Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019

فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنبش شده در برخی از مواد آلی و کانی خاک

علی‌اکبر صفری سنجانی[۱]، گیتی امتیازی[۲] و حسین شریعتمداری[۳]

چکیده

مواد آلی و کانی‌های رسی خاک بیشتر آنزیم‌های ریزجانداران آن را جذب و نگهداری کرده، به پایداری آنها در خاک می‌افزایند. این پژوهش برای روشن‌تر شدن سهم هر یک از بخش‌های آلی و کانی خاک از فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنبش شده در آن انجام گردید. آنزیم سلولاز روی برخی از نگهدارنده‌های آلی و کانی خاک بی‌جنبش شد. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد.

پایداری آنزیم‌های اگزوگلوناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده، به نگهدارنده آن بسیار وابسته بود. پس از ۲۰ روز نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که روی نگهدارنده‌های آلی مانند آویسل بی‌جنبش شده بودند ناچیز بود. در برابر آن، کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که روی خاک و کانی‌های آن بی‌جنبش شده بودند نسبتاً زیاد بود. از سوی دیگر، فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آویسل و مانده‌های کشاورزی به اندازه چشم‌گیری بیشتر از خاک و کانی‌های رسی آن بود. بنابراین، شاید بتوان گفت که بخش بزرگی از فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک خاک وابسته به آنزیم‌هایی است که روی مانده‌های کشاورزی در خاک نگهداری و بی‌جنبش شده‌اند. پوشاندن هر یک از نگهداره‌های کانی‌های رسی، خاک و آویسل با هیدروکسید آلومینیم (چهار میلی‌مول بر گرم) به اندازه چشم‌گیری بر مقدار و فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبش شده روی آنها افزود. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی خاک و کانی‌های هم‌یون شده با کلسیم بیشتر از آنزیم‌های بی‌جنبش شده روی خاک و کانی‌های هم‌یون شده با پتاسیم بود. ولی این پیامدها شاید وابسته به پیامد ویژه کاتیون کلسیم در روش ارزیابی، و نیز فعالیت این آنزیم‌ها باشد. به هر حال، پیامدهای کاتیون هم‌یون کننده بر آنزیم‌های بی‌جنبش شده روی آویسل چشم‌گیر نبوده است.

واژه‌های کلیدی: *بی‌جنبش شدن، اگزوگلوکاناز، اندوگلوکاناز، مانده‌های کشاورزی، آویسل، کانی‌های رسی*

---

۱. دانشجوی سابق دکتری خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان

۳. استادیار خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019

مقدمه

فراوان‌ترین بخش مانده‌های گیاهی سلولز است، که نزدیک به ۱۵ تا ٦٥ درصد وزن خشک گیاه را می‌سازد. سلولز در دیواره یاخته‌های جلبک‌ها و برخی از قارچ‌ها نیز دیده می‌شود. یک مولکول سلولز بسته به گونه گیاه از به هم پیوستن نزدیک به ۳۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ مولکول بتا- دی- گلوکز ساخته شده است. ریزجانداران به کمک آنزیم‌های آبکافت کننده یا هیدرولازها، سلولز مواد لیگنوسلولزی را فروزینه کرده و سپس از فراورده‌های ساده آن (سلوبیوز و گلوکز) بهره می‌گیرند. برای شکستن و فروزینگی کامل سلولز، به گروهی از آنزیم‌ها با نام سلولاز (آنزیم‌های C_i و C_x) نیاز است. آنزیم‌های اندوگلوکاناز (1,4-β-glucan glucanohydrolase, EC3. 3. 2. 1. 4, EG) اگزوگلوکاناز (1, 4-β-glucan cellobiohydrolase, EC 3. 2. 1. 91, CBH) و β- گلوکزیداز β-D- glucoside glucohydrolase (or cellobiase, EC 3. 2. 1. 21) از این گروه آنزیمی هستند که با هم ساختمان بلورین سلولز را ویران می‌کنند. دو آنزیم نخست بیشتر برون یاخته‌ای هستند، ولی آنزیم β- گلوکزیداز بیشتر درون یاخته‌ای بوده و گروه گسترده‌تری از ریزجانداران آن را می‌سازند (۲، ۷ و ۱۹).

آنزیم اندوگلوکاناز به میان‌زنجیره‌های بخش‌های بی‌ریخت (Amorphous) سلولز و زنجیره‌های گلوکزی آزاد پیوسته و پیوندهای β (۱-٤) گلوکزیدی آنها را آبکافت می‌کند. این آنزیم مولکول سلولز را به چند قندی‌ها (Oligosaccharides) می‌شکند. بستره ویژه آنزیم اندوگلوکاناز می‌تواند سلولز بی‌ریخت، زنجیره برهنه گلوکان و یا سلولز دارای گروه‌های جانشینی مانند کربوکسی‌متیل سلولز (CMC یا Caboxymethyl cellulose) و هیدروکسی‌اتیل سلولز (HEC یا Hydroxyethyl cellulose) باشد (۲٤ و ۲۹). آنزیم اندوگلوکاناز با میان- شکنی بخش‌های بی‌ریخت سلولز در مانده‌های گیاهی، سوراخی در رشته سلولز می‌سازد که آنزیم C_1 با فرورفتن در زیر زنجیره‌های گلوکزی و رشته‌های سلولزی بلورین و گشایش و شکستن پیوندهای هیدروژنی میان آنها باعث افزایش فراوانی بستره آنزیم‌های اندوگلوکاناز و اگروگلوکاناز می‌شود (۵).

