

Immobilization of Urease Enzyme on Amyloid Nano-biofibrils from Bovine Serum Albumin

Zolfaghar Lotfi¹, Mohammad Fazilati²,
Amir Arasteh^{3*}, Habibollah Nazem⁴

1. Ph. D. Candidate, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran

4. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Jan. 4, 2018 - Accepted: Feb. 3, 2018)

تثبیت آنزیم اوره‌آز روی نانو بیوفیبریل‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی

ذوالفقار لطفی^۱، محمد فضیلتی^۲، امیر آراسته^{۳*}،

حبیب‌الله ناظم^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، رشت، ایران

۴. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸)

Abstract

The urease enzyme (EC.3.5.1.5) is from hydrolase group that catalyzes urea hydrolysis to ammonia and carbon dioxide. This enzyme has various applications in nitrogen metabolism, vaccine preparation, urea diagnosis kits, drinking industries, and so on. In this study, amyloid nano-fibrils from bovine serum albumin were used as a new scaffold for immobilizing the urease enzyme. The production of amyloid nano-fibers has been optimized with three techniques of Congord spectrophotometry, Spectrofluorimetry and Spectropolarimetry, and the resulting fibrils have been confirmed by electron microscopy images. Then the urease enzyme was immobilized on the amyloid fibrils using glutaraldehyde molecules via cross-linked bridges and their kinetic factors were compared with the free enzyme. The highest amount of amyloid fibrils was obtained after 48 hours incubation of bovine serum albumin at a concentration of 10 mg.ml⁻¹ and 70 °C in a citrate-phosphate buffer pH 4. The immobilized enzyme had more reusability and stability than the free form and showed a higher activity and a smaller K_m. Optimum temperature was improved from 40 °C to 70 °C and optimum pH was also improved from 6-7 to 6-9 in immobilized enzyme. In conclusion, amyloid fibrils with different chemical groups have been suitable for immobilization of urea enzyme. Improvement of kinetic properties and stability of urease enzyme by immobilizing on amyloid fibers allows for the widespread use of this enzyme in the related industries.

Keywords: Enzyme Immobilization, Urease, Amyloid Fibrils, Bovine Serum Albumin

چکیده

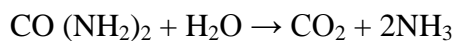
آنزیم اوره‌آز (EC.3.5.1.5) از دسته هیدرولازها است که هیدرولیز اوره را به آمونیاک و دی اکسیدکربن کاتالیز می‌کند. این آنزیم کاربردهای مختلفی در متابولیسم نیتروژن، تهیه واکسن، کیت‌های تشخیص اوره، صنایع نوشابه‌سازی و غیره دارد. در این تحقیق از نانورشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان بستری جدید برای تثبیت آنزیم اوره‌آز استفاده شد. تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی با سه تکنیک طیف‌سنجی کنگورد، اسپکتروفلوریمتری و اسپکتروپلاریمتری بهینه‌سازی شده و رشته‌های حاصله با تصاویر میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفتند. سپس آنزیم اوره‌آز با استفاده از مولکول‌های گلو تارآلدئید و با ایجاد پل‌های عرضی روی رشته‌های آمیلوئیدی تثبیت شده و فاکتورهای سینتیکی آن با آنزیم آزاد مقایسه شدند. بیشترین میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون آلبومین سرم گاوی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در بافر سترات-فسفات با pH برابر ۴ به‌دست آمد. آنزیم تثبیت‌شده نسبت به شکل آزاد دارای قابلیت نگهداری و پایداری بیشتری بود و فعالیت ویژه بالاتر و نیز K_m کوچکتری را نشان داد. دمای بهینه از ۴۰ به ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه نیز از ۶ تا ۷ به ۶ تا ۹ در آنزیم تثبیت‌شده بهبود یافت. بنابراین رشته‌های آمیلوئیدی با داشتن گروه‌های شیمیایی مختلف، برای تثبیت آنزیم اوره‌آز مناسب بوده‌اند. بهبود ویژگی‌های سینتیکی و پایداری آنزیم اوره‌آز در اثر تثبیت بر رشته‌های آمیلوئیدی امکان استفاده گسترده‌تر از این آنزیم را در صنایع مرتبط فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: تثبیت آنزیم، اوره‌آز، رشته‌های آمیلوئیدی، آلبومین سرم گاوی.

مقدمه

به دلیل کاربردهای متنوعی که دارد، بسیار مورد اهمیت می‌باشد. این آنزیم به وفور در بیشتر گیاهان، قارچ‌ها، جلبک‌ها و برخی بی‌مهرگان یافت شده و هرچند در موجودات مختلف، ساختار متفاوتی دارد، ولی در تمام موجودات دارای عملکرد یکسانی است. این آنزیم به‌عنوان یک عامل ضدسرطان (Liversidge *et al.*, 2011)، بهبود دهنده فشار خون بالا (Wright *et al.*, 2007)، موثر در متابولیسم نیتروژن (Huntington, 1986)، تهیه واکسن (Carballo *et al.*, 1992)، تهیه کیت‌های تشخیص اوره خون (Ali *et al.*, 2011) و در صنعت نوشابه سازی برای پایین آوردن میزان الکل (Fidaleo *et al.*, 2006) کاربرد دارد. همچنین از اوره‌آز در تهیه زیست‌حسگر سیستم‌های همودیالیز و برای تعیین میزان اوره خون استفاده می‌شود (Smith *et al.*, 1993; Ali *et al.*, 2011).

آنزیم اوره‌آز (اوره آمیدو هیدرولاز، EC.3.5.1.5)، یک متالو آنزیم وابسته به نیکل و از دسته هیدرولازها است که هیدرولیز اوره را به آمونیاک و دی اکسید کربن کاتالیز می‌کند (Moblely *et al.*, 1995; Follmer, 2008; Mulinari *et al.*, 2011). واکنشی که در این حالت رخ می‌دهد به شکل زیر است (Andrews *et al.*, 1986; Sujoy & Aparna, 2013).



از ویژگی‌های بارز ساختاری این آنزیم وجود یک اتم فلزی نیکل در مرکز جایگاه فعال است (Blakeley & Zerner, 1984) که باعث شده این آنزیم در گروه متالو آنزیم‌ها قرار گیرد (Dixon *et al.*, 1975). تثبیت آنزیم اوره‌آز می‌تواند موجب افزایش پایداری آنزیم شود، ولی تثبیت نامناسب می‌تواند فعالیت آنزیم را کاهش دهد. مواد و ترکیبات مختلفی را می‌توان به‌عنوان بستر برای تثبیت اوره‌آز در نظر گرفت، ولی استفاده از نانومواد می‌تواند به عنوان یک نوآوری در تثبیت آنزیم اوره‌آز محسوب

آنزیم‌ها کاتالیزورهایی هستند، که در سلول‌های زنده سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی را افزایش می‌دهند. به همین دلیل آنها را کاتالیزورهای حیاتی^۱ گویند (Robinson, 2015). آنزیم‌ها بسیار کارآمد هستند و می‌توانند سرعت واکنش را گاهی تا ۱۰ میلیارد برابر افزایش دهند. با توجه به پیشرفت تکنولوژی نوین و مهندسی پروتئین، آنزیم‌ها بسیار اهمیت یافته‌اند و به طور گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف صنعتی و درمانی مورد استفاده قرار گرفته است (Gurung *et al.*, 2015; Mohamad *et al.*, 2013). یکی از محدودیت‌های کار با آنزیم‌ها طول عمر کوتاه، پایداری کم و عدم امکان استفاده مجدد از آنها است (Sheldon, 2007; Sheldon & van Pelt, 2013). علاوه بر این امکان نگهداری آنزیم‌های آزاد در محلول ضعیف است و بازیابی آنها به‌طوری که فعالیت خود را حفظ کنند امکان‌پذیر نیست (Danial *et al.*, 2015). یکی از بهترین راه حل‌ها، تثبیت آنزیم است. تثبیت آنزیم‌ها موجب افزایش پایداری آنها شده (Masuda *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017) و این امکان را به‌وجود می‌آورد تا از یک نمونه آنزیمی، چندین بار استفاده شود (Hamza *et al.*, 2015). آنزیم‌های تثبیت‌شده به دلیل داشتن ویژگی‌هایی چون ثبات بالاتر، قابلیت استفاده مجدد و کارایی بالاتر نسبت به شکل آزاد (تثبیت‌نشده)، کاربردهای بیشتری نیز دارند (Mohamad *et al.*, 2015). از دیگر مزایای تثبیت آنزیم‌ها می‌توان به ایجاد امکان استفاده مجدد از آنزیم با هزینه کمتر، جداسازی آسان‌تر از محیط واکنش و حفظ گروه‌های فعال موجود در سطح آنزیم تثبیت‌شده اشاره کرد (Andrews *et al.*, 1986; Khan *et al.*, 2013). یکی از آنزیم‌های کاربردی، آنزیم اوره‌آز است که

