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

Research article

Production of urease nanoparticles by desolvation method and comparison of some of their properties with free urease

Razieh Sadat Hosseini MScs in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. Tayaran57@gmail.com

Seyyed Mohammad Hossein Razavian Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran **(Corresponding author)**. Razavian@qom-iau.ac.ir

Mohammad Ali Ghasemzadeh Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University**,** Qom, Iran. Ghasemzadeh@qom-iau.ac.ir

Abstract

Objective: Enzymes act as natural catalysts in biological reactions. But they have limitations such as lack of thermal stability, short life span and their lack of stability in the organic environment. Therefore, scientists have tried to improve the performance of enzymes in different ways, including nanotechnology. Therefore, the aim of the current study is to produce enzyme nanoparticles and evaluate some of their properties, which are being worked on due to the importance of urease in medicine, agriculture and industry.

Materials and methods: In this research, increasing the stability of urease was done based on the production of enzyme nanoparticles by desolvation method. Synthesized nanoparticles were examined using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Visible-Ultraviolet Spectroscopy (UV-Vis) and Scanning Electron Microscope (SEM). Also, the general and specific activities of free and nano enzymes were measured and compared at 37°C. In addition, free and nano enzymes were incubated for 10 minutes at temperatures between 30 and 70°C and then their activity was measured.

Findings: The results of spectroscopy and scanning electron microscopy confirmed the formation of urease nanoparticles. Also, the activity determination results showed that with the formation of enzyme nanoparticles, despite the decrease in the total activity of the enzyme, its specific activity increased by 43.46%. The optimal activity temperature of total free urease was 50°C and urease nanoparticles was 60°C.

Cite this article: Hosseini RS, Razavian MH & Ghasemzadeh MA. Production of urease nanoparticles by desolvation method and comparison of some of their properties with free urease. *Applied Biology*. 2023; 13(1): 5-28.

Received: 2022/12/22 ; **Revised:** 2023/01/15 ; **Accepted:** 2023/01/13 ; **Published online:** 2023/02/19

© the authors

Publisher: Qom Islamic Azad University

After 10 minutes of incubation at 70°C, the free and nano enzymes retained 2% and 32% of their activity, respectively, which indicates an increase in thermal stability in this method.

Conclusion: By preparing enzyme nanoparticles, it is possible to improve their activity and application in the industry.

Keywords: Enzyme nanoparticles, Urease, Desolvation, Thermal stability, Nanotechnology.

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

مقاله پژوهشی

تولید نانوذرات اوره‌آز به روش حلال‌زدایی و مقایسه برخی خواص آن‌ها با اوره‌آز آزاد

راضیه سادات حسینی | کارشناسی ارشد، گروه زیست، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. Tayaran57@gmail.com
سید محمدحسین رضویان | استادیار، گروه زیست، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران (نویسنده مسئول). Razavian@qom-iau.ac.ir
محمدعلی قاسم‌زاده | دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. Ghasemzadeh@qom-iau.ac.ir

چکیده

هدف: آنزیم‌ها به‌عنوان کاتالیزور طبیعی در واکنش‌های بیولوژیکی عمل می‌کنند. اما دارای محدودیت‌هایی مانند عدم پایداری حرارتی، طول عمر کوتاه و عدم پایداری آنها در محیط آلی نیز می‌باشند. بنابراین، دانشمندان سعی کرده‌اند عملکرد آنزیم‌ها را به روش‌های مختلف ازجمله فناوری نانو بهبود ببخشند. لذا، هدف مطالعه حاضر تولید نانوذرات آنزیمی و ارزیابی برخی خواص آن‌ها است، که به دلیل اهمیت اوره‌آز در پزشکی، کشاورزی و صنعت روی آن کار می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، افزایش پایداری اوره‌آز براساس تولید نانوذرات آنزیمی با روش حلال‌زدایی انجام شد. نانوذرات سنتز شده با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش (UV-Vis) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. همچنین فعالیت‌های کلی و اختصاصی آنزیم‌های آزاد و نانو در دمای ۳۷°C اندازه‌گیری و باهم مقایسه شد. به‌علاوه، آنزیم‌های آزاد و نانو به مدت ۱۰ دقیقه در دماهای بین ۳۰ تا ۷۰°C انکوبه و سپس فعالیت آن‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از طیف‌سنجی و میکروسکوپ الکترونی روبشی، تشکیل نانوذرات اوره‌آز را تأیید کرد. همچنین نتایج تعیین فعالیت نشان داد که با تشکیل نانوذرات آنزیمی، علی‌رغم کاهش فعالیت کل آنزیم، فعالیت اختصاصی آن ۴۳/۴۶ درصد افزایش یافت.

استناد به این مقاله: حسینی رس، رضویان م ح، قاسم‌زاده م ع. تولید نانوذرات اوره‌آز به روش حلال‌زدایی و مقایسه برخی خواص آن‌ها با اوره‌آز آزاد. *بیولوژی کاربردی*. ۱۴۰۲؛ ۱۳(۱): ۵-۲۸.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۱۰/۲۵ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۱/۱۱ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۱۱/۳۰

© نویسندگان
ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

دمای مطلوب فعالیت کل اوره‌آز آزاد ۵۰°C و نانوذرات اوره‌آز ۶۰°C بود. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در ۷۰°C، آنزیم‌های آزاد و نانو به ترتیب ۲ و ۳۲ درصد فعالیت خود را حفظ کردند که نشان‌دهنده افزایش پایداری حرارتی در این روش است.

نتیجه‌گیری: با تهیه نانوذرات آنزیمی می توان فعالیت و کاربرد آنها را در صنعت بهبود بخشید.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات آنزیمی، اوره‌آز، حلال‌زدایی، پایداری حرارتی، نانو فناوری.

۱. مقدمه

آنزیم‌ها بیوکاتالیست‌هایی هستند که به‌طور طبیعی واکنش‌های زیستی را کاتالیز می‌کنند و به‌طور گسترده در صنایع متعددی مانند صنایع غذایی، شیمیایی و دارویی استفاده می‌شوند (۱). بیوکاتالیست‌ها نسبت به کاتالیزورهای متداول غیرزیستی مزایایی از قبیل اختصاصی بودن آنزیم‌ها و نیز عدم نیاز آن‌ها به دما و فشار بالا برای انجام واکنش‌های کاتالیزوری مختلف دارند. از سوی دیگر، از آنجایی‌که آنزیم‌ها ترکیباتی زیست‌تخریب‌پذیری می‌باشند، در مقایسه با سایر کاتالیزورهای مرسوم در صنایع، اثرات سمّی کمتری دارند (۲،۳،۴). باوجود مزایای گفته‌شده برای آنزیم‌ها، کار با آن‌ها محدودیت‌های خاصی از قبیل طول عمر کوتاه، عدم پایداری حرارتی، و عدم پایداری در محیط آلی را دارند. از طرفی بازیابی آن‌ها به‌طوری‌که فعالیت خود را حفظ کنند، امکان‌پذیر نیست (۵،۶).

از این‌رو، حفظ ثبات ساختاری و افزایش فعالیت آنزیم‌ها در هر واکنش بیوشیمیایی بسیار مهم است. بنابراین، روشی که بتواند پایداری آنزیم را حفظ کند، مطلوب است؛ زیرا پایداری آنزیم علاوه‌بر رفع محدودیت ذکرشده، باعث افزایش سازگاری آنزیم در شرایط زیستی، و افزایش فعالیت در راندمان تولید محصول می‌شود (۶،۷). از این‌رو، پیشرفت در این زمینه می‌تواند منجر به بازده قابل‌توجهی در زمینه مواد غذایی و صنعت نوشیدنی، تخمیر و صنعت داروسازی شود. لذا، تحقیقات گسترده‌ای جهت افزایش پایداری آنزیم انجام‌شده و در این راستا، استراتژی‌های مختلفی از قبیل تثبیت، اصلاح شیمیایی، مهندسی پروتئین یا محیط آن و پایدارسازی به کمک نانو فناوری ارائه شده است (۷،۲۰).