آنزیم اگزوگلوکاناز یا سلوبیوهیدرولاز به سر ناکاهنده (Nonreducing end) زنجیره‌های بلند و کوتاه گلوکزی، پدید آمده از کار آنزیم‌های C_1 و اندوگلوکاناز، می‌پیوندد و آنها را آبکافت می‌کند. این آنزیم مولکول‌های سلولز را به دوقندی (Disaccharide) سلوبیوز می‌شکند (۵ و ۲٤). آنزیم اگزوگلوکاناز نمی‌تواند سلولز دارای گروه‌های جانشینی مانند کربوکسی‌متیل سلولز را آبکافت کند، ولی سلولز بلورین بیشتر به وسیله این آنزیم آبکافت می‌شود.

سلوبیوز و چندقندی‌های کوتاه پدید آمده از کارکرد آنزیم‌های برون یاخته‌ای، به کمک آنزیم سلوبیاز یا β- گلوکزیداز، به ملکول‌های گلوکز شکسته می‌شود. از آن جا که دو قندی سلوبیوز یک مهار کننده رقابتی آنزیم‌های سلولولیتیک است، آنزیم β- گلوکزیداز با آبکافت سلوبیوز، این مهار کننده را از میان بر می‌دارد (۲۷). این آنزیم توان شکستن و هیدرولیز سلودکسترین‌ها را نیز دارد. گزارش شده است که آنزیم دیگری به نام سلوتریاز (Cellothrease) نیز توانایی هیدرولیز و آبکافت سلوتریوز را دارد.

گذشته از چند آنزیم درون یاخته‌ای مانند نیتروژناز و دهیدروژناز، بیشتر آنزیم‌های خاک برون یاخته‌ای بوده و ویژگی‌های آنزیم‌های نازیا (Abiotic enzyme) را دارند. این آنزیم‌ها با جدا شدن از یاخته‌های زنده، رها شدن از یاخته‌های مرده و پاره شده، آزادانه و یا به همراه تکه‌هایی از یاخته‌های مرده به محلول خاک می‌رسند. گروه بزرگی از آنزیم‌ها مانند پروتئازها و نوکلئازها، تنها برای زمانی کوتاه (یک هفته) در خاک فعالیت دارند، و به تندی ساختمان خود را از دست داده و فروزینه می‌شوند. ولی آزمایش‌ها نشان می‌دهند که برخی از آنزیم‌ها بیرون از یاخته‌های زنده، درون ماتریکس خاک از پایداری خوبی برخوردارند (٦ و ۱۸). این آنزیم‌ها می‌توانند درون و برون لایه‌های کانی‌های رسی خاک جذب سطحی شده و یا با کلوییدهای هومیک و آلی محلول خاک از راه‌های جذب

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019

سطحی (Adsortion)، به دام افتادن (Intraption) و هم پلی‌مره شدن (Co- polymerization)، پایدارتر شوند. مواد آلی محلول خاک نیز می‌توانند با آمیختن و پیوستن به آنزیم‌های آزاد در خاک، ته‌نشین شده و آنها را بی‌جنبش کنند و پایداری آنها را افزایش دهند (٦، ١١، ١٨ و ٢٦).

پایداری و فعالیت آنزیم‌های نازیای خاک به ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیست‌شناختی خاک، و هم‌چنین اندازه و نوع مواد افزوده شده به خاک بستگی دارد. دما، نمناکی، فشار اسمزی، تهویه، بافت، ساختمان، اندازه مواد آلی، pH، عناصر پرنیاز و کم‌نیاز گیاهی، نمک‌ها، عناصر سنگین، آلاینده‌های هوا، آب و خاک، آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و ... هر یک از راهی ویژه بر فعالیت و پایداری آنزیم‌ها در خاک مؤثرند (٤، ٦، ٨، ٩، ١٠، ١٢، ١٥، ١٧، ١٨، ٢٥، ٢٨، ٣٠ و ٣٢).

کانی‌های رسی خاک (به ویژه گروه اسمکتیت‌ها) (Smectites) و مواد آلی آن می‌توانند آنزیم‌های ریزجانداران خاک را جذب و نگهداری کرده، به پایداری آنها در خاک بیافزایند (١٤). گفته می‌شود که این فرایندها از فروزینگی زیستی و کار آنزیم‌های پروتئولیتیک، و به دنبال آن از آبکافت پروتئین آنزیم‌ها در خاک جلوگیری می‌کنند (١٨). بنابراین، بررسی فعالیت و پایداری آنزیم‌های بی‌جنبش شده در کانی‌ها و مواد آلی خاک می‌تواند در روشن‌تر شدن این که کدام بخش از اجزای کانی یا آلی خاک سهم بیشتری از فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنبش شده در خاک را دارند، گره‌گشا باشد.