1. Bio catalyst

جذب^۱ و تغییر مکان قرمز^۲ به عنوان یک پارامتر عمومی در تشخیص حضور رشته‌های آمیلوئیدی به حساب می‌آید. برای این کار ۵ غلظت مختلف از پروتئین در بافر مخلوط سترات-فسفات با پنج pH مختلف حل شده و برای ۵ دوره زمانی مختلف از صفر تا ۴۸ ساعت در دماهای مختلف قرار گرفتند. نمونه‌ها در میکروتیوپ‌های ته گرد ۲ میلی‌لیتری ریخته شده و پس از قرار دادن یک مگنت کوچک و محکم کردن درب میکروتیوپ با پارافیلیم، به‌منظور تشکیل رشته‌های آمیلوئیدی روی هیتر-استایرر قرار گرفتند. پس از طی زمان لازم و تولید رشته‌های آمیلوئیدی، ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات هر میکروتیوپ با ۱۹۰۰ میکرولیتر بافر کنگورد (فسفات بافر سالین حاوی رنگ کنگورد با غلظت ۲۰ میکرومولار) مخلوط شده و برای ۱۰ دقیقه تا تثبیت رنگ در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس طیف مرئی محلول در طول موج ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفوتومتر مرئی (SHIMADZU UV 1800) اندازه‌گیری و ثبت شد (Holm *et al.*, 2007).

برای بررسی حضور رشته‌های آمیلوئیدی با روش نشر تیوفلاوین T، میزان ۱۵ میکرولیتر از نمونه آمیلوئیدی با محلول ۶۵ میکرومولار از این رنگ به حجم ۶۰۰ میکرولیتر رسانیده شد. در این آزمایش، نمونه‌ها در طول موج ۴۴۰ نانومتر برانگیخته شده و نشر حاصل از گروه‌های تحریک شده در محدوده ۴۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید (Pilkington *et al.*, 2010). برای انجام روش دورنگ نمایی دورانی در محدوده فرابنفش دور^۳ از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نمونه‌های آمیلوئیدی تولید شده در بافر تریس استفاده شد و نمونه‌ها در کووت (سل) با ضخامت ۰/۱ سانتی متر ریخته شده و فاکتور تتا (θ)

گردد. نانو مواد به‌علت نسبت سطح به حجم بالا، امکان بارگذاری آنزیم بیشتری را فراهم می‌کنند (Mankar *et al.*, 2011; Mohamad *et al.*, 2015). یکی از این نانو مواد جدید، رشته‌های آمیلوئیدی هستند که از تغییر یا از دست دادن فولد پروتئین‌های مختلف به صورت ساختارهای رشته مانند به‌وجود می‌آیند (Kim *et al.*, 2006). رشته‌های آمیلوئیدی، ساختارهایی بسیار پایدار و با قدرت مکانیکی بالا هستند (Chiti & Dobson, 2006; Jayawardena *et al.*, 2017) و اگرچه در ایجاد چندین بیماری انسانی دخالت دارند، اما شواهد نشان می‌دهد که آمیلوئیدها ممکن است عملکردهای مثبت متنوعی نیز داشته باشند. کشف رشته‌های آمیلوئیدی، استفاده از آنها را در طراحی مواد جدید در ابعاد نانو میسر ساخته است (Mankar *et al.*, 2011). در همین راستا در این تحقیق از رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از پروتئین آلبومین سرم گاوی به‌عنوان بستری برای تثبیت آنزیم اوره‌آز استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

آنزیم اوره‌آز، پروتئین آلبومین سرم گاوی، رنگ‌های تیوفلاوین تی و کنگورد از شرکت سیگما (St. Louis, Mo) و اوره، سدیم تنگستات، کوماسی بریلیانت بلو G-250 و سایر ترکیبات شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک (Merck-Germany-Darmstadt) با حداکثر خلوص ممکن تهیه شد.

بهینه‌سازی فرایند تولید نانو رشته‌های آمیلوئیدی از آلبومین سرم گاوی

فرایند تولید رشته‌های آمیلوئیدی با سه روش جذب‌سنجی کنگورد، فلورسانس ThT و دورنگ نمایی دورانی بهینه‌سازی شد. رشته‌های آمیلوئیدی موجب افزایش میزان طول موج ماکزیمم و نیز جذب در طول موج ماکزیمم رنگ کنگورد نسبت به حالت کنترل (فقط رنگ کنگورد) می‌شوند. این افزایش

1. Hyper chromicity
2. Red shift
3. Far-UV CD

زمینه‌پروتئینی (رشته‌های آمیلوئیدی)، گلوٲارالدهید (ایجادکننده پل عرضی بین آنزیم و بستر) و آنزیم اوره‌آز انجام شد. این کار در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از رشته‌های آمیلوئیدی (میزان بهینه فیبریل تولیدشده)، میزان ثابت ۱۰۰ میلی‌مولار از گلوٲارالدهید و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنزیم اوره‌آز (میزان بهینه آنزیم مورد نیاز برای تثبیت) انجام گرفت. فرایند تثبیت در همان میکروتیوپ تولید بستر آمیلوئیدی و با حجم ۶۰۰ میکرولیتر از آن انجام شد. سپس به میزان هم حجم (۶۰۰ میکرولیتر) از گلوٲار آلدهید ۳۰۰ میلی‌مولار و اوره‌آز (۲/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر فسفات با pH برابر ۷) اضافه شد. این کار جهت ایجاد محلول نهایی با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار از گلوٲارالدهید و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنزیم گلوکز اکسیداز انجام شد. نمونه برای یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا فرایند تثبیت کامل گردد. برای زدودن آنزیم آزاد، پس از تثبیت نمونه برای یک ساعت با دور ۳۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. برای اطمینان، نمونه یکبار دیگر با بافر فسفات، شستشو و محلول رویی پس از سانتریفیوژ دور ریخته شد. در این فرایند، میزان آنزیم مورد نیاز برای تثبیت در غلظت ثابت فیبریل زمینه و گلوٲارالدهید، بهینه‌سازی و غلظتی از آنزیم که بیش‌ترین فعالیت را در فرم تثبیت‌شده نشان داد، به عنوان غلظت بهینه گزارش شد.

سنجش فعالیت آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده و آزاد

برای تعیین فعالیت آنزیم اوره‌آز از روش جذب‌سنجی مرئی و معرف نسلر^۴ استفاده شد (Danial et al., 2015). برای این کار به یک میلی‌لیتر از بافر فسفات با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار (pH برابر ۷) که حاوی ۱۵۰ میلی‌مول اوره بود، میزان ۴۰۰ میکروگرم آنزیم اوره‌آز اضافه و پس از به‌هم‌زدن برای ۳۰ دقیقه در دمای

در محدوده طول موج ۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروپلاریمتر^۱ ثبت شد (Holm et al., 2007). میزان درصد ساختارهای آلفا و بتا با نرم‌افزار CDNN و با استفاده از داده‌های حاصله محاسبه و گزارش شد. برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی، ۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی حاوی رشته‌های آمیلوئیدی روی گریدهای فرموار^۲ پوشیده از کربن (400-Mesh) قرار داده شد. پس از ۴۵ ثانیه، گریدها با آب دو بار تقطیر شسته و با اورانیل استات یک درصد رنگ‌آمیزی شدند. پس از خشک شدن گریدها، نمونه پروتئینی با میکروسکوپ الکترونی گذاره^۳ مورد بررسی قرار گرفت (Pilkington et al., 2010).

جداسازی و تعیین میزان غلظت فیبریل تولید شده

برای تعیین میزان رشته‌های آمیلوئیدی تولید شده، غلظت پروتئین در محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ دو نمونه پروتئینی در شرایط آمیلوئیدزایی و غیرآمیلوئیدزایی با هم مقایسه شدند. ابتدا دو نمونه پروتئینی مشابه از آلبومین سرم گاوی تهیه شد و سپس یکی در شرایط بهینه آمیلوئیدزایی و دیگری در دمای ۴ درجه یخچال (برای جلوگیری از تولید آمیلوئید) قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها برای نیم ساعت در دور ۲۳ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و میزان غلظت پروتئین موجود در محلول رویی آن‌ها با روش برادفورد تعیین و با هم مقایسه شدند. از آنجایی‌که شرایط در هر دو میکروتیوپ یکسان است (بجز دما)، با تعیین میزان اختلاف غلظت پروتئین موجود در محلول رویی، می‌توان به میزان فیبریل تولید شده پی برد.

