کارکرد کربنات کلسیم در جذب‌سطحی و بی‌جنبش شدن سلولاز در یک خاک کربنات زدایی شده

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 کربنات کلسیم بر فرایندهای جذب‌سطحی و بی‌جنبش شدن سلولاز در یک خاک کربنات زدایی شده بررسی شد. اگر چه کاربرد کربنات کلسیم گنجایش جذب‌سطحی و بی‌جنبش شدن سلولاز در خاک را افزایش داد ولی پیامد سودمند افزودن کربنات کلسیم بر جذب و بی‌جنبش‌شدن سلولاز در خاک در غلظت های بالاتر آن (بیش از 5 درصد) نمایانتر بود. در برابر آن پیامد زیانبار کربنات کلسیم در کاهش کارایی آنزیم سلولاز در غلظت اندک آن در خاک نیز چشم گیر بود. از آنجایی که ساخت و رها سازی آنزیم سلولاز در خاک اندک است، بودن کربنات کلسیم در خاک نه تنها در جذب‌سطحی و بی‌جنبش کردن سلولاز در خاک سودمند نیست بلکه مایه کاهش کارایی این آنزیم در خاک نیز می شود.

واژه‌های کلیدی : بی‌جنبش شدن، جذب‌سطحی، سلولاز، کربنات کلسیم .

مقدمه

آنزیم‌ها کاتالیزورهای بیولوژیک هستند که در صنایع دارویی، غذایی، چوب، کاغذ، پزشکی، کشاورزی، کاهش آلودگی‌های آب و خاک و ... کاربرد دارند. از این گروه می‌توان آنزیم‌های زایلاناز، آلفا-آمیلاز، لاکاز، لیگنین و منگنز پراکسیداز، اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز، بتا-گلوکوزیداز و ...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 کارکرد کربنات کلسیم در فرایند های جذب و بی جنبش شدن آنزیم سلولاز در خاک است. در این پژوهش با زدودن کربنات های یک خاک با بافت لومی و کاربرد درصد های گوناگونی از کربنات کلسیم، تلاش شده است که شناخت بیشتری از پیامد های سودمند و یا زیانبار کربنات کلسیم 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 بخشی از خاک به کمک اسید استیک کربناتزدایی شد. سپس خاک به کمک محلول 1 نرمال کلرید کلسیم هم‌یون (homoionized) گردید. پس از آن درصد های گوناگونی (0 تا 50 درصد) از کربنات کلسیم 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

---

۱ Ultrasonification

۲ Thomas et al, 1983

۳ 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.