مواد و روش‌ها

کاه گندم، جو، برنج، نخود، سبوس برنج، تراشه چوب و آویسل از نگهدارنده‌های آلی، و کانی‌های مونت‌موریلورنیت، پالیگورسکیت، کائولینیت، ایلیت و یک نمونه خاک از نگهدارنده‌های کانی آزمایش شده هستند. آویسل، سلولزی با بلورهای ریز است، که از شرکت مرک (Merck Co.) خریداری شده است. کانی‌های مونت‌موریلونیت آریزونا، پالیگورسکیت فلوریدا، کائولینیت و ایلیت به دست آمده از تشکیلات کامبرین شیلی، نیز از انجمن کانی‌شناسی امریکا خریداری شده است. خاک از لایه ٠-٣٠ سانتی‌متری تراس‌های بالایی رودخانه زاینده‌رود، و از کشتزارهای پل شهرستان اصفهان نمونه‌برداری شده است. این خاک را هنرجو و همکاران (٣) در فامیل خاک (Xerollic Camborthids, fine-carbonatic, thermic) گروه‌بندی کرده‌اند. گزارش شده که این خاک در افق Ap خود در بخش رس درشت کانی‌های کلریت، ایلیت، کائولینیت و کوارتز، و در بخش رس ریز کانی‌های اسمکتیت، پالیگورسکیت، ایلیت، کائولینیت و کوارتز را دارد (٣). برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک آزمایش شده در جدول ١ آمده است.

برای بی‌جنبش کردن سلولاز روی مانده‌های کشاورزی، سوسپانسیونی ١٪ از پودر کاه گندم، جو، برنج، سبوس برنج، نخود و خاک اره در آب مقطر آماده شد. با افزودن آب مقطر، تکان دادن آن، و سانتریفوژ کردن در شتاب گریز از مرکز ١٩٠٠٠g، هر یک از آنها شسته شد. برای جلوگیری از رشد ریزجانداران در سوسپانسیون این نگهدارنده‌های آلی، مقداری تولوئن (غلظت ٠/١٪) به هر یک از آنها افزوده گردید.

برای بی‌جنبش کردن سلولاز روی کانی‌های رسی و خاک، نخست این نگهدارنده‌ها با کاتیون‌های پتاسیم یا کلسیم هم‌یون (Homoionized) شدند. برای این کار سوسپانسیون آنها سه بار پس از تعادل با محلول‌های کلرید پتاسیم یا کلرید کلسیم یک نرمال شست‌شو، و برای زدودن نمک‌های اضافی سه بار دیگر با اتانل ٩٥٪ شست‌شو شد. سرانجام برای جلوگیری از رشد ریزجانداران در آنها، به سوسپانسیون ١٪ نگهدارنده‌ها مقداری تولوئن (غلظت ٠/١٪) افزوده گردید. با افزودن دو میلی‌لیتر از محلول یک مولار کلرید آلومینیم به ٥٠ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ١٪ رس‌ها، که دارای ٠/٥ گرم رس هم‌یون شده است، و به دنبال آن خنثی نمودن آنها با هیدروکسید پتاسیم ٠/٥ مولار و سپس شست‌شوی آنها با آب مقطر در دستگاه سانتریفوژ، کمپلکس‌های نگهدارنده- هیدروکسید آلومینیم، که دارای نزدیک به چهار میلی‌مول آلومینیم بر یک گرم آن بود، آماده شد (١).

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019

جدول ۱. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک نمونه‌برداری شده

ویژگی	اندازه	ویژگی در عصاره اشباع خاک	meq l^{-1}	ویژگی	اندازه
سنگ‌ریزه	٪۱۷/۵	CO_3^{2-}	۰/۵٤	CEC (Cmol Kg^{-1})	۲۰/٤
شن	٪۳۵/۸	HCO_3^-	۲/٤	EC (ds m^{-1})	۱/۲۸
سیلت	٪۳۹/٦	SO_4^{2-}	۰/۱	pH	۷/۷
رس	٪۲٤/٦	Cl^-	٤/۸۲	ESP (%)	۰/۷۲
بافت	لوم رسی	Na^+	۵/٤		
کربنات کلسیم هم‌سنگ	٪٤۲	K^+	۳/۹		
مواد آلی	٪۱/۵	$(Ca+Mg)^{2+}$	۷/٤		
پتاسیم تبادلی	٪۰/۰۲	Ca^{2+}	٦/۵		

پس از اولتراسونیفیکاسیون (Ultrasonification) سوسپانسیون جذب کننده‌ها، به پنج میلی‌متر (۵۰ میلی‌گرم) از آن، به اندازه‌های صفر، ۱/۵، ۳ و ۵ میلی‌لیتر از محلول، پنج میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم سلولاز (فراورده شرکت فلوکا) افزوده شد. حجم هر یک از نمونه‌ها با آب مقطر به ۱۵ میلی‌لیتر رسانده شد. نمونه‌ها یک ساعت تکان داده شدند تا فرایند جذب آنزیم‌ها به تعادل برسد. سپس هر نمونه ۱۵ دقیقه در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در شتاب گریز از مرکز ۱۹۰۰۰ ×g سانتریفوژ (20PR, Hitachi) گردید. بخش ته‌نشین شده با آب مقطر و سانتریفوژ کردن، تا جایی شسته شد که دیگر هیچ نشانی از آنزیم‌ها در محلول رویین آنها نماند (۲۲ و ۲۳).