تثبیت آنزیم اوره‌آز روی رشته‌های آمیلوئیدی

فرایند تثبیت آنزیم در حجم‌های برابر از سه فاکتور

1. Jasco J-810 spectropolarimeter
2. Formvar
3. Philips Electron Microscope 208 S

4. Nessler reagent

آنزیم با استفاد از روش تعیین فعالیت استاندارد، بررسی و دمای بهینه مشخص گردید. برای بررسی پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده، آنزیم‌ها در پنج دوره زمانی صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در سه دمای ۳۰، ۵۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از آن فعالیت آنزیم با استفاد از سنجش فعالیت استاندارد بررسی شد. برای تعیین ثبات ذخیره‌سازی نیز هر دو حالت آنزیم آزاد و تثبیت شده، در دمای اتاق نگهداری شدند و میزان فعالیت تا دو ماه (هر ۷ روز یک‌بار) بررسی شد.

نتایج

نتایج حاصل از بهینه‌سازی تولید رشته‌های آمیلوئیدی
از آنجایی که روش جذب سنجی کنگورد، روشی سریع و ارزان است، فرایند تولید رشته‌های آمیلوئیدی ابتدا با این روش در غلظت‌های مختلف ۲ تا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین آلبومین سرم گاوی، دماهای ۳۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد، pHهای ۳ تا ۷ و در دوره‌های مختلف زمانی صفر تا ۴۸ ساعت انجام شد و در هر مورد نتایج به صورت مقایسه طیف‌های مرئی در محدوده ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر و اندازه گیری میزان طول موج ماکزیمم ثبت و بررسی شد. بر این اساس، بیشترین میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی (بر مبنای بیشترین طول موج ماکزیمم مشاهده شده از طیف مرئی در حضور کنگورد) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در بافر سیترات-فسفات با pH برابر ۴ مشاهده شد (شکل ۱).
با توجه به عدم امکان انجام روش‌های نشر فلورسانس و دورنگ نمایی دورانی (CD) در این تعداد بالا، فرایند بهینه‌سازی تولید رشته‌های آمیلوئیدی با این روش‌ها بر مبنای حالات بهینه حاصل از روش طیف سنجی کنگورد برنامه‌ریزی و برای بهینه‌سازی هر پارامتر، سه پارامتر دیگر ثابت در نظر گرفته شد. یکی از روش‌های شناسایی تشکیل رشته‌های

اتاق قرار داده شد. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول ۰/۳ درصد سدیم تنگستات و ۰/۳ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۶۸ مولار و یک میلی‌لیتر معرف نسلر به آن اضافه شده و حجم نهایی با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. سپس میزان جذب نمونه در طول موج ۴۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. میزان آمونیاک آزاد شده با استفاد از نمودار استاندارد آمونیوم سولفات تعیین گردید. یک واحد آنزیمی از فعالیت اوره‌آز، به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که بتواند در مدت یک دقیقه یک میکرومول اوره را به آمونیاک تبدیل کند. برای تعیین فعالیت آنزیم تثبیت شده، موارد بالا انجام شد و با این تفاوت که بجای ۴۰۰ میکروگرم اوره‌آز، از نمونه آنزیم تثبیت‌شده روی رشته‌های آمیلوئیدی باقیمانده در انتهای میکروتیوپ (۲/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد.

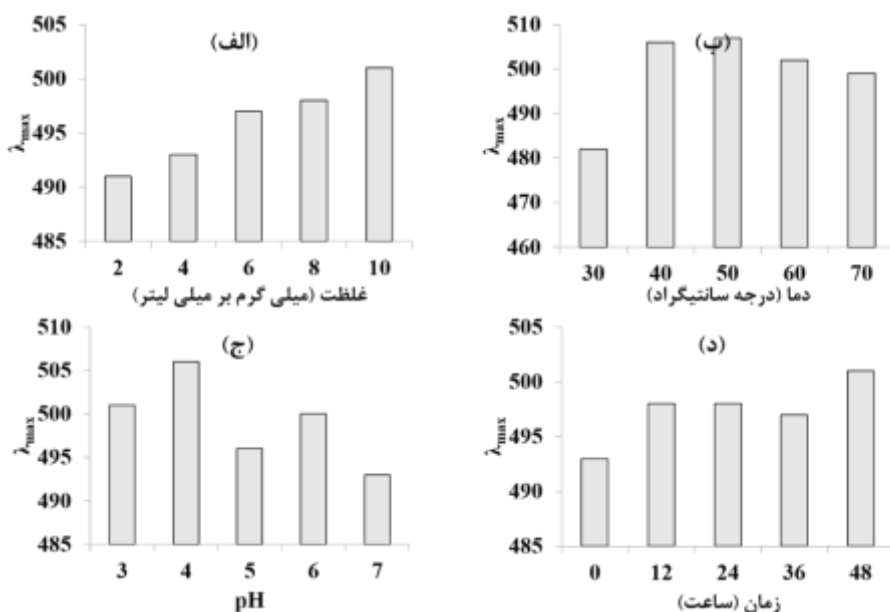
تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم اوره‌آز آزاد و تثبیت‌شده

برای تعیین فعالیت ویژه، میزان فعالیت به‌دست آمده در هر مورد از آنزیم‌های آزاد و تثبیت‌شده بر میزان واقعی آنزیم موجود در شرایط واکنش تقسیم شد. مقادیر K_m و V_{max} نیز با رسم نمودار لاین ویور-برک^۱ بدست آمد. برای تعیین میزان pH بهینه آنزیم اوره‌آز آزاد و تثبیت شده، در هر مورد ابتدا نمونه آنزیمی برای مدت ۳۰ دقیقه در pHهای مختلف قرار داده شد. در این تحقیق از بافر مخلوط سیترات-فسفات ۰/۱ مولار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با pHهای ۵ تا ۹ استفاده گردید. سپس میزان فعالیت با استفاد از روش سنجش فعالیت استاندارد با معرف نسلر اندازه گیری و میزان pH بهینه مشخص شد. برای تعیین دمای بهینه نیز آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده و آزاد، به مدت ۳۰ دقیقه در دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس فعالیت

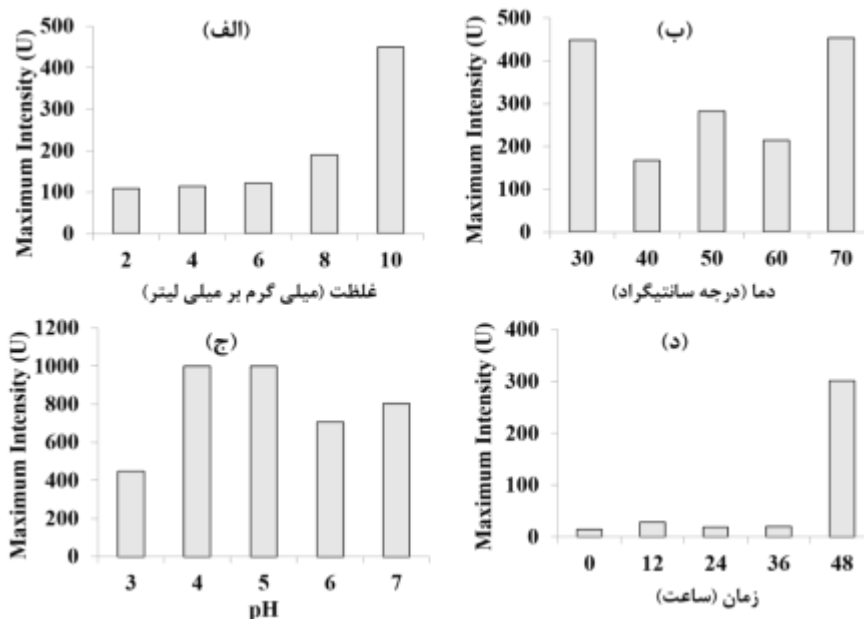
1. lineweaver-burk plot

بیشترین میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی (بر مبنای بیشترین میزان نشر تیوفلاوین T) در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلومین سرم گاوی، دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در بافر سیترات-فسفات با pH برابر ۴ مشاهده شد.