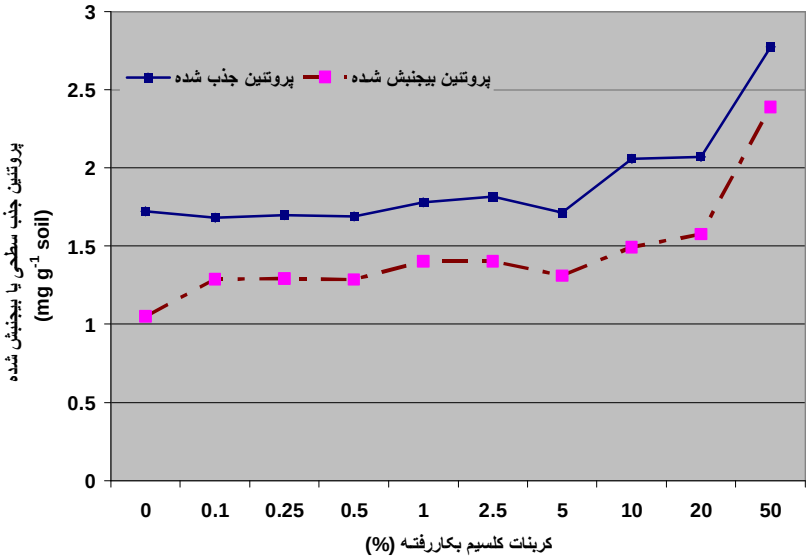
نتایج و بحث

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

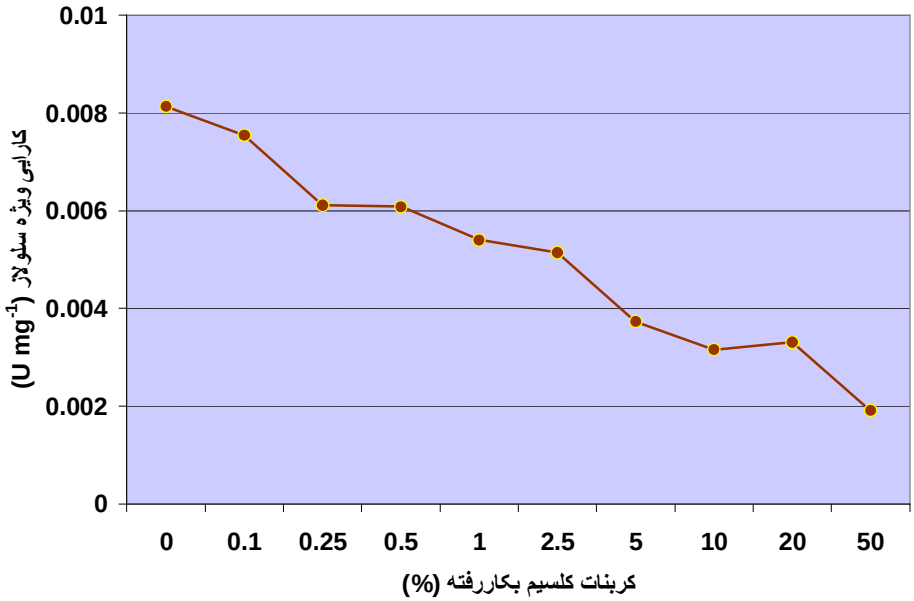
ویژگی	واحد	اندازه	ویژگی	واحد	اندازه
بافت	-	لوم	رسانایی الکتریکی	$dS\ m^{-1}$	0/12
شن	%	48	گنجایش تبادل کاتیونی	$Cmol\ charge\ kg^{-1}$	23/8
سیلت	%	31	همه ازت	$g.kg^{-1}$	2/11
رس	%	21	C/N	-	10/11
همه کربن آلی	$g.kg^{-1}$	21/34	فسفر فراهم	$mg\ kg^{-1}$	77/16
کربنات کلسیم معادل	%	3/7	پتاسیم فراهم	$mg\ kg^{-1}$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

نمودار 1 پروتئین جذب‌سطحی شده و بی جنبش شده در خاک کربنات زدایی شده را نشان می‌دهد. با افزایش درصد کربنات کلسیم بکار رفته در خاک (از 0 تا 5 %) اندازه پروتئین سلولاز جذب و بیجنبش شده افزایش چندانی نداشت. ولی کاربرد بیش از 10 درصد کربنات کلسیم در خاک مایه افزایش گنجایش خاک در جذب و بی جنبش کردن آنزیم سلولاز شد.



نمودار 1- پیامد کاربرد کربنات کلسیم بر جذب سطحی و بیجنبش شدن آنزیم سلولاز در یک خاک کربنات زدایی شده

داده های بدست آمده از ارزیابی کارایی آنزیم سلولاز بی‌جنبش شده در خاک در نمودار 2 نشان داده شده است. کارایی ویژه نشان دهنده کارایی واحد وزن آنزیم بی جنبش شده در خاک است. آشکار است که با افزایش درصد کربنات کلسیم بکار رفته در خاک از کارایی سلولاز به اندازه چشم گیری کاسته شده است. پیامد زیانبار کربنات کلسیم بر کارایی ویژه سلولاز در خاک در کاربرد درصدهای اندکی از آن در خاک نیز چشم گیر است.



نمودار2- پیامد کاربرد کربنات کلسیم بر کارایی ویژه آنزیم سلولاز در یک خاک کربنات زدایی شده

پژوهش های صفری سنجانی و امتیازی (2006) نشان داده است که افزایش یون کلسیم در فاز محلول نه تنها پیامد زیانباری بر کارایی آنزیم سلولاز ندارد، بلکه کارایی این آنزیم را در فاز محلول افزایش می دهد. بنابراین کاهش کارایی آنزیم با کربنات کلسیم وابسته به افزایش یون کلسیم نیست. شاید واکنش این ماده با پروتئین های سلولاز هنگام بی جنبش شدن در خاک مایه دگرگونی ریخت و ساختار آنزیم شده و از اینراه کارایی آنزیم را کاهش دهد. 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).

منابع

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.

Safari Sinegani A.A., G. Emtiazi. 2006. The relative effects of some elements on the DNS method in cellulase assay. J Appl. Sci. Environ. Mgt. 2006. 10: 93-96.

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