*Citrullus vulgaris*). J. Plant Biochem. Biotechnol; 7: 50-55.
  9. Prakash, O.; Upadhyay, L.S.B.; (2003). Effect of thiols on the activity of urease from dehusked seeds of watermelon (*Citrullus vulgaris*). Plant Sci.; 160, 164: 189-194.
  10. Sina, A.; Yagmur, Y.; GÜlay, B.; Adil, D.M.; Yakup, A.; (2002). Reversible immobilization of urease on to procion Brown mx-5BR-Ni(II) attached polyamide hollow-fibre membranes. Process Biochemistry 38(2002)675-683. PII: S0032-9592(02)00198-X.
  11. Sonila, D.; Alqi, C.; (2010). An optimal procedure for ammoniacal nitrogen analysis in natural waters using indophenols Blue method. Podgorica; 9(3): 743-751.
  12. Srivastava, P.K.; Kayastha, A.M.; (2000). Significance of sulhydryl groups in the activity of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) seeds. Plant Sci.; 519: 539-512.
  13. Stefano, B.; Rypniewski, Wojciech, R.; Wilson Keith, S.; Silvia, M.; Stefano, C.; Stefano, M.; (1999). A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis costs two nickels.
  14. Wiesława, Z.; Barbara, K.; Maciej, L.; Zofia, O.; (2001). Inhibition of urease by  $Ni^{2+}$  ions Analysis of reaction progress curves. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 13: 103-108.
  15. Winterbourn, M.W.; ANAL.; (1967). Phenole-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical chemistry; 39: 971-974.
  16. Waldemar, K.; Mirosława, K.; Wiesława, Z.; (2009). 5-Hydroxy-1, 4-naphthoquinone (juglone) and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) influence on jack bean urease activity: Elucidation of the difference in inhibition activity. Bioorganic Chemistry; 38: 132-137.