آمیلوئیدی استفاده از رنگ فلورسانت تیوفلاوین T می‌باشد. تیوفلاوین T با قرار گرفتن در بین صفحات بتا باعث افزایش شدت نشر پرتوهای تابیده شده نسبت به حالت کنترل (عدم حضور رشته‌های آمیلوئیدی) در محلول می‌گردد. همانطور که در شکل ۲ دیده می‌شود،



شکل ۱. نمودار مقایسه‌ای میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی با روش جذب سنجی کنگورد بر مبنای تغییر طول موج ماکزیمم در (الف) غلظت‌های مختلف پروتئین، (ب) دماهای مختلف، (ج) pH های مختلف و (د) زمان‌های مختلف از صفر تا ۴۸ ساعت



شکل ۲. نمودار مقایسه‌ای میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی با روش اسپکتروفلوریمتری بر مبنای تغییر میزان شدت نشر فلورسانس ThT در (الف) غلظت‌های مختلف پروتئین، (ب) دماهای مختلف، (ج) pH های مختلف و (د) زمان‌های مختلف از صفر تا ۴۸ ساعت

پروتئین موجود در محلول رویی در میکروتیوپ قرار گرفته در یخچال (غیر فیبریل‌زایی) ۲/۱۱ میلی گرم بر میلی لیتر و این مقدار در نمونه قرار گرفته در شرایط بهینه فیبریل زایی ۰/۰۹۷ میلی گرم بر میلی لیتر است. این مطلب تولید حدود ۲ میلی گرم از رشته‌های آمیلوئیدی در هر میلی لیتر از محلول پروتئینی مورد آزمایش را نشان می‌دهد. این آزمایش در دفعات مختلف تکرار شده و نتایج به صورت میانگین آورده شده است (شکل ۵-ب).

نتایج حاصل از تثبیت آنزیم اوره‌آز

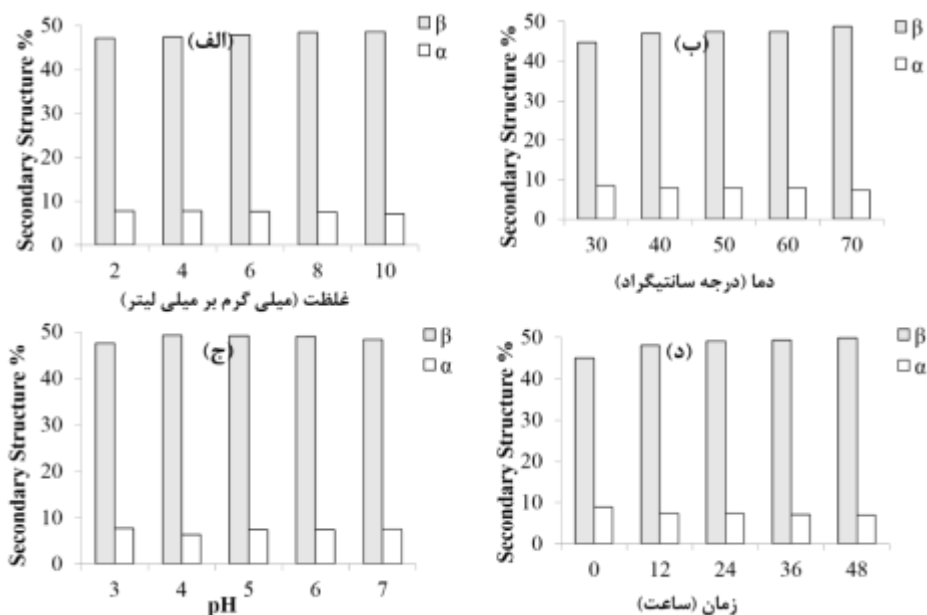
در این تحقیق میزان بهینه آنزیم مورد نیاز برای تثبیت بهینه سازی شد و غلظتی از آنزیم که بیشترین فعالیت را در فرم تثبیت شده نشان داد، به عنوان غلظت بهینه گزارش گردید. این کار با ثابت نگه داشتن غلظت فیبریل زمینه و گلوٲارالدهید انجام شده و مشخص شد که بهترین میزان آنزیم مورد نیاز برای قرارگیری روی ۶۶۰ میلی گرم بستر پروتئین موجود در شرایط تثبیت (۰/۶ میلی لیتر از بستر پروتئین با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) برابر ۸۰۰ میکروگرم می باشد (شکل ۵-الف).

نتایج انجام روش دورنگ نمایی دورانی در ۲۰ حالت مختلف برای بررسی اثر فاکتورهای غلظت، دما، pH و زمان انکوباسیون بر میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی در شکل ۳ نشان داده شده است. همانطور که در نمودارهای ستونی دیده می‌شود، بالاترین میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی بر مبنای درصد ساختارهای ثانویه آلفا و بتا در پروتئین، در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون محلول در بافر سیتراٲ-فسفات با pH برابر ۴ در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

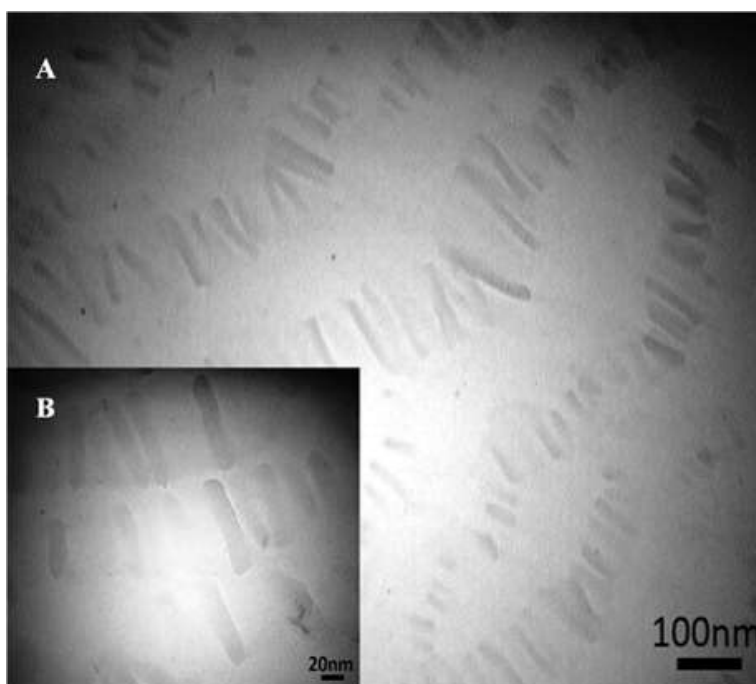
تولید رشته‌های آمیلوئیدی در بهترین حالت با تصاویر حاصل از روش میکروسکوپ الکترونی گذاره مورد تایید قرار گرفت. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، رشته‌های آمیلوئیدی به صورت رشته‌های باریک با پیش رشته‌های عمود بر جهت رشته اصلی و با قطر تقریبی ۲۰ نانومتر و طول حدود ۳۰۰ نانومتر در یک زمینه روشن قابل تشخیص می‌باشند.

نتایج حاصل از تعیین میزان غلظت فیبریل تولیدشده

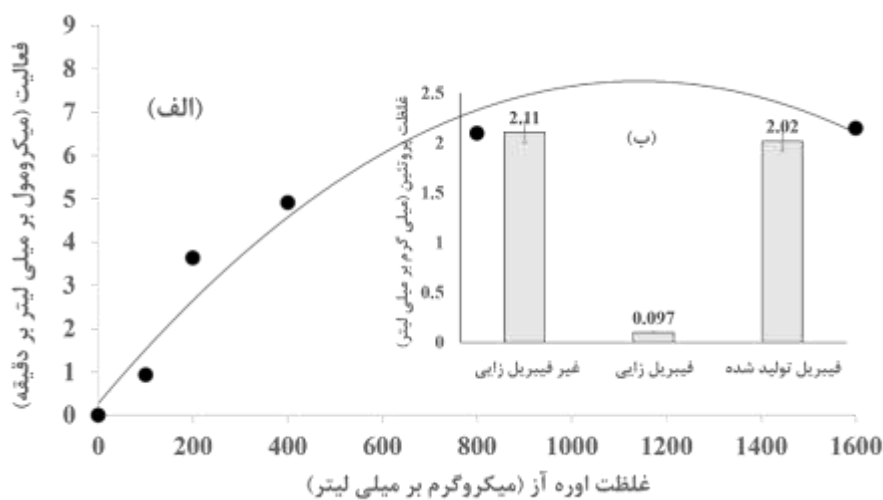
بر اساس روش تعیین کمی پروتئین برادفورد، میزان