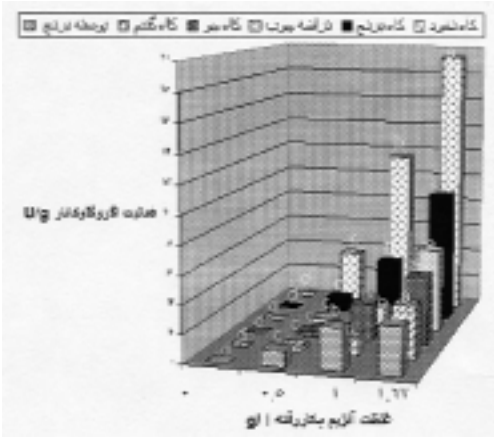
پس از شست‌شوی آنزیم‌ها، سوسپانسیونی از کمپلکس نگهدارنده- آنزیم (بی‌جنبش شده) به غلظت ۳/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ساخته شد. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی نگهدارنده‌ها ارزیابی شد. سوسپانسیون نگهدارنده- آنزیم (بی‌جنبش شده) تا ۲۰ روز در یخچال نگهداری، و به فاصله‌های زمانی مختلف فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آنها ارزیابی شد.

فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبش شده به کمک اسپکتروفتومتر و به روش مندل و وبر (۲۰) ارزیابی گردید. سوبسترای به کار رفته برای ارزیابی فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز (F Pase) دو نوار ۱×۳ cm کاغذ صافی واتمن شماره ۱، و برای آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) ۰/۰۵ گرم کربوکسی‌متیل سلولز (Carboxymethyl cellulose, low viscosity) بود. فعالیت آنزیم‌ها با محاسبه میلی‌مول قندهای احیا کننده آزاد شده در یک دقیقه، برای یک میلی‌متر از سوسپانسیون نگهدارنده- آنزیم (U/ml) و یا یک گرم از نگهدارنده (U/gr) برآورد و گزارش شده است.

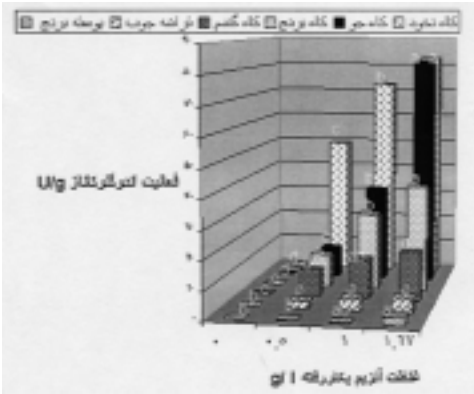
نتایج

نتایج ارزیابی فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنبش شده روی مانده‌های کشاورزی در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز بی‌جنبش شده با افزایش غلظت آنزیم به کار رفته به اندازه چشم‌گیری افزایش یافته، و پیش‌بینی می‌شود که غلظت‌های بیشتر، از آن هم بیشتر شود. فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی مانده‌های کشاورزی در کاه نخود بیشترین بوده، و سپس به ترتیب از کاه برنج، خاک اره، کاه جو، گندم تا پوسته برنج به کمترین اندازه خود می‌رسد. فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی کاه نخود و جو زیاد، روی کاه برنج و گندم میانه، و روی خاک اره و پوسته

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019



نمودار ۱. فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی برخی از مانده‌های کشاورزی



نمودار ۲. فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی برخی از مانده‌های کشاورزی

برنج کمترین است. گذشته از پوسته برنج، دیده می‌شود که روی هم رفته فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنبش شده روی مانده‌های کشاورزی با درصد نیتروژن زیادتر (کاه نخود)، بیشتر از مانده‌های دیگر (کاه گندم، برنج و خاک اره) است. این نتیجه ممکن است وابسته به توان بی‌جنبش‌سازی بهتر آنها باشد (۱). بنابراین، شاید بتوان پیش‌بینی کرد که بخش بزرگی از آنزیم‌های بی‌جنبش شده در خاک روی مواد آلی هومیک و پوسیده آن نگهداری شود و کار کاتالیزی خود را انجام دهند. داده‌های ارزیابی اندوگلوکاناز و اگزوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی مانده‌های کشاورزی، نشان می‌دهد که آنزیم اگزوگلوکاناز در برابر اندوگلوکاناز، روی مانده‌های کشاورزی با نسبت C/N زیاد مانند خاک اره نیز می‌تواند فعالیت زیادی داشته باشد.