از دهه ۱۹۹۰ میلادی پیشرفت نانو فناوری با پیشرفت سریع نانو زیست‌فناوری همراه بوده است. یکی از مهم‌ترین جنبه‌های نانو زیست‌فناوری، نانو کاتالیزورهای زیستی هستند. در این زمینه نانو مواد با توجه به خصوصیات منحصربه‌فرد فیزیکی و شیمیایی در زمینه‌های گوناگون صنعتی دارویی و غیره موفقیت فراوانی داشته و کاربرد دارند (۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲). در این راستا، نانو ذرات آنزیمی[1] نیز جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده است؛ زیرا اتصال مستقیم آنزیم /پروتئین به نانو ذرات ممکن است، موجب دناتوره شدن و در نتیجه کاهش فعالیت آن‌ها شود. برای برطرف کردن این مشکل، پیش از تثبیت آن‌ها، مولکول‌های آنزیم تجمیع می‌شوند تا نانو ذرات آن‌ها شکل گیرد و اتصالات عرضی بین خودشان برقرار شود. سپس از نانو ذرات آنزیمی جهت فرایند تثبیت و ساخت

1. Enzymatioc nanoparticles (ENPS)

حس‌گرهای زیستی بهبودیافته استفاده می‌شود (۱۳،۱۴،۲۰).

از دلایل مهم استفاده از مقیاس نانومتری این است که در ویژگی‌های یک ماده تأثیرگذار بوده و باعث ایجاد خواص منحصربه‌فردی مانند مساحت سطحی بیشتر، واکنش‌پذیری، پایداری خوب و زیست سازگاری بالاتر و مهم‌تر از همه رسانایی الکتریکی و حساسیت می‌شود (۱۵،۱۶،۱۷،۱۸).

از روش‌های مورد استفاده در تولید نانو ذرات آنزیمی می‌توان به امولسیون‌سازی در روغن گیاهی (۱۹)، حلال‌زدایی با اتانول نمک‌های طبیعی و پس از آن ایجاد اتصالات عرضی با گلوتارآلدئید (۲۰)، انباشتگی ساده توسط اتانول بی‌آب، گلوتارآلدئید و اتانول آمین (۲۱) و ایجاد اتصالات عرضی در امولسیون آب و روغن تحت فشار بالا (۲۸) اشاره نمود (۱۶، ۱۷). از میان این چهار روش، روش امولسیون‌سازی و ایجاد اتصالات عرضی به دلیل دمای بالا، برای بسیاری از آنزیم‌ها و روش انباشتگی ساده به دلیل پیچیدگی و سختی فرآیند تولید مناسب نیست. لذا، روش حلال‌زدایی به دلیل سادگی، دقت، دمای مناسب و سرعت عمل رایج است (۲۰). به اهمیت و کاربرد نانو ذرات آنزیم در صنایع مختلف به دلیل پایدارسازی و بهبود عملکرد بیوسنسورها می‌توان پی برد. تاکنون نانو ذرات چندین آنزیم مانند پراکسیداز ترب‌کوهی، گلوکز اکسیداز از آسپرژیلوس نایجر، کلسترول اکسیداز از گونه میکروارگانیسم، اوریکاز از گونه کاندیدا بیان‌شده در اشرشیاکلی، نانو ذرات گرفته‌شده از لوبیا جک به‌کار برده شده است (۲۴-۲۲،۱۳).

از آنجایی‌که روی ساخت و تولید نانو ذرات آنزیمی مطالعاتی کمی صورت گرفته است، در همین راستا، هدف مطالعه حاضر تولید نانو ذرات آنزیمی و ارزیابی برخی خواص آن‌ها است و با استفاده از روش حلال‌زدایی که ساده‌تر و بهتر است، به تولید نانو ذرات آنزیم پرداخته شده است. در پژوهش حاضر، نانو ذرات اوره آز تهیه شد؛ زیرا اوره آز یک متالوآنزیم بوده و دارای دو یون نیکل در جایگاه فعال خود است که باعث تسریع هیدرولیز اوره به آمونیاک می‌شود که این فرآیند در علوم بیولوژیکی، کشاورزی و پزشکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۵،۲۶،۲۷،۲۸،۲۹).

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. ساخت نانو ذرات آنزیم اوره آز[1]

سنتز نانو ذرات آنزیمی با استفاده از روش حلال‌زدایی و توسط هات پلیت مگنت استیرر

1. Urease NPs

خریداری شده از شرکت دراگون، انجام شد. برای این منظور، ۶ ml اتانول به ۲/۶۲mg آنزیم اوره آز محلول تهیه شده از شرکت مرک با سرعت ۰/۲ ml/mm به‌عنوان عامل حلال‌زدا تحت شرایط ۵۰۰rpm و حمام یخ اضافه شد. در نتیجه عامل حلال‌زدا باعث تجمع مولکول‌های اوره آز و به دنبال آن تشکیل نانو ذرات شد. سپس ۱/۸ml از گلوتارآلدئید ۲/۵% تهیه شده از شرکت مرک به نانو ذرات اوره آز تحت شرایط ۵۰۰ rpm در ۴ درجه سانتیگراد طی ۲۴ ساعت اضافه شد تا از اتصالات عرضی نانو ذرات اوره آز و در نتیجه شکل‌گیری نانو ذرات آن اطمینان حاصل شود. سپس برای جداسازی نانو ذرات آنزیمی از مولکول‌های آنزیم آزاد، سوسپانسیون حاصل، توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار خریداری شده از شرکت اپندرف-R5810 به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در ۵ سی‌سی بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH: ۷/۴ با استفاده از امواج فراصوت حمام اولتراسونیک خریداری شده از فونجلیب-F9222074 به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد و تکرار این فرایند برای دو بار دیگر همگن شد.

سرانجام ۰/۱۲g پودر سیستئین[1] تهیه شده از شرکت مرک در ۴ درجه سانتیگراد در شرایط هم زدن مداوم با سرعت ۵۰۰rpm، طی ۶ ساعت اضافه شد تا گروه‌های عاملی تیول (-SH) بر روی سطح نانو ذرات اوره آز وارد شود. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در ۲ سی‌سی بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH: ۷/۴ به‌وسیله حمام اولتراسونیک به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد و تکرار این فرآیند برای دوبار دیگر، کاملاً حل شد. نانو ذرات اوره آز تولید شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (۱۳،۱۴،۲۰،۲۲).

۲-۲. بررسی تشکیل نانو ذرات آنزیمی

جهت اطمینان از تشکیل نانو ذرات اوره آز، آزمون‌های مشخصه‌یابی آن‌ها شامل طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش، توسط اسپکتروفتومتر خریداری شده از شرکت واریان-Cary100، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) توسط اسپکتروفتومتر خریداری شده از شرکت نیکولت-Magn550 و تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی خریداری شده از شرکت تسکن -MIRA3XMU انجام گرفت (۲۰).

1. Cysteine (cys)

۲-۳. اندازه‌گیری غلظت آنزیم اوره آز

برای تعیین غلظت آنزیم اوره آز از روش‌های برادفورد، بیوره، لوری، BCA، (بیسین چونینگ) و اسپکتروفتومتری استفاده می‌شود (۳۰). در تحقیق حاضر از روش لوری استفاده شد.