شکل ۳. نمودار مقایسه‌ای میزان تولید رشته‌های آمیلوئیدی با روش دورنگ نمایی دورانی بر مبنای تغییر میزان درصد ساختارهای ثانویه آلفا و بتا در (الف) غلظت‌های مختلف پروتئین، (ب) دماهای مختلف، (ج) pH های مختلف و (د) زمان‌های مختلف از صفر تا ۴۸ ساعت



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از رشته‌های آمیلوئیدی. تصاویر (A) و (B) به ترتیب با بزرگ‌نمایی ۱۰ و ۵۰ هزار برابر تهیه شده‌اند

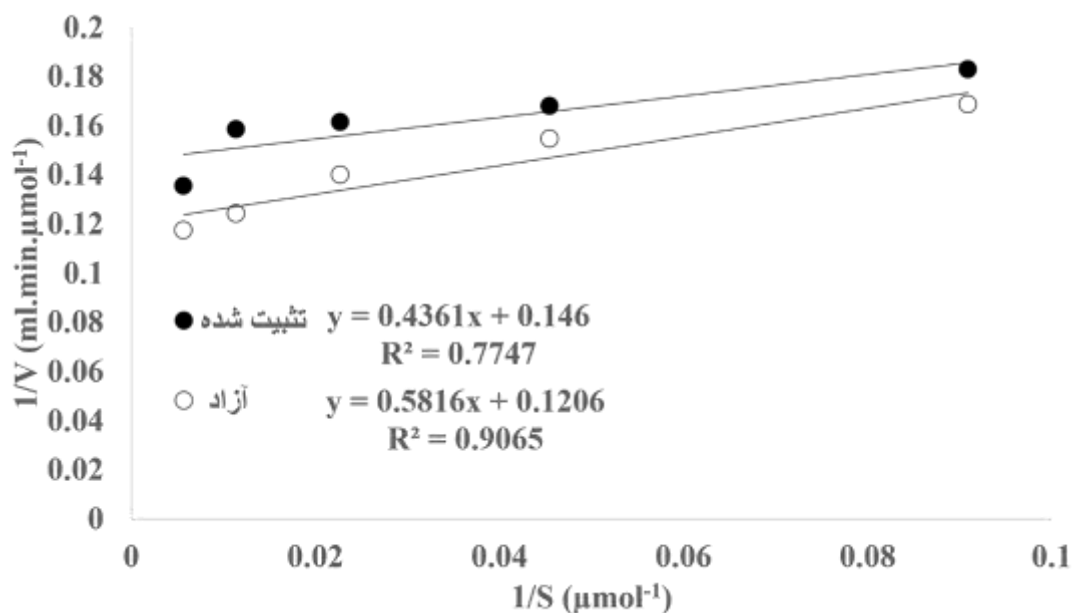


شکل ۵. (الف) نمودار تغییرات فعالیت اوره‌آز در برابر غلظت آنزیم به کاررفته در فرایند تثبیت، (ب) تعیین میزان فیبریل تولید شده در شرایط بهینه فیبریل‌زایی

واحد بین المللی بر میلی لیتر و $4/84$ میلی مول و برای آنزیم تثبیت شده به ترتیب برابر $6/84$ واحد بین المللی بر میلی لیتر و $2/98$ میلی مول به دست آمد. همان طور که قبلا در بخش روش‌ها اشاره شد، یک واحد آنزیمی به عنوان مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که در مدت یک دقیقه یک میکرومول اوره را به آمونیاک تبدیل کند.

نتایج حاصل از بررسی پارامترهای سینتیکی اوره‌آز تثبیت شده و آزاد

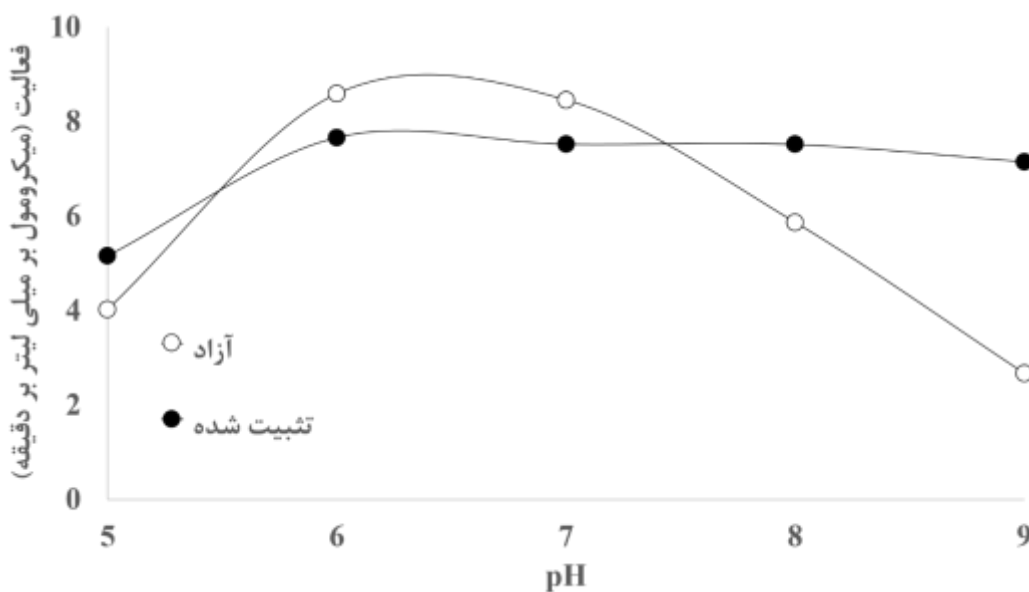
میزان کمی پارامترهای V_{max} و K_m مربوط به آنزیم آزاد و تثبیت شده با استفاده از نمودار لاینویور-برک به دست آمد. شکل ۶ نمودار مقایسه‌ای لاینویور-برک آنزیم آزاد و تثبیت شده را در کنار هم نشان داده است. مقادیر V_{max} و K_m آنزیم آزاد به ترتیب برابر $8/29$



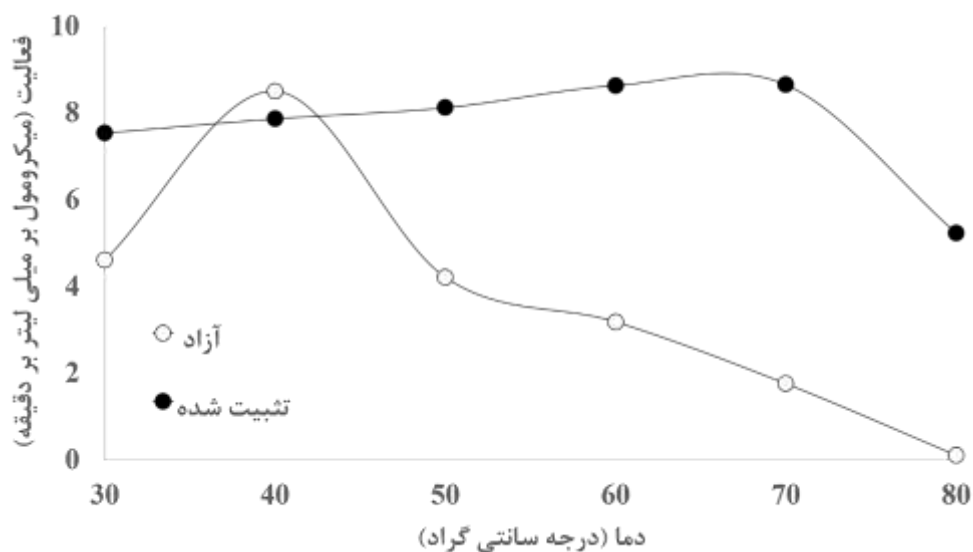
شکل ۶. نمودار مقایسه‌ای لاینوور-برک آنزیم آزاد و تثبیت‌شده

در شکل ۸ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشخص است، آنزیم آزاد بیش‌ترین فعالیت را در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد دارد، ولی در آنزیم تثبیت‌شده، میزان فعالیت با افزایش دما از ۴۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد نه تنها کاهش ندارد، بلکه با افزایش مواجه شده است، به طوری که در دمای ۷۰ درجه به بالاترین حد خود می‌رسد.