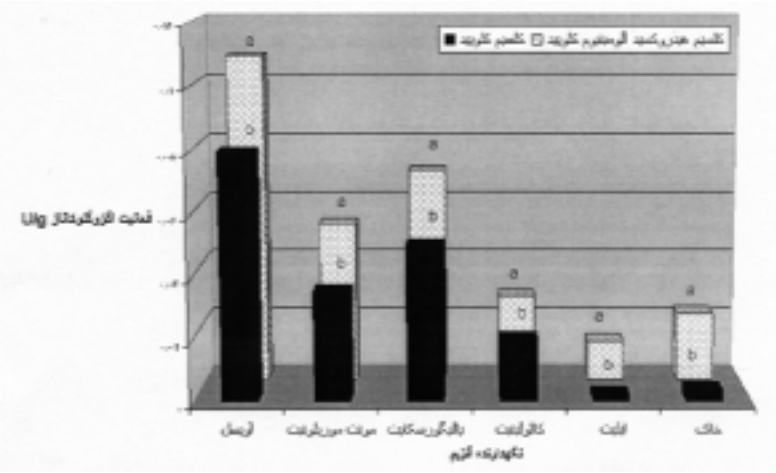
فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن در نمودارهای ۳ تا ٦ نشان داده شده است. این نمودارها نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آویسل به اندازه چشم‌گیری بیشتر از نگهدارنده‌های دیگر است. پس از آویسل، فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبش شده روی نگهدارنده‌ها، به ترتیب از کانی پالیگورسکیت، به مونت موریلونیت، کائولینیت، خاک و ایلیت کاهش می‌یابد.

پوشاندن هر یک از نگهدارنده‌ها با هیدروکسید آلومینیم توان بی‌جنبش‌سازی آنها را به اندازه چشم‌گیری افزایش می‌دهد (داده‌ها گزارش نشده است) (۱). همان گونه که در نمودارهای ۳ و ٤ دیده می‌شود، فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و به ویژه اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی هر یک از نگهدارنده‌ها، در تیمار آنها با هیدروکسید آلومینیم نیز به اندازه چشم‌گیری افزایش یافته است. به هر حال، افزایش فعالیت آنزیم‌ها به ویژه اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آویسل در برابر دیگر نگهدارنده‌ها، در تیمار هیدروکسید آلومینیم کمتر است.

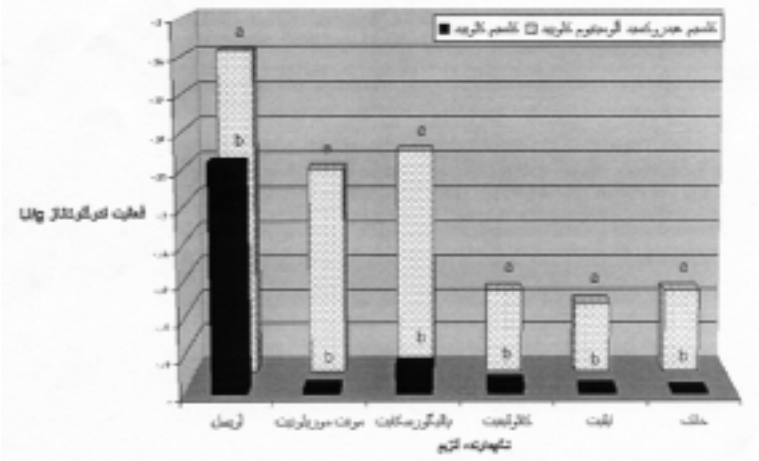
نمودارهای ۵ و ٦ فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی نگهدارنده‌های پوشانده شده با هیدروکسید آلومینیم و هم‌یون شده با پتاسیم یا کلسیم را پس از ۲۰ روز نگهداری در یخچال نشان می‌دهد. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی خاک و کانی‌های آن پس از ۲۰ روز نگهداری در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد، افت زیادی دارد. در برابر آنها، پایداری آنزیم‌های بی‌جنبش شده روی آویسل نسبتاً زیاد است، و پس از ۲۰ روز افت کمی را نشان می‌دهد.

در باره کاهش فعالیت آنزیم‌ها پس از بی‌جنبش شدن آنها گزارش‌های فراوانی شده است (۲۲، ۲۳ و ۳۱). در این رشته آزمایش‌ها، دیده شد که اندازه سلولاز بی‌جنبش شده روی نگهدارنده‌ها به ترتیب زیر کاهش می‌یابد: خاک> پالیگورسکیت ~ مونت‌موریلونیت> آویسل ~ کائولینیت ~ ایلیت (داده‌ها گزارش نشده است) (۱). بنابراین، شاید بتوان گفت که افت

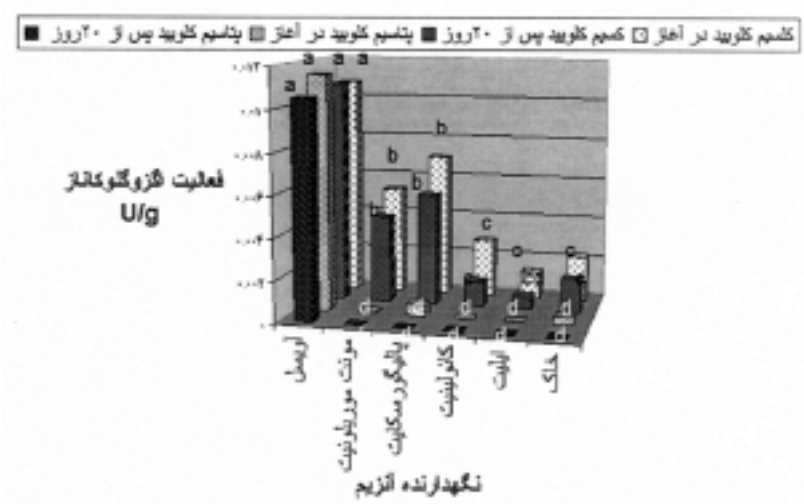
Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019



نمودار ۳. فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن در برابر آنچه که با هیدروکسید آلومینیم پوشانده شده‌اند.

