پیامد کاربرد مانده های گیاهی تازه ذرت بر جذب‌سطحی، بی‌جنبش شدن و کارایی آنزیم سلولاز در خاک

محبوبه صفری سنجانی[1]، علی اکبر صفری سنجانی[2]
1- دانشجو کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی همدان
2-دانشیار گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی همدان
safari_1365@yahoo.com

چکیده
یکی از راه‌های ماندگاری و پایداری آنزیم‌ها در خاک جذب و بی‌جنبش سازی آنها بر روی نگهدارنده‌های آلی و کانی آن است.در این پژوهش کارکرد مانده های گیاهی تازه ذرت بر فرایندهای جذب‌سطحی و بی‌جنبش شدن سلولاز در یک خاک کشاورزی بررسی شد. اگر چه کاربرد مانده های گیاهی تازه ذرت گنجایش جذب‌سطحی و بی‌جنبش شدن سلولاز در خاک را افزایش داد ولی پیامد سودمند افزودن مانده های گیاهی تازه ذرت بر کارایی آنزیم سلولاز در خاک نمایانتر بود. افزایش درصد مانده های گیاهی تازه ذرت در خاک مایه کاهش افت کارایی ویژه سلولاز بیجنبش شده در خاک شد. از آنجایی که ساخت و رها سازی آنزیم سلولاز در خاک اندک است، افزایش مانده های گیاهی تازه ذرت در خاک نه تنها مایه افزایش جذب‌سطحی و بی‌جنبش شدن سلولاز در خاک می شود بلکه مایه افزایش کارایی ویژه این آنزیم در خاک نیز می شود.
واژه‌های کلیدی : بی‌جنبش شدن، جذب‌سطحی، سلولاز، مانده های گیاهی تازه ذرت .

مقدمه
آنزیم‌ها کاتالیزورهای بیولوژیک هستند که در بیوتکنولوژی و صنایع دارویی، غذایی، چوب، کاغذ، پزشکی، کشاورزی، کاهش آلودگی‌های آب و خاک و مانند آنها کاربرد دارند. از این گروه می‌توان آنزیم‌های زایلاناز، آلفا-آمیلاز، لاکاز، لیگنین و منگنز پراکسیداز، اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز، بتا-گلوکوزیداز و مانند آنها را یادآور شد. گذشته از شمار اندکی از آنزیم‌ها مانند نیتروژناز و دهیدروژناز، بیشتر آنزیم‌ها درخاک ویژگی آنزیم‌های رها از یاخته و بی‌زیا (abiotic) را دارند. این آنزیم‌ها با جداشدن از یاخته‌های زنده، رها شدن از یاخته‌های‌پاره‌شده و مرده یا به همراه تکه‌های یاخته‌های مرده به محلول خاک می‌رسند. گفته می‌شود گروه بزرگی از آنزیم‌ها مانند پروتئازها و نوکلئازها، تنها برای زمانی کوتاه (یک هفته) در خاک کارایی دارند و به تندی ساختمان خود را از دست داده و فروزینه می‌شوند. ولی آزمایش‌ها نشان می‌دهد که برخی از آنزیم‌ها بیرون از یاخته‌های‌زنده در درون ماتریکس خاک از پایداری خوبی برخوردارند (دیک 1997؛ گینفردا و بولاغ 1994؛ فوزی و همکاران 1989؛ سینایبورگ و لینکنینز 1988). این آنزیم‌ها می‌تواند در درون و برون لایه‌های کانی‌های رسی خاک جذب سطحی شده و یا با کلوییدهای هیومیک و آلی خاک از راه‌های جذب‌سطحی، بدام افتادن و یا هم‌پلی‌مره شدن با آنها، کمپلکس شده و از این راه پایدارتر شوند (گوسین و همکاران 1993؛ میست 1993). آنزیم‌ها با پیوندهای یونی و یا هیدروژنی به کلوییدهای آلی و کانی خاک می‌پیوندند. ولی تنها بخش کوچکی از کارایی آنزیمی خاک مربوط به این گروه از آنزیم‌ها است. پیوند مهم دیگر آنزیم‌ها در خاک پیوند کووالانت آنها با مواد هیومیک است. گفته می‌شود کار گروهی این آنزیم‌ها، برای ریزجانداران جذب شده به موادهیومیک بسیار سودمند است. کانی‌های رسی خاک (به ویژه گروه اسمکتایت‌ها) و مواد آلی آن می‌توانند آنزیم‌های خاک را جذب و نگهداری کرده و به پایداری آنها در خاک بیافزایند. نشان داده شده است که این فرآیند از فروزینگی