نتایج بررسی اثر pH های مختلف بر فعالیت آنزیم آزاد و آنزیم تثبیت‌شده در شکل ۷ نشان داده شد. همان‌طور که در این شکل مشخص است، میزان pH بهینه برای اوره‌آز آزاد بین ۶ تا ۷ است ولی آنزیم تثبیت‌شده در محدود ۶ تا ۹ بیشترین فعالیت را دارد. اثرات دما بر فعالیت اوره‌آز آزاد و آنزیم تثبیت‌شده



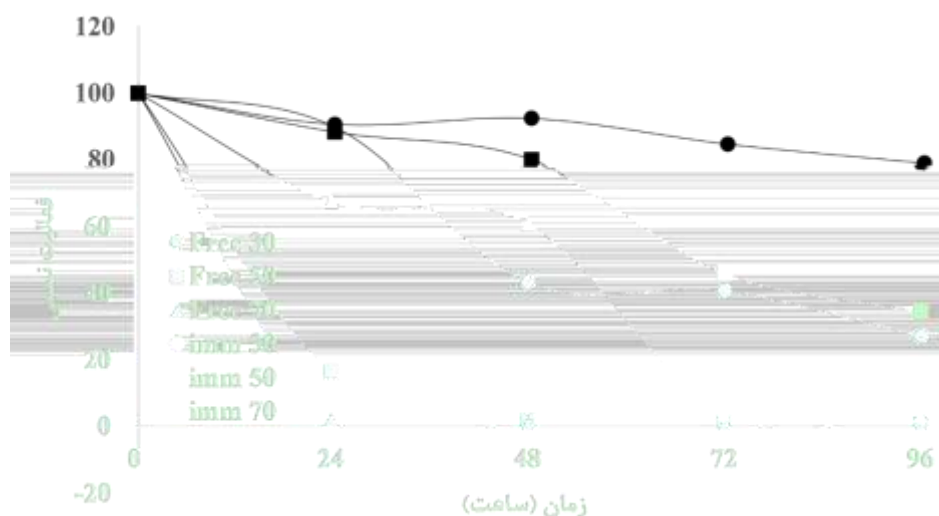
شکل ۷. مقایسه میزان pH بهینه آنزیم آزاد و تثبیت‌شده



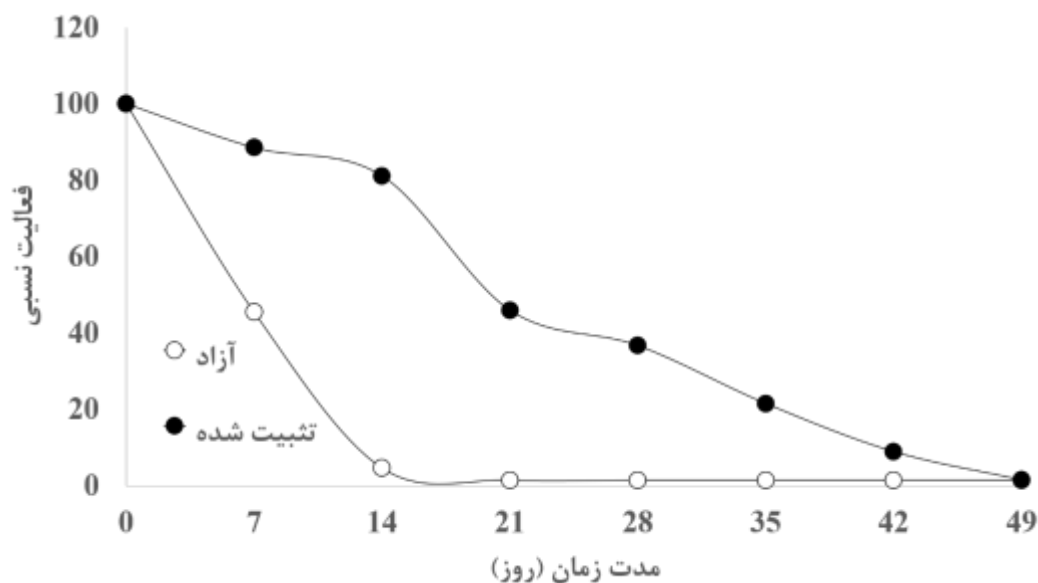
شکل ۸. مقایسه میزان دمای بهینه آنزیم آزاد و تثبیت‌شده

سانتی‌گراد به خوبی تا ۹۶ ساعت حفظ شده و تا ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه نیز پایدار باقی می‌ماند. نتایج بررسی پایداری نگهداری آنزیم^۱ اوره‌آز آزاد و تثبیت‌شده در دمای اتاق در شکل ۱۰ نشان داده شده است. آنزیم آزاد به مدت ۱۴ روز و آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده روی نانو فیبریل‌های آمیلوئیدی به مدت ۴۲ روز در دمای اتاق قابل نگهداری بوده و همچنان دارای فعالیت می‌باشد.

نتایج بررسی میزان پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در شکل ۹ آمده است. همان‌طوری که در این شکل مشخص است آنزیم آزاد فقط در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تا ۹۶ ساعت فعالیت خود را حفظ می‌کند و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت خود را تا ۴۸ ساعت و در ۷۰ درجه فعالیت خود را تا ۲۴ ساعت حفظ می‌کند. درحالی‌که در مورد آنزیم تثبیت‌شده، فعالیت آنزیم در دمای ۳۰ و ۵۰ درجه



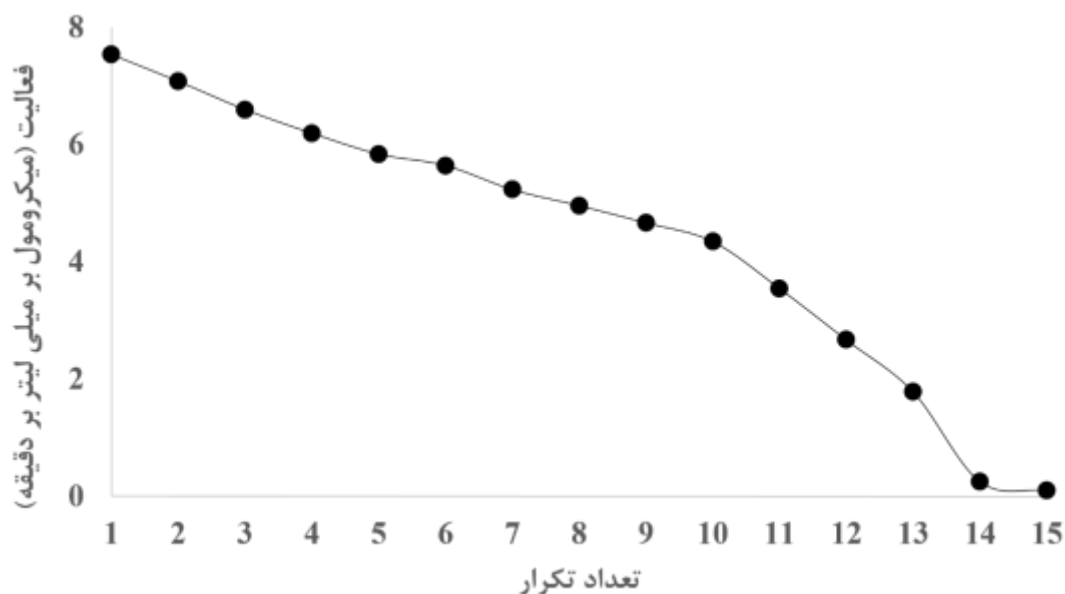
شکل ۹. مقایسه پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در دماهای مختلف



شکل ۱۰. مدت زمان استفاده از آنزیم آزاد و تثبیت‌شده

کمی از فعالیت آنزیم کاهش پیدا می‌کند، ولی آنزیم آزاد بدلیل محلول بودن، فقط یک بار قابل استفاده بود (شکل ۱۱). در جدول ۱ پارامترهای سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده به صورت مقایسه‌ای نشان داده شده است.