۲-٤. تعیین فعالیت اوره آز

در این پژوهش تعیین فعالیت اوره آز با روش برتلوت (روش اندازه‌گیری آمونیاک) انجام شد (۱۴،۳۰). در این روش ابتدا اوره ۰/۱ مولار تهیه شده از شرکت مرک با معرف ۱ (بافر فسفات + سدیم سالیسیلات + سدیم نیتروپروساید و محلول اوره آز (آزاد یا نانو)) کاملاً باهم مخلوط شدند. پس از مخلوط نمودن، به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بن ماری انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد در فواصل زمانی ۱ دقیقه به ۵ لوله حاوی نمونه جهت متوقف کردن واکنش به ترتیب اضافه شد. سپس معرف شماره ۲ (بافر فسفات + سدیم هیدروکسید + هیپوکلریت سدیم) به ۵ لوله اضافه گردید. مجدد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بن‌ماری قرار گرفت. در این روش آمونیاک حاصل از هیدرولیز اوره توسط آنزیم اوره آز با هیپوکلریت و سالیسیلات سدیم، تشکیل یک ترکیب سبزرنگ می‌دهد. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت آمونیاک تولید شده در نمونه است. در پایان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۸ نانومتر قرائت شد.

$$H_2N - CO - 2NH_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{اوره آز}} 2NH_4^+ + CO_3^{2-}$$

۲-۵. مقایسه فعالیت آنزیم اوره آز قبل و بعد از نانو شدن

تعیین فعالیت اوره آز آزاد و نانو ذرات اوره آز به‌طور همزمان و با شرایط یکسان انجام شده و سپس باهم مقایسه شدند. نتایج نشان داد که فعالیت اوره آز آزاد بیشتر از نانو اوره آز است. لذا، هر دو اوره آز به روش لوری تعیین غلظت شده و سپس فعالیت ویژه آن‌ها به‌طور همزمان و در شرایط یکسان به روش برتلوت تعیین و باهم مقایسه شدند. فعالیت کل آنزیم، یعنی کل فعالیت آنزیم در یک محلول یا به عبارتی یک واحد (SI) فعالیت آنزیم معادل است با مقدار آنزیمی که تجزیه ۱ میکرومول از سوبسترا (اوره) یا تولید یک میکرو مول محصول (آمونیاک) را در هر دقیقه در دمای ۳۷ درجه کاتالیز می‌کند. همچنین فعالیت ویژه شامل تعداد میکرومول سوبسترایی است که در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین موجود در محیط، به محصول تبدیل شود (۳).

۲-٦. تبدیل تغییرات جذب به فعالیت تام آنزیم آزاد و نانو آنزیم اوره آز

برای تبدیل تغییرات جذب و محیط واکنش به فعالیت آنزیمی، لازم است که تغییرات غلظت محصول واکنش آنزیمی (آمونیاک) معادل با تغییر جذب در واحد زمان تبدیل گردد و برای این کار بایستی منحنی استاندارد غلظت آمونیاک/ جذب نوری رسم شود. برای این منظور ابتدا غلظت‌های مختلف آمونیاک تهیه و با روش برتلوت رنگی شدند، سپس جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۷۸ نانومتر قرائت و منحنی استاندارد آن رسم شد.

۲-۷. ارزیابی اثر دما بر فعالیت اوره آز آزاد و نانو

جهت ارزیابی اثر دما بر فعالیت اوره آز آزاد و نانو آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس به روش برتلوت تعیین فعالیت شدند.

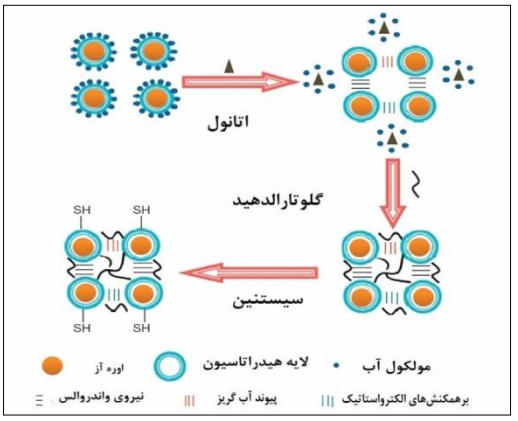
۳. نتایج

۳-۱. سنتز نانو ذرات اوره آز

تجمع‌های مولکول‌های آنزیم با اضافه کردن قطره‌قطره اتانول در ۴ درجه سانتیگراد به دلیل کاهش لایه هیدراتاسیون اطراف مولکول‌های آنزیم تشکیل می‌شوند. مولکول‌های آنزیم با نیروهایی مانند واندروالسی، برهم‌کنش آب‌گریزی و الکتروستاتیک بر یکدیگر اثر متقابل دارند که شکل‌گیری تجمع‌هایی از نانو ذرات آنزیمی را موجب می‌شوند. پس از اضافه کردن گلوتارآلدئید، دو گروه آلدئید در هر دو انتهای گلوتارآلدئید از راه تشکیل شیف باز به گروه آزاد آمینو (NH2-)، ریشه لیزین بر روی سطح نانو ذرات آنزیمی به‌صورت زیر متصل می‌گردد (شکل ۱) (۲۰):

$$ENP - NH_2 + OHC - (CH_2)_3 - CHO + H_2N - ENPS \rightarrow$$
$$ENP - N = CH - (CH_2)_2 - CH = N - ENP + 2H_2O$$

از طرفی افزودن سیستئین به سوسپانسیون نانو ذرات آنزیمی باعث ورود گروه‌های تیول (SH-) می‌شود (۳۱).



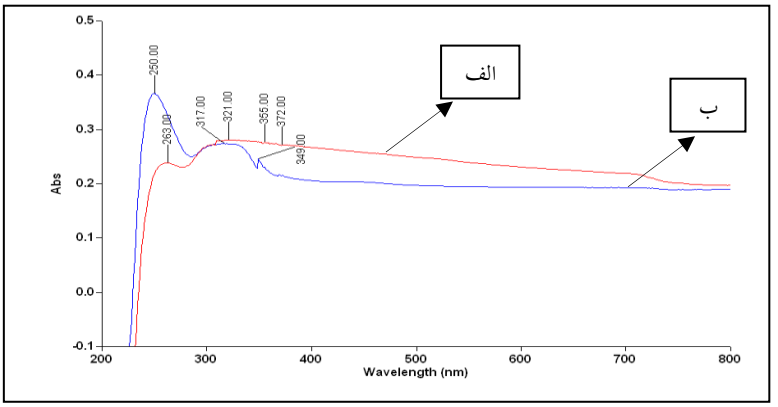
شکل ۱- طرح شماتیک تشکیل نانو ذرات اوره آز به‌وسیله فرایند حلال‌زدایی

۳-۲. ارزیابی نانو ذرات آنزیمی

۳-۲-۱. طیف جذبی UV-Vis

نتایج طیف جذبی مرئی- فرابنفش اوره آزاد در طیف ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر، یک پیک را در ۲۶۵ نانومتر نشان می‌دهد که پس از سنتز نانو ذرات از ۲۶۵ نانومتر به ۲۵۰ نانومتر، جابجا شده است. به‌علاوه، در طیف نانو ذرات اوره آز، یک جاذبه جابجایی (شیفت) بزرگ ۰/۲۷ تا ۰/۳۱۳ نانومتری پیک بند پپتیدی نسبت به مولکول‌های اوره آز طبیعی نشان داد که بیانگر آن است که مولکول‌های اوره آز بدون هرگونه تغییر در ساختار اول آنزیم تجمع یافته‌اند.