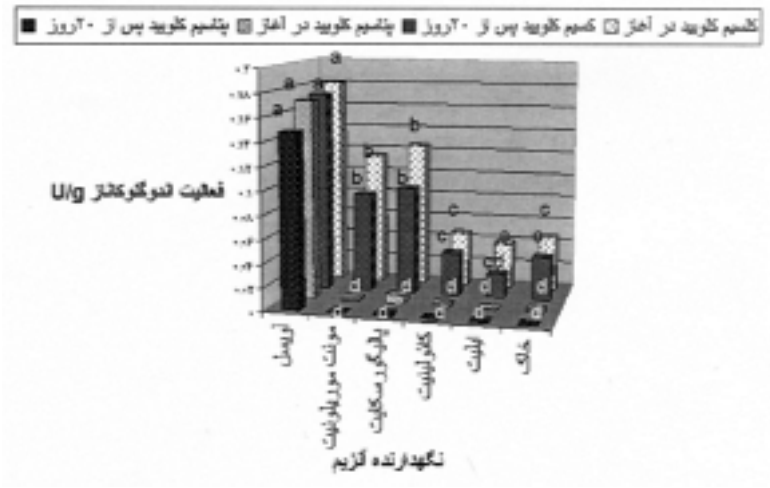


نمودار ٤. فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن در برابر آنچه که با هیدروکسید آلومینیم پوشانده شده‌اند.



نمودار ۵. پایداری آنزیم اگزوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن که با کلسیم یا پتاسیم هم‌یون شده و با هیدروکسید آلومینیم پوشانده شده‌اند.

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019



نمودار ٦. پایداری آنزیم اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن که با کلسیم یا پتاسیم هم‌یون شده و با هیدروکسید آلومینیم پوشانده شده‌اند .

فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکانـاز بی‌جنبـش شـده روی خاک در میان نگـهدارنده‌ها بیشـترین اسـت. در برابـر آن، افت فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبـش شده روی آویسل کمترین است. شاید این ناهمانندی‌هـا وابسـته به گوناگونـی فرایندهـا در بی‌جنبـش شـدن آنزیم‌هـا روی ایـن نگهدارنده‌ها باشد. کم بودن فعالیت آنزیم‌هـای بی‌جنبـش شـده روی کانی‌های خاک و زیاد بودن فعـالیت آنـها روی آویسـل و مانده‌های کشاورزی، نشان می‌دهد که بیشتر فعـالیت آنزیم‌هـای سلولولیتیک خاک‌ها وابسته به بخش آلی آن است.

فعالیت اگزوگلوکاناز و اندوگلوکانـاز بی‌جنبـش شـده روی خاک و کانی‌های هم‌یون شده با کلسیم بـه انـدازه چشـم‌گـیری بیشتر از پتاسیم است. دیده شده است کـه از یـک سـو فعـالیت آنزیم‌های سلولولیتیک در کنار کاتیون کلسـیم بیشـتر از پتاسـیم ارزیابی می‌شود، و از سوی دیگر افزایش بار مثبت پـل کـاتیونی از پتاسیم به کلسیم مایه افزایش توان جذب سطحی و بی‌جنبش شدن آنزیم‌ها روی نگهدارنده‌ها مـی‌گـردد (۱). ایـن فراینـد در افزایش فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبـش شـده روی نگـهدارنده‌های هم یون شده با کلسیم هم‌کردار است، و جدا کردن آنها نیـاز بـه پژوهشی ویـژه دارد. بـه هـر صـورت، در ایـن نمودارهـا دیـده می‌شود که فعالیت اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبـش شـده روی آویسـل هم‌یـون شـده بـا پتاسـیم و کلسـیم ناهمـانندی چشم‌گـیری نـدارد. شـاید چگونگـی و روش بی‌جنبـش شـدن آنزیم‌هـای سـلولولیتیک روی سوبسـترای آن یـا مانده‌هـای کشاورزی و آویسل، با خاک و کانی‌های آن ناهمانند باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه بی‌جنبش‌سازی آنزیم‌هـا در بیوتکنولـوژی، بیشـتر بـرای بهره‌گیری دوباره از آنزیم‌ها و کاهش هزینه فراوری آنـها انجـام می‌شود (۲۱)، ولی گـزارش شـده اسـت کـه پیونـد کووالانـت چندگانه یک آنزیم روی یک نگـهدارنده مایـه افزایـش سـختی مولکول آنزیم می‌شود، و پایداری ساختار فضایی آن را در برابـر بـاز شـدن افزایـش می‌دهـد (١٦). بـه هـر ترتیـب، هنگـام بی‌جنبش‌سازی آنزیم‌ها، بخشی از فعالیت و کنشوری آنها، بسته به روش بی‌جنبش شدن آن روی نگهدارنده‌ها، ساختمان آنزیـم و ساختار نگـهدارنده، از دسـت مـی‌رود (۲۲، ۲۳ و ۳۱). نشـان داده شده که در میان آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنبش شده، تنـها فعـالیت و کنشـوری ویـژه (Specific activity) آنزیـم β-D-گلوکزیداز بیشتر از آنزیم‌های آزاد آن است. با این که از فعالیت دیگر آنزیم‌های سـلولولیتیک کاسـته می‌شـود، بی‌جنبـش کـردن آنزیم‌ها، پایداری آنها را در برابر یخ زدن- ذوب شدن و خشـک