نتایج بررسی قابلیت استفاده مجدد از آنزیم تثبیت شده در شکل ۳ مشخص است. از اوره‌آز تثبیت‌شده در محلول مورد سنجش فعالیت، می‌توان تا ۱۴ بار به طور متوالی فرایند تعیین میزان فعالیت را تکرار کرده و از آنزیم فعالیت دید. البته در هر بار استفاده مجدد،



شکل ۱۱. تعداد دفعات استفاده مجدد از آنزیم تثبیت‌شده

جدول ۱. مقایسه پارامترهای سینتیکی آنزیم آزاد و تثبیت شده

| آنزیم آزاد | آنزیم تثبیت شده | فاکتورهای سینتیکی |
|------------|-----------------|---|
| ۷/۸۹۷ | ۷/۷۴۳ | فعالیت (DU.ml ⁻¹) |
| ۰/۰۱۹ | ۰/۰۳۲ | فعالیت ویژه (mol.gr.ml ⁻¹ .min ⁻¹) |
| ۴/۸۴ | ۲/۹۸ | K _m (mM) |
| ۸/۲۹ | ۶/۸۴ | V _{max} (IU.ml ⁻¹) |
| ۴۰ | ۷۰ | دمای بهینه (°C) |
| ۶-۷ | ۶-۹ | pH بهینه |
| ۲۴ | ۷۲ | پایداری حرارتی (ساعت) |
| ۱۴ | ۴۲ | پایداری ذخیره سازی (روز) |
| ۱ | ۱۴ | تعداد دفعات استفاده مجدد |

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق از نانو رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان بستری برای تثبیت آنزیم اوره‌آز استفاده شد. آلبومین سرم گاوی به علت ارزان و در دسترس بودن به‌عنوان زمینه پروتئین در نظر گرفته شد و فرایند تولید رشته‌های آمیلوئیدی از آن بهینه‌سازی گردید. سپس آنزیم اوره‌آز روی این نانو رشته‌های آمیلوئیدی تثبیت شد. فرایند تثبیت با استفاده از روش ایجاد پل‌های عرضی بین آنزیم و فیبریل‌های آمیلوئیدی انجام گرفت و ویژگی‌های آنزیم تثبیت‌شده با آنزیم آزاد مقایسه شد.

پارامترهای سینتیکی در اوره‌آز تثبیت‌شده بهبود یافته‌اند

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فعالیت اوره‌آز تثبیت‌شده نسبت به حالت آزاد کمتر شده، ولی میزان فعالیت ویژه (فعالیت به ازای هر گرم آنزیم موجود در شرایط واکنش) از ۰/۰۱۹ به ۰/۰۳۲ ارتقا پیدا کرده است. این مطلب نشان می‌دهد که آنزیم تثبیت‌شده نسبت به حالت آزاد توانایی بیشتری برای کاتالیز پیدا کرده و از نظر کیفی ارتقا پیدا کرده است.

میزان K_m آنزیم تثبیت شده نیز نسبت به فرم آزاد کاهش نشان می‌دهد. پارامتر K_m، مقدار غلظتی از سوبسترا است که در آن غلظت میزان سرعت واکنش به نصف میزان اولیه برسد. هرچه میزان K_m کمتر

باشد آنزیم نسبت به حضور سوبسترا در محیط حساس‌تر بوده و برای آن اختصاصی‌تر است. به نظر می‌رسد آنزیم اوره‌آز نیز با اتصال بر روی بستر آمیلوئیدی، به نحوی از نظر فضایی تغییر یافته است که جایگاه فعال آن بهتر برای اوره در دسترس قرار گرفته است. در عوض میزان V_{max} آنزیم تثبیت‌شده نسبت به حالت آزاد کاهش داشته است. احتمالاً کاهش میزان سرعت ماکزیمم اوره‌آز تثبیت شده نشان از کاهش انعطاف‌پذیری آنزیم و نوعی سخت‌شدگی در عملکرد کاتالیتیکی آن دارد که در نتیجه این اتصال با بستر پروتئینی رخ داده است.

افزایش دمای بهینه آنزیم تثبیت‌شده از ۴۰ به ۷۰ درجه سانتی‌گراد، نشانه و گواه خوبی برای این واقعیت است که فرم تثبیت‌شده اوره‌آز توانایی بیشتری برای تحمل دمای بالا را داشته و با تثبیت آنزیم روی نانو رشته‌های آمیلوئیدی توانسته‌ایم، امکان استفاده از اوره‌آز را در دماهای بالاتر به‌وجود آوریم. مقایسه pH بهینه آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده و آزاد نیز نشان داد که pH بهینه آنزیم آزاد که در محدوده ۶ تا ۷ است، در مورد آنزیم تثبیت‌شده گسترده‌تر شده و از این پس آنزیم اوره‌آز در محدوده ۶ تا ۹ دارای فعالیت بهینه می‌باشد. این مطلب نوید بخش ایجاد امکان استفاده از آنزیم اوره‌آز در محلول‌ها با گستره وسیع‌تر pH فراهم شده است. در واقع تثبیت آنزیم اوره‌آز روی رشته‌های آمیلوئیدی، محدوده pH بهینه را گسترده‌تر کرده و

است. این مطلب احتمالاً به دلیل است که ساختار سه بعدی اوره‌آز در اثر اتصال به زمینه پروتئینی استحکام و پایداری بیشتری پیدا کرده است. احتمالاً حضور گروه‌های شیمیایی متنوع و مختلف بر روی سطح رشته‌های آمیلوئیدی که از جنس پروتئین هستند، توجیه‌کننده ایجاد این اتصالات پایدارکننده باشند. *Danial et al.* (2015) و نیز *Kespi et al.* (2010) نشان دادند که آنزیم اوره‌آز تثبیت شده به مدت طولانی در دمای اتاق قابل نگهداری است که این نتیجه تحقیق ما را تایید می‌کند (*Pithawala, Mishra et al., 2010; Danial et al., 2015*). *Luo et al.* (2010) با تثبیت آنزیم اوره‌آز نشان دادند که تثبیت باعث می‌شود تا پایداری ذخیره سازی آن بالا رود. آنها علاوه بر این مشخص کردند که آنزیم اوره‌آز پس از تثبیت چندین بار قابل استفاده است (*Luo & Fu, 2010*). افزایش امکان استفاده مجدد از آنزیم یکی دیگر از مزایا و اهداف تثبیت آنزیم است که از لحاظ اقتصادی و کاربردی اهمیت بسیاری دارد.

نانو رشته‌های آمیلوئیدی زمینه مناسبی برای فرایند تثبیت هستند

مواد زیستی مشتق شده از طبیعت اغلب با بدن انسان سازگاری بیشتر، توانائی فعالیت زیستی و زیست تخریبی بالائی دارند. فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین‌های نامحلولی هستند که در فرایندهای فیزیولوژی طبیعی قارچ‌ها (*Gebbink et al., 2005*) و باکتری‌ها، به‌عنوان مثال در تنظیم تولید مثل و تولید بیوفیلم دخیل هستند (*Wang et al., 2008*, *Pilkington et al., 2010*). رشته‌های آمیلوئیدی دارای ثبات حرارتی بالائی (تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد) بوده و برای تثبیت آنزیم‌ها فاکتور مناسبی می‌باشند و همچنین در محدود وسیعی از pH و نیز دمای بالا پایداری خود را حفظ می‌کنند و در معرض آنزیم‌های پروتئولیتیک پایداری بالائی دارند. کاربردهای بالقوه فیبریل‌های آمیلوئید آنها را به عنوان نانوساختارهای

به‌سمت قلیائی سوق داده است. *Danial et al.* (2015) نشان دادند که آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده در مقابل افزایش دما به علت اثر محافظتی که رشته‌های آمیلوئیدی از آنزیم در مقابل دما دارند، مقاوم بیشتری دارد. همچنین آنها نشان دادند که تثبیت آنزیم اوره‌آز محدوده pH بهینه آنزیم را گسترده‌تر کرده و به سمت قلیائی متمایل ساخته است (*Mishra et al., 2010; Danial et al., 2015*). این مطلب نتایج حاصل از این پژوهش را تایید می‌کند.