مقایسه طیف فرابنفش اوره آز آزاد و نانو ذرات اوره آز نشان داد که علی‌رغم کاهش غلظت نانو ذرات اوره آز نسبت به اوره آز آزاد در طول موج‌های ۳۰۰ نانومتر به بالا، یعنی ناحیه مرئی کاهش جذب نانو ذرات اوره آز نسبت به اوره آز آزاد دیده می‌شود، در حالی‌که در طول موج‌های ۲۶۳ تا ۲۵۰ نانومتر، افزایش جذب و در نتیجه افزایش ارتفاع پیک دیده می‌شود که نشان‌دهنده افزایش تدریجی نانو ذرات اوره آز در مقایسه با آنزیم آزاد به دلیل تجمع مولکول‌های اوره آز و ایجاد اتصالات عرضی بین‌مولکولی نانو ذرات اوره آز و اضافه شدن گروه عاملی تیول می‌باشد (شکل ۲).

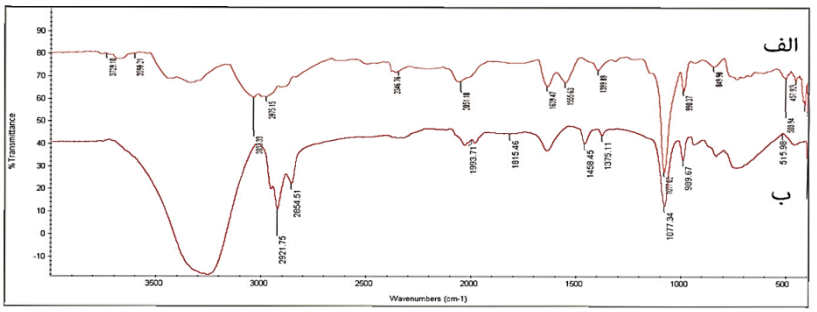


شکل ۲- طیف جذبی uv-visible (الف) اوره آز آزاد (ب) نانو ذرات اوره آز

۳-۲-۲. طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

نتایج طیف FTIR اوره آز آزاد و نانو ذرات اوره آز، نوارهای ارتعاشی کششی را در زمان انتقال به شرح زیر نشان می‌دهد:

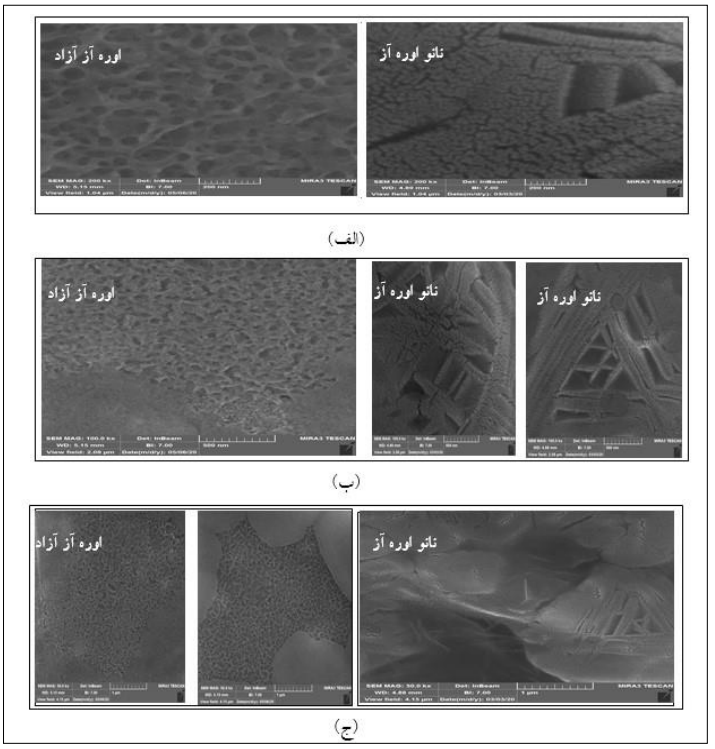
یک پیک پهن در ۳۰۰۰ تا ۳۶۵۰ مربوط به کشش $S-H, O-H$ است. نوارهای جذبی ۲۹۷۵/۱۵ در آنزیم آزاد و ۲۹۲۱/۷۵ در نانو آنزیم مربوط به کشش $C-H$ می‌باشد. پیک ۲۸۵۴/۱۹ مربوط به $C-H$ آلدئید است. لذا، فقط در نانو آنزیم دیده می‌شود. نوارهای جذبی ۱۶۳۹/۴۷ در آنزیم آزاد و پیک پهن نانو آنزیم در ناحیه $۱۵۵۰nm$ تا ۱۸۰۰ مربوط به کشش $C=O$ می‌باشد. نوارهای جذبی ۱۳۹۹/۸۹ آنزیم آزاد و ۱۳۷۵/۱۱ در نانو آنزیم مربوط به کشش $C-C$ یا $C-N$ می‌باشد. نوارهای جذبی ۱۰۷۷/۰۲ و ۳۴/۷۷۰ مربوط به کشش $C-O$ است (شکل۳).



شکل ۳- طیف FTIR آنزیم اوره آز (الف) اوره آز آزاد و (ب) نانو ذرات اوره آز

۳-۲-۳. میکروسکوپ الکترونیکی روبشی

نتایج SEM از اوره آز آزاد در ۳ بزرگنمایی ۲۰۰ و ۵۰۰ نانومتر و μm ۱ اسفنج مانند با حفره توخالی پراکنده شده در تمام سطح به‌صورت یکنواخت بوده و بیشتر حالت چسبندگی داشته و کمتر به‌صورت تک‌دانه دیده می‌شود. اما تصاویر SEM از نانو ذرات اوره آز در بزرگنمایی ۲۰۰ و ۵۰۰ نانومتر، اشکال مستطیلی و مثلثی در یک سطح فشرده و به‌صورت پراکنده بوده و به دلیل تجمع مولکول‌های آنزیمی بیشتر به‌صورت تک‌دانه دیده می‌شود. ولی در بزرگنمایی μm ۱ اشکال مستطیلی و مثلثی (در یک پنجره) در بین سطوح فشرده قالب یخ مانند پراکنده شده و به دلیل تجمع مولکول‌های آنزیمی به‌صورت تک‌دانه دیده می‌شود (شکل ۴).



شکل ٤- تصاویر SEM اوره آز آزاد و نانو ذرات اوره آز

(الف) بزرگنمایی ۲۰۰ نانومتر، (ب) بزرگنمایی ۵۰۰ نانومتر، (ج) بزرگنمایی ۱ میکرومتر

۳-۳. نتایج اندازه‌گیری فعالیت اوره آز

به دلیل اینکه غلظت واکنش‌گرها، فواصل زمانی قرائت جذب‌ها، دما و pH و... در ارزیابی

فعالیت آنزیم‌ها تأثیر دارند، کالیبراسیون و تنظیم فرآیند ارزیابی فعالیت آنزیمی کاری حساس، دقیق و زمان‌بر است که پس از تکرارهای متوالی قابل دستیابی است. لذا، ارزیابی با تغییراتی در مقدار آنزیم اوره آز و زمان با همان روش بار اول تکرار شد تا اینکه نتیجه مطلوب در رنگ و جذب حاصل و تغییرات جذب محاسبه گردید. محاسبه تغییرات جذب محیط آزمایش نشان داد که آنزیم آزاد توانسته است در واحد زمان (یک دقیقه) به میزان ۰/۰۱۱۵، میزان جذب را افزایش دهد.