میکروبی و کار آنزیم‌های پروتئولیتیک یا آبکافت پروتئین‌های آنزیمی خاک جلوگیری می‌کند (ایوزی و طباطبایی 1990؛ دیک 1997؛ گینفردا و بولاغ 1994؛ سینایبورگ و لینکنینز 1988).
پژوهش های پیشین نشان داده است که جذب آنزیم سلولاز در خاک تنها بر رویه بیرونی دانه های کانی خاک رخ می دهد و گنجایش دانه های کانی خاک برای جذب آن به اندازه یا ریزی دانه ها و نیز رویه ویژه آنها وابسته است (صفری سنجانی و همکاران، 2005). همچنین گنجایش جذب و بی جنبش شدن آنزیم سلولاز در خاک هایی که مواد آلی، درصد رس و کربنات کلسیم بیشتری دارند، بالاتر است (صفری سنجانی و حسین پور، 2006). هدف از این پژوهش شناخت چگونگی کارکرد مانده های گیاهی تازه ذرت در فرایند های جذب و بی جنبش شدن آنزیم سلولاز در خاک است. در این پژوهش با نمونه برداری یک خاک با بافت لومی و کاربرد درصد های گوناگونی از مانده های گیاهی تازه ذرت، تلاش شده است که شناخت بیشتری از پیامد های سودمند و یا زیانبار اینگونه مواد آلی بر جذب‌سطحی، بی‌جنبش شدن و کارایی آنزیم سلولاز در خاک بدست آید.

مواد و روش

از ژرفای 30-0 سانتی‌متری خاک زمین های پیرامون گلخانه دانشگاه بوعلی سینا به روش مرکب نمونه برداری شد. نمونه را در هوا خشک کرده، با چکش چوبی خرد و از الک 2 میلیمتری برای شناسایی ویژگی های آن گذرانده شد (جدول 1). در این پژوهش مواد آلی خاک به کمک آب اکسیژنه از آن زدوده شد. سپس خاک به کمک محلول 1 نرمال کلرید کلسیم هم‌یون (homoionized) گردید. پس از آن درصد های گوناگونی (0 تا 100 درصد) از مانده های گیاهی تازه ذرت در خاک هم‌یون شده تیمار شد. برای جذب و بی‌جنبش کردن سلولاز بر روی این خاک ها (نگهدارنده‌ها)، سوسپانسیونی 1% از خاک سترون شده در آب مقطر آماده شد. برای جلوگیری از رشد ریزجاندارن در سوسپانسیون این نگهدارنده‌ها اندکی تولوئن (غلظت 0/1 %) به هر یک از آنها افزوده شد. پس از فراآوادهی و اولتراسونیفیکاسیون[1] سوسپانسیون نگهدارنده‌ها، آنزیم سلولاز (خریداری شده از شرکت سیگما) با غلظت 0/14 میلی گرم پروتئین در میلی لیتر به آنها افزوده شد. نمونه‌ها برای 1 ساعت تکان داده شدند تا فرآیند جذب آنزیم‌ها به تعادل برسد. سپس هر نمونه سانتریفوژ شد. پروتئین جذب نشده در محلول رویین به روش برادفورد (1976) اندازه‌گیری و اندازه پروتئین جذب سطحی شده از فرمول توماس و همکاران[2] برآورد گردید (نایدجا و همکاران 1997).

$$Qa=(Co-Ce)V/W$$

که در آن Qa :) اندازه پروتئین جذب سطحی شده بر روی یک وزن از جذب کننده(mg/mg), Co) غلظت نخستین پروتئین(mg/ml)، Ce) غلظت تعادلی پروتئین(mg/ml), V) حجم محلول (ml) و W) وزن جذب کننده (mg) است.