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019

شدن- تر شدن پی در پی خاک افزایش می‌دهد. پس از ۱۰ بار یخ زدن- ذوب شدن، آنزیم‌های آزاد ٤٢- ٥٦ درصد و آنزیم‌های بی‌جنبش شده ٦٠- ١٤٥ درصد از فعالیت نخست خود را نشان می‌دهند. فرایند خشک- تر کردن نمونه‌ها، در براب یخ زدن- ذوب شدن آنها، بر فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبش شده پیامد بدتری دارد. پس از ۱۰ بار خشک- تر کردن، آنزیم D-β- گلوکزیداز ٥٥- ١٠٥ درصد اگزوگلوکاناز ١٢- ٦٠ درصد و اندوگلوکاناز ٠- ٥ درصد از فعالیت نخست خود را نگه می‌دارد (٣١). نگه‌داشتن آنزیم‌های لاکاز ((EC 1. 10. 3.2 و Laccase) ، پراکسیداز (EC 1.11. 1. 7 و Peroxidase)، و اسید فسفاتاز (Acid phosphatase EC 3. 1. 3. 2) و بی‌جنبش شده (روی نگهدارنده‌های مونت‌موریلونیت، کائولینیت، شیشه و خاکی با بافت سیلت لوم) در دمای چهار درجه سانتی‌گراد برای چهار ماه، هیچ‌گونه کاهشی را در فعالیت و کنشوری آنها به دنبال نداشته است. در برابر آن، کنشوری و فعالیت آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز آزاد (جنبش‌دار)، و هم‌چنین آنزیم اسید فسفاتاز آزاد و بی‌جنبش شده روی شیشه، پس از نگه‌داشتن در همان دما نزدیک به ٥٠٪ کاهش داشته است (١٣).

در این پژوهش دیده شد که پایداری آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده به ساختمان نگهدارنده آن وابستگی بسیار دارد. به گونه‌ای که پس از ۲۰ روز نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، کاهش فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبش شده روی نگهدارنده‌های آلی (مانند آویسل) نا چیز، ولی روی نگهدارنده‌های کانی چشم‌گیر است. کاهش فعالیت و کنشوری آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنبش شده روی کانی‌های رسی، و به ویژه خاک، به اندازه چشم‌گیری بیشتر از آویسل و مانده‌های کشاورزی است. بنابراین، شاید بتوان گفت که بخش بزرگی از فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک خاک وابسته به آنزیم‌هایی است که روی مانده‌های گیاهی در خاک نگهداری و بی‌جنبش می‌شوند.

از آن‌جا که کانی‌های رسی در خاک با هیدروکسیدهای آهن و آلومینیم پوشیده شده‌اند، در باره چگونگی جذب آنزیم‌ها در میان لایه‌های مونت‌موریلونیت پوشیده شده با هیدروکسیدهای آهن و آلومینیم آزمایش‌هایی انجام شده است. گزارش شده که پوشاندن کانی‌های رسی با هیدروکسیدهای آلومینیم مایه افزایش جذب آنزیم آسپارتاز (Aspartase) روی آنها شده است (٢٢). این پژوهش نشان داد که پوشاندن هر یک از نگهدارنده‌های کانی خاک با هیدروکسید آلومینیم به اندازه چشم‌گیری بر فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبش شده در آنها می‌افزاید.

فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبش شده در خاک و کانی‌های هم‌یون شده با کلسیم بیشتر از پتاسیم است. با توجه به پیامد مثبت کاتیون کلسیم با روش ارزیابی و نیز فعالیت این آنزیم‌ها (١)، در باره پیامد مثبت این روش بی‌جنبش‌سازی بر فعالیت این آنزیم‌ها چیزی نمی‌توان گفت. به هر حال، این پیامد مثبت در میزان و فعالیت آنزیم‌های بی‌جنبش شده روی آویسل چشم‌گیر نمی‌باشد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر قربانی، کارکنان آزمایشگاه‌های خاک‌شناسی و دام‌پروری دانشگاه صنعتی اصفهان و کارکنان آزمایشگاه پژوهشی زیست‌شناسی گلخانه دانشگاه اصفهان، به ویژه سرکار خانم مهندس خالصی صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

١. صفری سنجانی، ع. ا. ١٣٧٩. فروزینگی زیستی برخی از مانده‌های کشاورزی و ارزیابی کارایی آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک قارچ‌ها در خاک. پایان‌نامه دکتری خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

٢. کوچکی، ع.، م. حسینی و ح. ر. خزاعی. ١٣٧٦. *بوم‌شناسی خاک* (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019

۳. هنرجو، ن. ۱۳۷۱. مقاسیه چگونگی تحول و تکامل و بررسی کانی‌های رسی در خاک‌های تراس‌های رودخانه زاینده‌رود اصفهان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

4. Benoit, R. E. and R. L. Starkey. 1968. Inhibition of decomposition of cellulose and some other carbohydrates by tannin. Soil Sci. 10: 291-296.