۳-۳-۱. نتایج مقایسه فعالیت کل اوره آز آزاد و نانو اوره آز

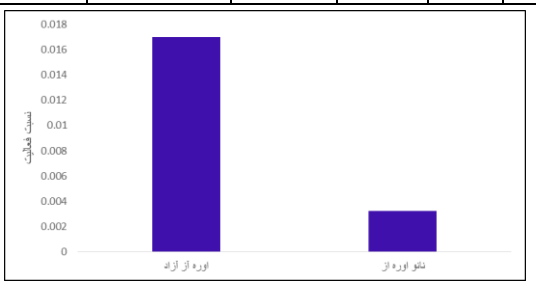
نتایج نشان داد که نانو ذرات اوره آز توانسته است در واحد زمان (یک دقیقه) به میزان ۰/۰۰۳۲۵ جذب را افزایش دهد. در حالی‌که اوره آز آزاد توانسته است در واحد زمان (یک دقیقه) به میزان ۰/۰۱۷ جذب را افزایش دهد. لذا، مقایسه جذب محیط آزمایش نانو ذرات اوره آز (۰/۰۰۳۲۵) و اوره آز آزاد (۰/۰۱۷) نشان می‌دهد که نانو ذرات اوره آز نسبت به اوره آز آزاد در واحد زمان میزان جذب را کمتر افزایش داده است که نشان‌دهنده کاهش ۷۸ درصدی فعالیت کل نانو اوره آز نسبت به اوره آز آزاد می‌باشد (جدول ۱، شکل ۵).

۳-۳-۲. نتایج مقایسه فعالیت ویژه نانو اوره آز و اوره آز آزاد

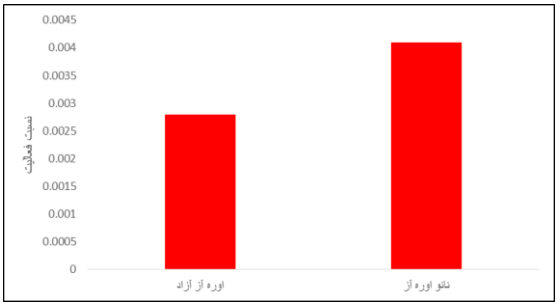
نتایج نشان می‌دهد که فعالیت ویژه نانو اوره آز ۰/۰۰۱۳ برابر بیشتر از اوره آز آزاد است؛ بنابراین، غلظت نانو اوره آز تولیدشده ۱۲/۹ درصد غلظت اوره آز آزاد شده است؛ در حالی‌که فعالیت اختصاصی آن ۴۶/۴۳ درصد بیشتر از اوره است (جدول ۱، شکل ۶).

جدول ۱- مقایسه فعالیت اوره‌آز آزاد با نانو ذرات اوره‌آز

نمونه	غلظت	فعالیت	فعالیت ویژه	افزایش فعالیت در اثر نانو کردن	دما	PH
اوره‌آز آزاد	۶	۰/۰۱۷	۰/۰۰۲۸	–	۲۸°C	۷/۴
نانو اوره‌آز	۷۷/۴	۰/۰۰۴۲۵	۰/۰۰۴۱	%۴۶/۴۴	۳۷°C	۷/۴



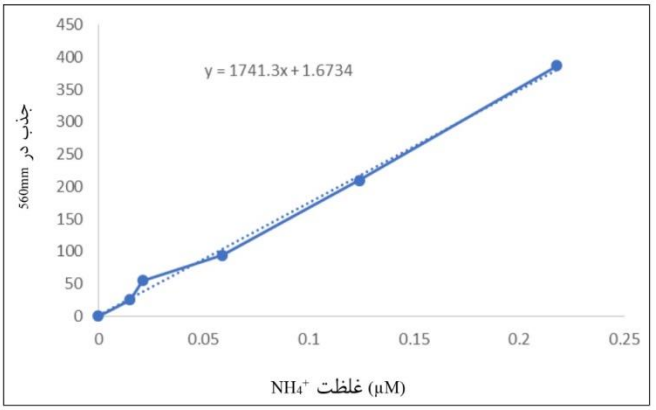
شکل۵- مقایسه فعالیت کل اوره‌آز آزاد و نانو اوره آز



شکل ٦- مقایسه فعالیت ویژه اوره‌آز آزاد و نانو اوره آز

۳-۳-۳. نتایج تبدیل تغییرات جذب فعالیت تام اوره‌آز آزاد و نانو ذرات اوره‌آز

با کمک منحنی استاندارد آمونیاک می‌توان با ارزیابی عملکرد اوره‌آز آزاد و نانو، میزان فعالیت آنزیم را برحسب میلی‌گرم تولید آمونیاک در دقیقه محاسبه کرد (شکل ۷).



شکل ۷- منحنی استاندارد آمونیاک

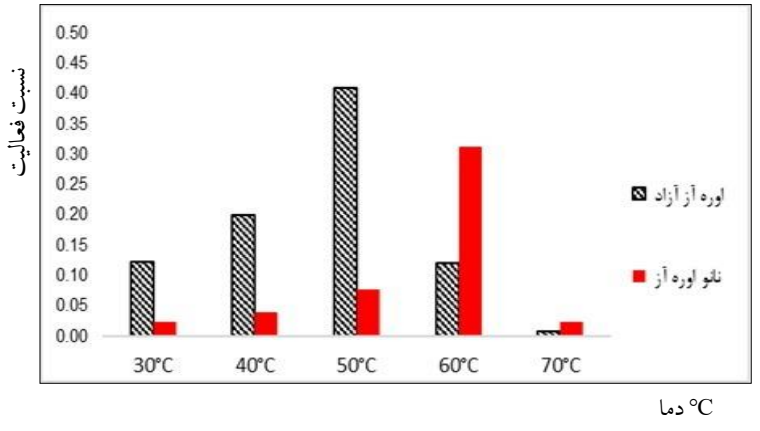
با استفاده از منحنی استاندارد و مقدار جذب اوره‌آز آزاد (۰/۰۱۷) غلظت آمونیاک تولیدشده توسط اوره‌آز آزاد در هر دقیقه حدود ۲۶ U/ml محاسبه شد. در حالی‌که مقدار آمونیاک تولیدشده توسط نانو اوره‌آز به کمک منحنی استاندارد و جذب آن (۰/۰۰۳۲۵) حدود ۳/۵ U/ml محاسبه شد. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، کاهش تولید آمونیاک توسط نانو اوره‌آز نسبت به اوره‌آز آزاد به دلیل کاهش غلظت آن (۰/۷۷۴ mg/ml) نسبت به غلظت آنزیم آزاد (۶ mg/ml) می‌باشد؛ در حالی‌که محاسبه فعالیت ویژه نشان داد که فعالیت اختصاصی و تام نانو اوره‌آز حدود ۴۶/۴۳ درصد بیشتر از اوره‌آز آزاد است.

۳-۳-٤. نتایج ارزیابی اثر دما بر فعالیت اوره‌آز آزاد و نانو

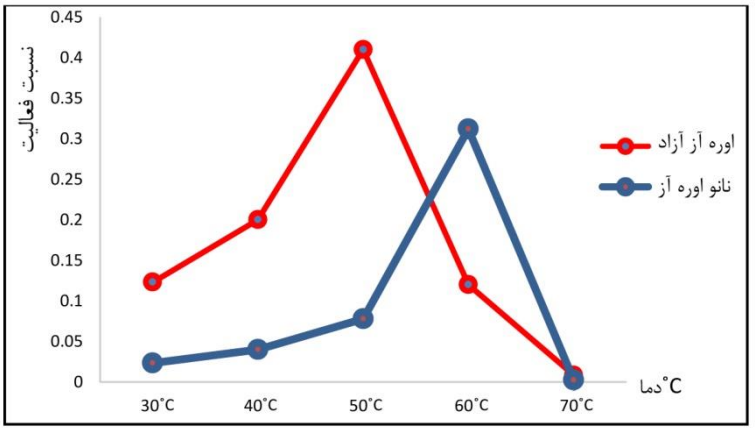
آنزیم اوره‌آز آزاد و نانو بعد از قرار گرفتن در دماهای مختلف به روش برتلوت تعیین فعالیت شدند؛ اما از آنجایی‌که فعالیت کل اوره‌آز آزاد بیشتر از نانو اوره‌آز بود، لذا، مقایسه فعالیت ویژه آن‌ها در دمای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتیگراد تعیین گردید و باهم مقایسه شدند. پس از آنکه اوره‌آز آزاد و نانو به روش برتلوت تعیین فعالیت شدند، درصد افزایش فعالیت ویژه بر اثر نانو کردن نیز محاسبه شد (جدول ۲، شکل‌های ۸ تا ۱۱).