برای بررسی توان نمونه‌ها در نگهداری و بی‌جنبش کردن پروتئین و آنزیم‌های سلولولیتیک، بخش ته‌نشین شده از آزمایش‌پیشین با آب مقطر تا جایی شسته شد که دیگر هیچ نشانی از پروتئین و آنزیم‌ها در محلول رویین آنها نباشد. پروتئین شسته شده در آب رویین سوسپانسیون اندازه‌گیری شد.
پس از شستشوی آنزیم‌ها، سوسپانسیونی از کمپلکس نگهدارنده-آنزیم (بی‌جنبش شده) ساخته شد. فعالیت آنزیم سلولاز بی‌جنبش شده بر روی نگهدارنده‌های آنزیم در خاک به کمک اسپکتروفوتومتر و به روش‌مندل و وبر[3] (1969) ارزیابی گردید. سوبسترای بکار رفته برای ارزیابی کارایی آنزیم آویسل بود. کارایی آنزیم با محاسبه میکرومول قندهای

[1] Ultrasonification
[2] Thomas et al, 1983
[3] Mandel and Weber

کاهنده آزاد شده در یک دقیقه برای یک میلی لیتر از سوسپانسیون نگهدارنده-آنزیم (U/ml)، یا یک گرم از نگهدارنده (U/g soil) و یا یک میلی گرم از آنزیم بی جنبش شده (کارایی ویژه، (U/mg)) برآورد و گزارش گردید.

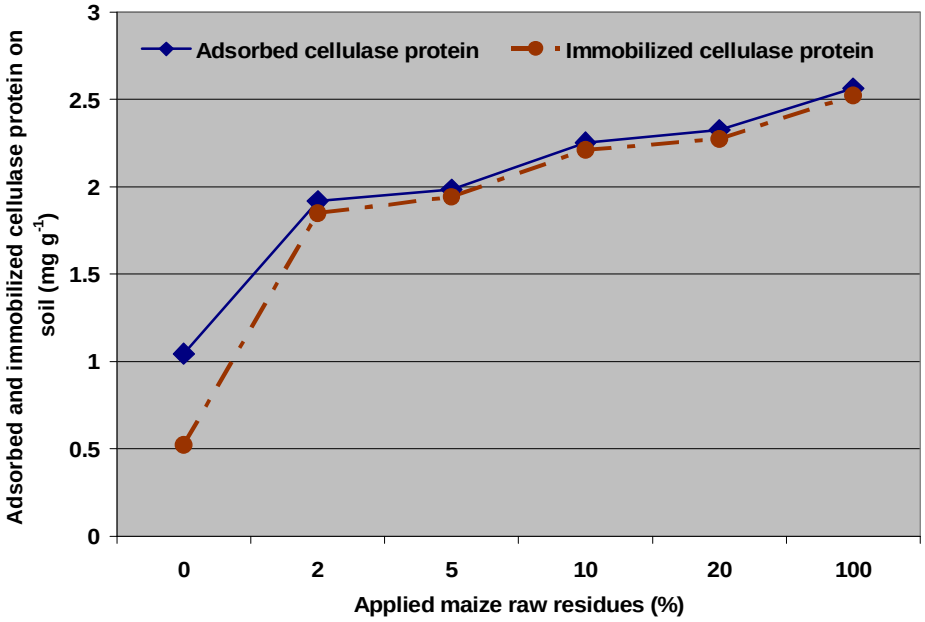
نتایج و بحث

جدول 1 برخی از ویژگی های خاک بکاررفته در این پژوهش را نشان می دهد. اندازه شن، سیلت و رس خاک به ترتیب 48، 31 و 21 درصد بود و به کمک مثلث بافت خاک، بافت آن لوم است. خاک آزمایش شده آهکی و درصد کربنات کلسیم معادل آن 3/7 درصد بود. رسانایی الکتریکی آن 0/12 دسی‌زیمنس بر متر و شوری این خاک پایین است. این خاک پ-اچ برابر 7/9 داشته و از خاک‌های خنثی تا کمی قلیایی است. گنجایش تبادل کاتیونی این خاک 23/8 سانتی‌مول بار بر کیلوگرم خاک خشک است. همه ازت و کربن آلی خاک به ترتیب 2/11 و 21/34 گرم بر کیلوگرم خاک است. فسفر فراهم و پتاسیم فراهم این خاک به ترتیب 77/16 و 186 میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک است.