همانطور که در شکل ۹ نشان داده شده است، میزان پایداری حرارتی آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده و آزاد نشان داد که آنزیم تثبیت‌شده تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایدار است، اما حداکثر پایداری حرارتی آنزیم آزاد تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد بوده است. این بهبود پایداری حرارتی آنزیم تثبیت‌شده به علت وجود یک بستر و نقش حفاظتی آن برای آنزیم اتصال یافته به آن در برابر افزایش دما می‌باشد. این افزایش پایداری حرارتی آنزیم نیز یکی دیگر از اهداف تثبیت بود که در این تحقیق تا حدودی به دست آمده است. افزایش پایداری حرارتی معمولاً در اکثر موارد و با تثبیت آنزیم بر روی زمینه‌های مختلف تامین می‌شود و نشان از اثر محافظت دمایی بستر بر آنزیم تثبیت‌شده بر روی خود دارد. یکی دیگر از مزیت‌های آنزیم تثبیت شده، افزایش امکان نگهداری اوره‌آز برای مدت زمان طولانی برای انجام فرایندهای کاتالیزی مرتبط در دمای محیط می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تثبیت اوره‌آز روی نانو رشته‌های آمیلوئیدی حاصل از آلبومین سرم گاوی امکان استفاده از آنزیم را از ۱۴ روز در دمای اتاق تا ۴۹ روز ارتقا داده است. این مطلب نشان می‌دهد که فرایند تثبیت نه‌تنها موجب افزایش مقاومت ساختاری آنزیم در برابر دماهای بالا شده است بلکه تغییر ساختاری اوره‌آز تثبیت شده به نحوی بوده است که حتی در دمای محیط نیز پایداری بیشتری پیدا کرده و قادر به کاتالیز واکنش‌های بیشتر و در نتیجه عمر بیشتری پیدا کرده

می‌باشد. استفاده از آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده این امکان را به‌وجود می‌آورد تا علاوه بر بهبود فاکتورهای سینتیکی آنزیم، از این به بعد بتوانیم از اعمال این آنزیم در سطح گسترده‌تر و در صنایع مختلف استفاده کنیم. نتایج حاصل از این تثبیت می‌تواند در آینده و پس از طی آزمون‌های سازگاری‌سنجی در مهندسی پزشکی کاربردهای مختلفی داشته باشد. به‌عنوان مثال تهیه یک سیستم تجزیه‌کننده اوره خون برای افراد مبتلا به نارسایی کلیه و یا تهیه زیست‌حسگر جدید برای تعیین میزان کمی اوره خون از جمله این کاربردها هستند.

سپاسگزاری

از ریاست محترم دانشگاه پیام نور مرکز قم جناب آقای دکتر محمد علی حسینی، مدیر محترم آزمایشگاه پیام نور قم جناب آقای دکتر مهدی کلهر و کارشناسان آزمایشگاه سرکار خانم لیلا یادگار و خانم سید زاده که ما را در انجام و ارتقاء و کیفی این پژوهش یاری دادند و همچنین از آزمایشگاه همکار استاندارد (SAHA) دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، تشکر و قدردانی می‌گردد.

کاربردی جدید مطرح می‌سازد، اما هنوز به‌طور گسترده مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند (Gras, 2007; Cherny & Gazit, 2008). بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان گفت که اوره‌آز تثبیت‌شده دارای مزایایی بیش از آنزیم آزاد است. آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده روی فیبریل‌های آمیلوئیدی در دامنه وسیع‌تری از pH فعالیت داشته و دمای بهینه بالاتری دارد. همچنین پایداری حرارتی، زمان نگه‌داری آن در دمای اتاق و تعداد دفعات استفاده مجدد از آن کاملاً نسبت به فرم آزاد بهبود یافته است. بنابراین رشته‌های آمیلوئیدی با توجه به شباهت بیشتر ساختاری که به سیستم‌های زنده دارند و نیز زیست‌تخریب‌پذیری، داشتن ابعاد نانو، استحام بالا و عدم سمیت می‌توانند جایگزین مناسبی به‌عنوان بستر تثبیت آنزیم اوره‌آز به‌جای پلیمرهای مصنوعی باشند.

اوره‌آز تثبیت‌شده روی نانو فیبریل‌های آمیلوئیدی دارای کاربردهای مختلفی است

این تحقیق از این لحاظ که در فرایند تثبیت آنزیم از یک بستر پروتئینی استفاده شده است، دارای نوآوری

REFERENCES

- Ali, S.M.U., *et al.*; (2011). Selective determination of urea using urease immobilized on ZnO nanowires. *Sensors and Actuators B: Chemical*; 160(1): 637-643.
- Andrews, R. K., *et al.*; (1986). Jack Bean Urease (EC3.5.1.5). 8. On the Inhibition of Urease by Amides and Esters of Phosphoric Acid. *Journal of the American Chemical Society* 108: 7124-7125.
- Andrews, R. K., *et al.*; (1986). Jack bean urease (EC 3.5. 1.5) VIII. On the inhibition of urease by amides and esters of phosphoric acid. *Journal of the American Chemical Society*; 108(22): 7124-7125.
- Blakeley, R. L.; Zemer, B.; (1984). Jack Bean Urease: The First Nickel Enzyme. *Journal of Molecular Catalysis*; 23: 263-292.
- Carballo, M., *et al.*; (1992). Evaluation of a urease-based confirmatory enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin Microbiology* 30: 2181-2183.
- Cherny, I.; Gazit, E.; (2008). Amyloids: not only pathological agents but also ordered nanomaterials. *Angewandte Chemie International Edition*; 47(22): 4062-4069.
- Chiti, F.; Dobson, C. M.; (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu Rev Biochem* 75: 333-366.
- Danial, E. N., *et al.*; (2015). Characteristics of Immobilized Urease on Grafted Alginate Bead Systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*; 58(2): 147-153.
- Dixon, N. E., *et al.*; (1975). Jack bean urease (EC 3.5.1.5), A metalloenzyme,

- A simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc* 97: 4131-4133.
- Fidaleo, M., *et al.*; (2006). Assessment of Urea Degradation Rate in Model Wine Solutions by Acid Urease from *Lactobacillus fermentum*. *J. Agric Food Chem*; 54: 6226-6235.
- Follmer, C.; (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry*; 69(1): 18-28.
- Gebbink, M. F., *et al.*; (2005). Amyloids-a functional coat for microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*; 3(4): 333-341.
- Gras, S. L.; (2007). Amyloid Fibrils: From Disease to Design. *New Biomaterial Applications for Self-Assembling Cross- β Fibrils*. *Applied chemistry*: 5.
- Gurung, N., *et al.*; (2013). A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int*; 2013: 329121.
- Holm, N., *et al.*; (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins&Proteomics*; 1774(9): 1128-1138.
- Huntington, G.; (1986). Uptake and transport of nonprotein nitrogen by the ruminant gut. *Fed Proc*; 45: 2272-2276.
- Jayawardena, N., *et al.*; (2017). Amyloid Fibrils from Hemoglobin. *Biomolecules*; 7(2): 37.
- Khan, M., *et al.*; (2013). Kinetics and thermodynamic study of urease extracted from soybeans. *Biologia*; 59(1): 7-14.
- Kim, J., *et al.*; (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*; 61(3): 1017-1026.
- Lee, C., *et al.*; (2017). Improving the Stability of Cold-Adapted Enzymes by Immobilization. *Catalysts*; 7(4): 112.
- Liversidge, G., *et al.*; (2011). Altering the Tumor Microenvironment. *Drug Dev Deliv*; 11: 68-72.
- Luo, Z.; Fu, X.; (2010). Immobilization of urease on dialdehyde porous starch. *Starch-Stärke*; 62(12): 652-657.
- Mankar, S., *et al.*; (2011). Nanomaterials: amyloids reflect their brighter side. *Nano Rev*; 2.
- Masuda, Y., *et al.*; (2014). Improvement of thermal-stability of enzyme immobilized onto mesoporous zirconia. *Journal of Asian Ceramic Societies*; 2(1): 11-19.
- Mobley, H. L. T., *et al.*; (1995). Molecular Biology of Microbial Ureases. *Microbiological Reviews*; 59(3): 451-481.
- Mohamad, N. R., *et al.*; (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip*; 29(2): 205-220.
- Mulinari, F., *et al.*; (2011). Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. *Biochim Biophys Acta*; 1814(12): 1758-1768.
- Pilkington, S. M., *et al.*; (2010). Amyloid fibrils as a nanoscaffold for enzyme immobilization. *Biotechnology Progress*; 26(1): 93-100.
- Pithawala, K., *et al.*; (2010). Immobilization of urease in alginate, paraffin and lac. *Journal of the Serbian Chemical Society*; 75(2): 175-183.
- Robinson, P. K.; (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays In Biochemistry* 59: 1-41.
- Sheldon, R.; (2007). Cross-linked enzyme aggregates, stable and recyclable biocatalysts, Portland Press Limited.
- Sheldon, R. A.; van Pelt, S.; (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem Soc Rev.*; 42(15): 6223-6235.
- Smith, P. T., *et al.*; (1993). Isolation and characterization of urease from *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology*; 5(139): 597-562.
- Sujoy, B.; Aparna, A.; (2013). Potential clinical significance of urease enzyme. *European Scientific Journal*; 9(21): 94-102.
- Wang, X., *et al.*; (2008). The molecular basis of functional bacterial amyloid polymerization and nucleation. *Journal of Biological Chemistry*; 283(31): 21530-21539.
- Wright, C. I., *et al.*; (2007). Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. *J Ethnopharmacol*; 114(1): 1-3.