5. Chaudhry, G. R. 1994. Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals. Chapman & Hall, London.

6. Dick, R. P. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. PP. 121-150. *In*: C. E. Pankhurst, B. M. Doube and V. V. S. R. Gupta (Eds.), Biological Indicators of Soil Health. Cab International, Wallingford, UK.

7. Eaton, R. A. and M. D. C. Hale. 1993. Wood: Decay, Pests and Protection. Chapman & Hall, London.

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

9. Frankenberger, Jr., W. T. and M. A. Tabatabai. 1991. Factors affecting L- asparaginase activity in soil. Biol. Fertil. Soils 11:1-5.

10. Frankenberger, Jr., W. T. and M. A. Tabatabai. 1991. Factors affecting L-glutaminase activity in soils. Soil Biol. Biochem. 23(9): 875-879.

11. 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.

12. Geiger, G., H. Brandl, G. Furrer and R. Schulin. 1998. The effect of copper on the activity of cellulase and β-glucosidase in the presence of montmorillonite or Al-montmorillonite. Soil Biol. Biochem. 30(12): 1537-1544.

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

14. Gianfreda, L., M. A. Rao and A. Violante. 1991. Ivertase (β-fructosidase): effects of montmorillonite, Al-hydroxide and Al(OH)x-montmorillonite complex on activity and kinetic properties. Soil Biol. Biochem. 23(6): 581-587.

15. Greco, Jr., G., D. Pirozzi, M. Maremonti, G. Toscano and L. Gianfreda. 1993. The kinetics of enzyme inactivation. PP. 429-435. *In*: W. J. Twed, J. Van den, A. Harder and R. M. Buitelaar (Eds.), Stability and stabilization of enzymes. Proceedings of an International Symposium held in Maastricht, Elsevier Science Publishers, The Netherlands.

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

17. Juma, N. G. and M. A. Tabatabai. 1977. Effects of trace elements on phosphatase activity in soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 41: 343-346.

18. Ladd, J. N. 1985. Soil enzymes. PP. 175-221. *In*: D. Vaughan and R. E. Malcolm (Eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity: Developments in Plant and Soil Science. Kluwer Academic Publishers Group, Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

19. Lee, Y. G. and L. T. Fan. 1980. Properties and mode of action of cellulase. Adv. Biochem. Eng. 17: 101-129.

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

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

22. Naidja, A. and P. M. Huang. 1996. Deamination of aspartic acid by aspartase- Ca- montmorillonite complex. J. Molecular Catalysis A: Chemical 106: 255-265.

23. Naidja, A., P. M. Huang and J. M. Bollag. 1997. Activity of tyrosinase immobilized on hydroxylaluminum-montmrillonite complexes. J. Molecular Catalysis A: Chemical 115: 305-316.
24. Nevalainen, H. and M. Penttil. 1995. Molecular biology of cellulolytic fungi. PP. 303-319. *In*: U. Kuck (Ed.), The Mycota. II. Genetics and Biotechnology. Springer-Verlag, Beriln.
25. Norde, W. 1993. The behaviour of proteins at interfaces in relation to their structural stability. PP. 3-11. *In:* W. J. Twed, J. Van den, A. Harder and R. M. Buitelaar (Eds.), Stability and stabilization of enzymes. Proceedings of an International Symposium held in Maastricht, Elsevier Science Publishers, The Netherlands.
26. Page, A. I., R. H. Miller and D. R. Keeney. 1992. Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Am. Soc. Agron., Inc., Madison, Wisconsin, USA.
27. Rouvinen, J., T. Bergfors, T. Teeri, J. K. C. Knowles and T. A. Jones. 1990. The three- dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesie*. Science 249: 380-386.
28. Saddler, J. N. 1986. Factors limiting the efficiency of cellulase enzyme. Microbiol. Sci. 3: 377-389.
29. Sarkar, A. and S. N. Upadhyay. 1994. Purification and properties of cellulase from *Micrococcus roseus* W. J. Microbiol. Biotechnol. 10: 709-710.
30. Sinsabaugh, R. L. and A. E. Linkins. 1988. Adsorption of cellulase components by leaf litter. Soil Biol. Biochem. 20: 927-931.
31. Sinsabaugh, R. L. and A. E. Linkins. 1989. Natural disturbance and the activity of *Thichoderma viride* cellulase complexes. Soil. Biol. Biochem. 21(6): 835-839.
32. Skujins, J. J. and A. D. McLaren. 1968. Persistence enzymatic activities in stored and geologically preserved soils. Enzymologia 34: 213-225.

Downloaded from jcpp.iut.ac.ir at 6:51 IRST on Thursday October 17th 2019