جدول ۲ - اثر دما بر فعالیت اوره‌آز آزاد و نانو

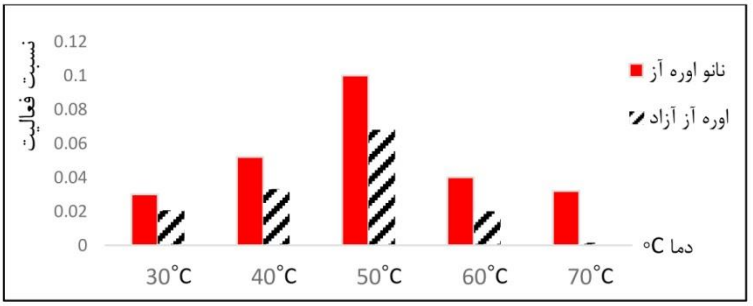
نمونه	غلظت (mg/ml)	دما (°C)	فعالیت کل	فعالیت ویژه	افزایش فعالیت ویژه در اثر نانو کردن (٪)
اوره‌آز آزاد	۶	۳۰	۰/۱۲۳	۰/۰۲۰۵	ـــــ
		۴۰	۰/۲۰	۰/۰۳۳	
		۵۰	۰/۴۱	۰/۰۶۸	
		۶۰	۰/۱۲	۰/۰۲	
		۷۰	۰/۰۰۸۲	۰/۰۰۱۴	
نانو اوره‌آز	۰/۷۷۴	۳۰	۰/۰۲۳۴	۰/۰۳۰	۷۲/۷
		۴۰	۰/۰۴۰	۰/۰۵۲	۹/۵
		۵۰	۰/۰۷۸	۰/۱۰	۷/۸۰
		۶۰	۰/۳۱۲	۰/۰۴۰	۱۰۰
		۷۰	۰/۰۲۵	۰/۰۳۲	۲۱۸/۷۱



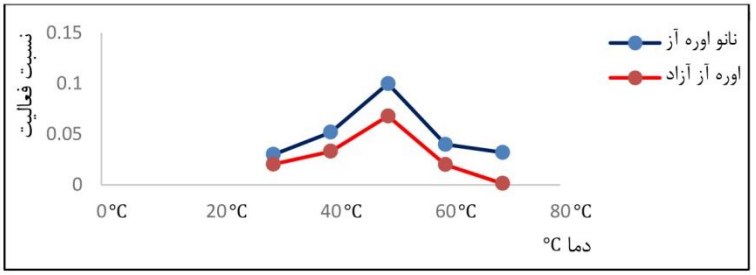
شکل ۸- نمودار ستونی اثر دما بر فعالیت کل اوره‌آز آزاد نانو اوره آز



شکل ۹- نمودار خطی اثر دما بر فعالیت کل اوره‌آز آزاد نانو اوره آز



شکل ۱۰- نمودار ستونی اثر دما بر فعالیت ویژه اوره آز آزاد و نانو اوره آز



شکل ۱۱ – نمودار خطی اثر دما بر فعالیت ویژه اوره‌آز آزاد و نانو اوره آز

فعالیت ویژه نانواوره آز در هر دما، بیشتر از فعالیت ویژه اوره‌آز آزاد در همان دما می‌باشد، لذا، افزایش نسبی درصد فعالیت را نشان می‌دهد. دمای بهینه فعالیت ویژه هر دو آنزیم در ۵۰ درجه سانتیگراد است. اما دمای بهینه فعالیت کل اوره‌آز آزاد در ۵۰ درجه سانتیگراد و نانو ذرات اوره‌آز در

۶۰ درجه سانتیگراد می‌باشد. در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد، اوره‌آز آزاد حدود ۲ درصد و نانو اوره‌آز حدود ۳۲ درصد از فعالیت خود را حفظ کردند.

٤. بحث

انتخاب روش بهینه جهت پایدارسازی آنزیم‌ها از دیرباز مورد توجه و هدف پژوهشگران بیولوژیست بوده است. در همین راستا مطالعات متعددی انجام‌گرفته است؛ مانند اصلاح شیمیایی، مهندسی پروتئین و تثبیت و غیره. هرکدام از این روش‌ها ضمن انجام پایدارسازی، معایبی هم دارند. در سال ۱۹۹۹ میلادی مطالعه‌ای با استفاده از روش اصلاح شیمیایی و با هدف پایدارسازی آنزیم با افزودن گروه‌های عاملی یا پلیمرها به سطح مولکول‌های آنزیم جهت تغییر خواص سطحی انجام شد (۳۲). همچنین مطالعاتی با هدف حصول یك ساختار ذاتاً پایدارتر و با استفاده از مهندسی پروتئین و شیوه‌های زیست مولکولی، مانند تغییر مستقیم و یا تغییر در سایت فعال اسیدهای آمینه یك آنزیم انجام گرفت (۳۳)؛ اما این تکنیك‌ها اغلب شامل واکنش‌های مستعد خطای زنجیره پلیمراز هستند (EPPCR) و نوترکیبی در شرایط آزمایشگاهی وقت‌گیر، گران و خسته‌کننده است (۳۴). بنابراین، بی‌حرکتی آنزیم در سطح ماکرو / میکرو نیز به‌طور معمول موردنیاز است (۳۵، ۳۶). پژوهشی در سال ۲۰۰۶ میلادی، با هدف پایدارسازی آنزیم و با استفاده از روش تثبیت آنزیم انجام شد (۳۳). همچنین نتایج پژوهشی در سال ۲۰۱۰ نشان داد که آنزیم اوره‌آز تثبیت‌شده به مدت طولانی در دمای اتاق قابل نگهداری است (۳۷).

روش تثبیت آنزیم به علت سهولت بازیابی و احیای کاتالیست، امکان عملیات پیوسته، و سادگی تلخیص محصولات موردتوجه است؛ اما علاوه‌بر مشکل از دست دادن فعالیت آنزیم در طول تثبیت، معمولاً کارایی زیست کاتالیستی ضعیف آنزیم تثبیت‌شده، سبب کاهش پیشبرد استفاده از فرایندهای زیستی نسبت به فرایندهای شیمیایی شده است. بهبود کارایی زیست کاتالیستی با ساخت ساختارهایی به‌عنوان حامل‌هایی برای تثبیت آنزیم امکان‌پذیر است (۱۵، ۳۸). فناوری نانو در بهبود روش‌های تثبیت آنزیم بسیار مؤثر بوده است. کاهش اندازه مواد حامل آنزیم سبب بهبود بازده و کارایی آنزیم تثبیت‌شده می‌شود. در حالت اتصال به سطح، ذرات ریزتر می‌توانند سطح بزرگ‌تری برای اتصال آنزیم‌ها فراهم کنند، در نتیجه، بارگذاری آنزیم در واحد جرم ذرات افزایش می‌یابد (۳). لذا، پژوهشگران تلاش گسترده‌ای را در استفاده از نانو فناوری جهت پایدارسازی آنزیم آغاز کرده‌اند. در ایران نیز مطالعاتی در این زمینه صورت گرفته است. به‌عنوان

مثال میرزا بابایی (۲۰۱۲) در پژوهشی تثبیت آنزیم اوره‌آز بر روی نانو فیبرکیتوزان/پلی وینیل الکل تهیه‌شده به روش الکتروریسی را مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که پایداری و فعالیت آنزیم تثبیت‌شده، نسبت به آنزیم آزاد افزایش چشمگیری داشته است (۳۹).