جدول 1- برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک بکار رفته در پژوهش

ویژگی خاک	واحد	اندازه	ویژگی خاک	واحد	اندازه
بافت	-	لوم	رسانایی الکتریکی	$dS\ m^{-1}$	0/12
شن	%	48	گنجایش تبادل کاتیونی	$Cmol\ charge\ kg^{-1}$	23/8
سیلت	%	31	همه ازت	$g.kg^{-1}$	2/11
رس	%	21	C/N	-	10/11
همه کربن آلی	$g.kg^{-1}$	21/34	فسفر فراهم	$mg\ kg^{-1}$	77/16
کربنات کلسیم معادل	%	3/7	پتاسیم فراهم	$mg\ kg^{-1}$	186
پ-اچ	-	7/9			

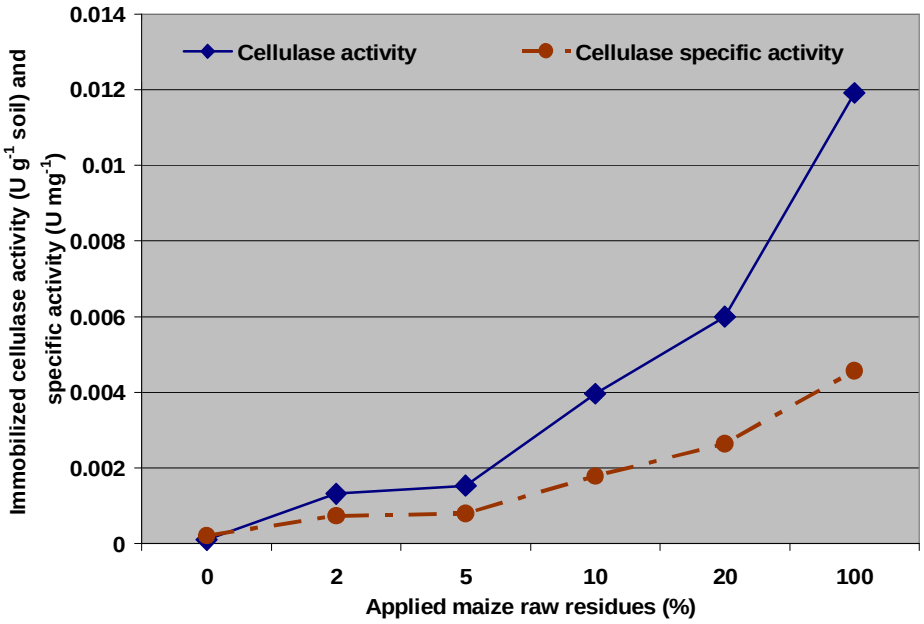
نمودار 1 پروتئین جذب‌سطحی شده و بی جنبش شده در خاک مواد آلی زدایی شده را نشان می‌دهد. کاربرد 2 درصد مانده های گیاهی تازه ذرت در خاک مایه افزایش گنجایش خاک در جذب و بی جنبش کردن آنزیم سلولاز شد. با افزایش درصد مانده های گیاهی تازه ذرت بکار رفته در خاک اندازه پروتئین سلولاز جذب و بیجنبش شده افزایش یافت.



نمودار 1- پیامد کاربرد مانده های گیاهی تازه ذرت بر جذب سطحی و بیجنبش شدن آنزیم سلولاز در یک خاک مواد آلی زدایی شده

پیامد سودمند کاربرد مانده های گیاهی تازه ذرت در نگهداری سلولاز جذب شده در خاک در نمودار 1 بخوبی نمایان است. جدایی میان نمودارهای جذب سطحی و بیجنبش شدن سلولاز نشان دهنده اندازه آنزیمی است که پیوند سست تری با دانه های جامد خاک داشته و هنگام شستشو با آب از آن جدا شده است که این اندازه با کاربرد 2 درصد از مانده های گیاهی تازه ذرت نیز بسیار کاهش یافته است. نزدیک شدن دو نمودار نشان می دهد که افزودن اینگونه مانده های آلی به خاک می تواند از جداشدن آنزیم های جذب شده و آبشویی آنها در خاک جلوگیری کند. در بررسی چگونگی جذب سلولاز در خاک، آویسل و کانی های آن صفری سنجانی و همکاران (1995) دریافتند که درصد آنزیم جداشده از روی آویسل در برابر کانی های خاک بسیار کمتر است و پیوند سلولاز بر بستره آلی آن (آویسل) بسیار نیرومندتر از پیوند آن با کانی های خاک است.

داده های بدست آمده از ارزیابی کارایی آنزیم سلولاز بی‌جنبش شده در خاک در نمودار 2 نشان داده شده است. آشکار است که با افزایش درصد مانده های گیاهی تازه ذرت بکار رفته در خاک به کارایی سلولاز بیجنبش شده در خاک به اندازه چشم گیری افزوده شده است. گزارش شده است که بی‌جنبش‌سازی آنزیم‌ها می‌تواند سنیتیک و دیگر ویژگی‌های آنزیم‌ها را دگرگون کرده و در بیشتر موارد مایه کاهش کارایی ویژه آنزیم ها شود. این کاهش می‌تواند وابسته به دگرگونی آرایش مولکولی آنزیم‌ها، اثرهای استری، و یا دگرگونی فرآیند پخشیدگی بستره و فرآورده آنزیمی باشد (گینفردا و بولاغ 1994، گوسین و همکاران 1993؛ میست 1993؛ سینایبورگ و لینکنینز 1988).



نمودار2- پیامد کاربرد مانده های گیاهی تازه ذرت بر کارایی و کارایی ویژه آنزیم سلولاز در یک خاک مواد آلی زدایی شده

صفری سنجانی (1379) با اندازه گیری کارایی آنزیم های بی جنبش شده بر روی برخی مانده های کشاورزی، آویسل، برخی از کانی های رسی و خاک نشان داد که افت کارایی آنزیم های بی جنبش شده بر روی مواد آلی (مانده های کشاورزی و آویسل) بسیار کمتر از آنزیم های بی جنبش شده بر روی مواد کانی (کانی های رسی و خاک) است. در میان آنزیم های بی جنبش شده بر روی نگهدارنده های گوناگون، کارایی آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده بر روی‌خاک کمترین است. در این پژوهش کارایی ویژه آنزیم سلولاز بیجنبش شده در خاک با افزایش درصد مانده های گیاهی تازه ذرت در خاک افزایش یافته است. کارایی ویژه نشان دهنده کارایی واحد وزن آنزیم بی جنبش شده در خاک است. این نشان می دهد که افت کارایی سلولاز پس از بیجنبش شدن بر مواد آلی خاک بسیار کمتر از افت کارایی آن پس از بیجنبش شدن بر کانی های آن است. بنابراین بیشتر کارایی آنزیم سلولاز در خاک وابسته به آنزیم هایی است که بر روی مواد آلی آن جذب سطحی و بی جنبش شده اند.

منابع

صفری سنجانی ع.ا. 1379. فروزینگی زیستی برخی از مانده‌های کشاورزی و ارزیابی کارایی آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک‌قارچ‌ها در خاک، پایان نامه دکترا گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Dick R.P. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health, In: PankhurstC.E., B.M., Doube and V.V.S.R. Gupta (Ed.) Biological indicators of soil health, Cab International: 121-150.

Eivazi F. and M.A. Tabatabai. 1990. Factors affecting glucosidases and galactosidases activities in soils, Soil Biol. Biochem. 22: 891-897.

Fusi P., G.G. Ristori, L. Calamai and G. Stotzky. 1989. Adsorption and binding of protein on clean (homoionic) and dirty (coated with Fe oxyhydroxides) montmorillonite, illite and kaolinite, Soil Biol. Biochem. 21: 911-920.

Gianfreda L. and J. Bollag. 1994. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes, Soil Sci. Soc. Am. J. 58: 1672-1681.

Guisan J.M., R. Fernandez-Lafuente, V. Rodriguez, A. Batisda, R.M. Blanco and G. Alvaro.1993. Enzyme stabilization by multi point covalent attachment to activated pre-existing supports, In: Twed W.J.J. van den, A. Harder and R.M. Buitelaar (Eds.) Stability and stabilization of enzymes. Proceedings of an International Symposium held in Maastricht, The Netherlands, Elsevier Science Publishers B.V.: 55-62.

Mandel M. and J. Weber. 1969. Exoglucanase activity by microorganisms, Adv. Chem. 95:391-414.

Misset O. 1993. Stability of industrial enzymes, In: Twed W.J.J. van den, A. Harder and R.M.Buitelaar (Eds.) Stability and stabilization of enzymes. Proceedings of an International Symposium held in Maastricht, The Netherlands, Elsevier Science Publishers B.V.: 111-131.

Naidja A., P.M. Huang and J.M. Bollag. 1997. Activity of tyrosinase immobilized on hydroxylaluminum-montmorillonite complexes, J. Molecular Catalysis A: Chemical 115: 305-316.

Safari Sinegani AA, Emtiazi G, Shariatmadari H 2005. Sorption and immobilization of cellulase on silicate clay minerals. J. Colloid And Interface Science. 290: 39-44.

Safari Sinegani AA, Hosseinpour AR 2006. Factors affecting cellulase sorption in soil. Afr. J. Biotech. 5: 467-471.

Sinsabaugh R.L. and A.E. Linkins. 1988. Adsorption of cellulase components by leaf litter, Soil Biol. Biochem. 20: 927-931.