نتایج بررسی‌ها نشان داده است زمانی که نانو ذرات آنزیمی مستقیماً بر روی یك الکترود تثبیت می‌شوند، عملکرد بهبودیافته‌ای را هم نسبت به جذب مستقیم آنزیم بر روی سطوح عمده فلزی و هم نسبت به زمانی که ابتدا آنزیم‌ها بر روی نانو ذرات فلزی جذب‌شده و سپس این نانو ذرات بر روی سطوح قرار می‌گیرند، نشان می‌دهد (۱۴).

با توجه به اهمیت و کاربرد نانو ذرات آنزیمی در پایدارسازی و بهبود عملکرد بیوسنسورها، تحقیقاتی در زمینه نانو ذرات آنزیمی صورت گرفته است. نتایج پژوهش‌ها حاکی از آن است که تولید نانو ذرات آنزیمی با استفاده از ۴ روش امولسیون‌سازی، روش انباشتگی ساده، روش حلال‌زدایی و ایجاد اتصالات عرضی در امولسیون w/o صورت می‌گیرد که از بین آن‌ها روش حلال‌زدایی از بهترین و ساده‌ترین روش‌های سنتز نانو ذرات آنزیمی است. به همین علت توسط پژوهشگران زیادی جهت تولید نانو ذرات آنزیمی به‌کار گرفته شده است. جیکار و پوندیر[1] (۲۰۱۸) در پژوهشی نانو ذرات[2] اوره‌آز گرفته شده از جك لوبیا را با استفاده از حلال‌زدایی، عملیاتی کردند. نانو ذرات آنزیمی[3] با ماندگاری طولانی‌تر، از مولکول‌های آنزیم آزاد فعال‌تر و پایدار بود (۱۴).

به‌علاوه، روش حلال‌زدایی به دلیل مزیت ذکر شده، برای تهیه نانو ذرات چندین آنزیم مانند پراکسیداز ترب‌کوهی (۴۰، ۴۱)، گلوکز اکسیداز از آسپرژیلوس نایجر (۲۳)، کلسترول اکسیداز از گونه میکروارگانیسم (۳۱) و اوریکاز از گونه کاندیدا بیان‌شده دراشرشیاکلی (۲۴) به‌کار برده شده است (۲۰). نکته مهم در تولید نانو ذرات آنزیمی به روش حلال‌زدایی نوع، مقدار، زمان و ترتیب مخلوط کردن مواد است. بررسی‌ها نشان داد که اکثر پژوهشگران پروتکل به‌کار برده شده در این پژوهش را که از پروتکل جیکار و پوندیر گرفته شده است، جهت تولید نانو ذرات آنزیمی به روش حلال‌زدایی استفاده کرده‌اند. البته این پروتکل با تغییرات جزئی در روش جیکار و پوندیر، برای نتیجه مطلوب‌تر، به‌عنوان پروتکل نهایی انتخاب شد.

1. Jakhar & Pundir
2. NPS
3. ENPS

هدف پژوهش حاضر تولید نانو ذرات اوره‌آز با استفاده از فناوری نانو و بررسی افزایش فعالیت و پایداری اوره‌آز بود. تولید نانو ذرات اوره‌آز با استفاده از روش حلال‌زدایی انجام گرفت و سپس نانو ذرات اوره‌آز و اوره‌آز آزاد توسط طیف‌سنجی مرئی- فرابنفش، طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و میکروسکوپ الکترونی روبشی مشخصه‌یابی شده و با هم مقایسه شدند. نتایج حاصل در هر سه مورد، تشکیل نانو ذرات اوره‌آز را تأیید کرد.

سپس فعالیت کل اوره‌آز آزاد و نانو اوره‌آز با استفاده از روش برتلوت تعیین گردید و با هم مقایسه شدند. نتایج حاصل نشان داد که فعالیت کل اوره‌آز آزاد (۰/۰۱۷) بیشتر از نانو اوره‌آز (۰/۰۰۳۲۵) بود؛ حال آنکه باید فعالیت نانو اوره‌آز بیشتر بود. بنابراین، عوامل احتمالی مؤثر در کاهش فعالیت کل نانو اوره‌آز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دو عامل احتمالاً در کاهش فعالیت آن مؤثر بوده است:

اول، اوره‌آز نسبت به دمای بالاتر از $4^{\circ}C$ حساس بوده، دناتوره شده و مقداری از فعالیت خود را از دست می‌دهد. بنابراین، سعی شد مراحل فرایند نانو کردن در حمام یخ و در دمای $4^{\circ}C$ انجام شود؛ اما هنگام ورتکس، سانتریفیوژ و سونیکه کردن برای دقایقی امکان حفظ دمای $4^{\circ}C$ نبود. لذا، احتمالاً همین زمان کوتاه نیز باعث کاهش فعالیت نانو اوره‌آز شده باشد.

عامل دوم، احتمال هدر رفت و عدم نانو شدن تعدادی از مولکول‌های اوره‌آز آزاد بود، به همین دلیل اوره‌آز آزاد و نانو اوره‌آز به روش لوری تعیین غلظت شد. نتایج نشان داد که غلظت نانو اوره‌آز (۰/۷۷۴mg/ml) کمتر از اوره‌آز آزاد (۶mg/ml) است. این نکته مؤید عدم نانو شدن تعدادی از مولکول‌های اوره‌آز آزاد بود. لذا، احتمالاً دو عامل ذکر شده باعث کاهش فعالیت کل نانو اوره‌آز نسبت به اوره‌آز آزاد شده است.

به همین دلیل فعالیت ویژه اوره‌آز آزاد و نانو اوره‌آز تعیین گردید و با هم مقایسه شدند. نتایج حاصل نشان داد که فعالیت ویژه نانو اوره‌آز (۰/۰۰۴۱) خیلی بیشتر از اوره‌آز آزاد (۰/۰۰۲۸) بود؛ زیرا غلظت نانو اوره‌آز تقریباً یک هشتم غلظت اوره‌آز آزاد بود، در حالی‌که فعالیت ویژه آن تقریباً دو برابر نانو اوره‌آز آزاد شد.

همچنین جهت بررسی پایداری حرارتی، اوره‌آز آزاد و نانو در شرایط یکسان، به مدت ۱۰ دقیقه در دماهای۴۰، ۳۰، ۵۰، ۶۰ و۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. نتایج نشان داد که فعالیت ویژه نانو اوره‌آز در هر دما بیشتر از فعالیت ویژه اوره‌آز آزاد در همان دما است که نشان‌دهنده افزایش نسبی درصد فعالیت نانو اوره‌آز می‌باشد. علاوه‌بر افزایش فعالیت ویژه نانوذرات، فعالیت کل آن نیز

در هر دما بیشتر از فعالیت کل اوره‌آز آزاد در همان دما است که نشان‌دهنده افزایش نسبی درصد فعالیت نانو اوره‌آز می‌باشد. دمای بهینه فعالیت ویژه هر دو آنزیم در ۵۰ درجه سانتیگراد است. همچنین دمای بهینه فعالیت کل اوره‌آز آزاد در۵۰ درجه سانتیگراد می‌باشد، اما دمای بهینه نانو اوره‌آز در اثر حرارت دادن افزایش یافته و به۶۰ درجه سانتیگراد رسیده است. در دمای۷۰ درجه سانتیگراد، آنزیم آزاد حدود ۲ درصد و نانو آنزیم حدود ۳۲ درصد از فعالیت خود را حفظ کردند که بیانگر افزایش پایداری گرمایی نانو آنزیم اوره‌آز نسبت به اوره‌آز آزاد می‌باشد.

امید است در آینده با بهبود روش‌ها، راندمان تولید بالا رود. همچنین پژوهشگران تأثیر نانو کردن را در برطرف کردن سایر محدودیت‌های آنزیم و نیز در پایدارسازی سایر آنزیم‌ها و در صورت عدم مطالعه توسط محققین گذشته مورد مطالعه و پژوهش قرار دهند.

۵. نتیجه‌گیری

با فرایند نانو کردن و تولید نانو ذرات آنزیمی، اهداف موردنظر که شامل افزایش فعالیت و پایدارسازی حرارتی آنزیم بود، در این پژوهش بدست آمد. این نکته می‌تواند نشان‌دهنده بهبود کارایی آنزیم در صنعت و پزشکی و... باشد.

٦. تقدیر و تشکر

محققان این پژوهش از همکاران و کارکنان محترم بخش بیوشیمی و نیز مسئولین آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم برای همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*. 2015; 59: 1.
2. Lizeng G & Xiyun Y. Nanozymes: an emerging field bridging nanotechnology and biology. *Science China Life Sciences*. 2016; 59(4): 400-2.
3. Khosravi A, Vossoughi M, Sharokhian S & Alemzadeh I (eds). *Synthesis and Stability evaluation of HRP Single Enzyme Nanoparticles*. Proceedings of International Conference on Nanostructures (ICNS4); 2012.
4. Cuesta SM, Rahman SA, Furnham N & Thornton JM. The classification and evolution of enzyme function. *Biophysical journal.* 2015; 109(6): 1082-6.
5. Sheldon RA & van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*. 2013; 42(15): 6223-35.
6. Kim J, Jia H & Wang P. Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology advances.* 2006; 24(3): 296-308.
7. Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F & Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2015; 29(2): 205-20.
8. Leong MK. *Green Synthesis, Characterization of Copper (II) Oxide Nanoparticles and Their Photocatalytic Activity*. UTAR; 2016.
9. Ghosh Chaudhuri R & Paria S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chemical reviews.* 2012; 112(4): 2373-433.
10. Olveira S, Forster SP & Seeger S. Nanocatalysis: academic discipline and industrial realities. *Journal of Nanotechnology*. 2014. https://doi.org/10.1155/2014/324089
11. Koo OM, Rubinstein I & Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. 2005; 1(3): 193-212.
12. NH K. *Synthesis Characterization and Application of Nickel Nanoparticles.* Jamshoro-PAKISTAN.: Doctoral dissertation; 2013.
13. Kundu N, Yadav S & Pundir C. Preparation and characterization of glucose oxidase nanoparticles and their application in dissolved oxygen metric determination of serum glucose. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2013; 13(3): 1710-6.
14. Jakhar S & Pundir C. Preparation, characterization and application of urease nanoparticles for construction of an improved potentiometric urea biosensor. *Biosensors and Bioelectronics.* 2018; 100: 242-50.
15. Kim J, Grate JW & Wang P. Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in biotechnology*. 2008; 26(11): 639-46.
16. Yadav N, Narang J, Chhillar AK & Pundir CS. Chapter Six - Preparation, characterization, and application of enzyme nanoparticles. *Methods in Enzymology.* 2018; 609: 171-196.
17. Cuenot S, Frétigny C, Demoustier-Champagne S & Nysten B. Surface tension effect on

the mechanical properties of nanomaterials measured by atomic force microscopy. *Physical Review B*. 2004; 69(16): 165410.
18. Karim MN. *Modulating the NanoZyme activity for antibacterial and sensing applications.* RMIT University; 2019.
19. Scheffel U, Rhodes BA, Natarajan T & Wagner HN. Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *Journal of Nuclear Medicine*. 1972; 13(7): 498-503.
20. Pundir CS. *Enzyme nanoparticles: preparation, characterisation, properties and applications.* William Andrew; 2015.
21. Sailaja AK, Amareshwar P & Chakravarty P. Different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011; 3(2): 45-50.
22. Liu G, Lin Y, Ostatná V & Wang J. Enzyme nanoparticles-based electronic biosensor. *Chemical communications*. 2005; 27: 3481-3.
23. Sharma S, Shrivastav A, Gupta N & Srivastava S (eds). *Amperometric biosensor: increased sensitivity using enzyme nanoparticles*. 2010 international conference on nanotechnology and biosensors, IPCBEE; 2011: Citeseer.
24. Chauhan N, Kumar A & Pundir C. Construction of an uricase nanoparticles modified Au electroe for amperometric determination of uric acid. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014; 174(4): 1683-94.
25. Kappaun K, Piovesan AR, Carlini CR & Ligabue-Braun R. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties–A review. *Journal of advanced research*. 2018; 13: 3-17.
26. Benini S, Rypniewski W, Wilson K, Ciurli S & Mangani S. The complex of Bacillus pasteurii urease with β-mercaptoethanol from X-ray data at 1.65-Å resolution. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 1998; 3(3): 268-73.
27. Fong YH, Wong HC, Yuen MH, Lau PH, Chen YW & Wong K-B. Structure of UreG/UreF/UreH complex reveals how urease accessory proteins facilitate maturation of Helicobacter pylori urease. *PLoS biology*. 2013; 11(10): e1001678.
28. Khan M, Javed MM, Zahoor S & HAQ U. Kinetics and thermodynamic study of urease extracted from soybeans. *Biologia*. 2013; 59(1): 7-14.
29. Bzura J & Koncki R. A mechanized urease activity assay. *Enzyme and microbial technology*. 2019; 123: 1-7.
30. Boer JL & Hausinger RP. Klebsiella aerogenes UreF: identification of the UreG binding site and role in enhancing the fidelity of urease activation. *Biochemistry*. 2012; 51(11): 2298-308.
31. Chawla S, Rawal R & Pundir C. Preparation of cholesterol oxidase nanoparticles and their application in amperometric determination of cholesterol. *Journal of nanoparticle research*. 2013; 15(9): 1-9.
32. DeSantis G & Jones JB. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Current Opinion in Biotechnology.* 1999; 10(4): 324-30.
33. Kim J, Grate JW & Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical*

engineering science. 2006; 61(3): 1017-26.
34. Ding S, Cargill AA, Medintz IL & Claussen JC. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Current opinion in biotechnology*. 2015; 34: 242-50.
35. Ansari SA & Husain Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology advances*. 2012; 30(3): 512-23.
36. Palmer T & Bonner PL. *Enzymes: biochemistry, biotechnology, clinical chemistry*. Elsevier; 2007.
37. Pithawala K, Mishra N & Bahadur A. Immobilization of urease in alginate, paraffin and lac. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2010; 75(2): 175-83.
38. Brady D & Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology letters*. 2009; 31(11): 1639-50.
39. Mirza Babaei S. *Stabilization of urease enzyme on chitosan/polyvinyl alcohol nanofiber prepared by electrospinning method.* Master Thesis. University of Tehran, 2012. [in persian]
40. Shen Y, Zhang Y, Zhang X, Zhou X, Teng X, Yan M & et al. Horseradish peroxidase-immobilized magnetic mesoporous silica nanoparticles as a potential candidate to eliminate intracellular reactive oxygen species. *Nanoscale*. 2015; 7(7): 2941-50.
41. Men D, Zhang T-T, Hou L-W, Zhou J, Zhang Z-P, Shi Y-Y & et al. Self-assembly of ferritin nanoparticles into an enzyme nanocomposite with tunable size for ultrasensitive immunoassay. *Acs Nano*. 2015; 9(11): 10852-60.