

ویژگی‌های سینتیکی آنزیم اوره‌آز در حضور رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت

حدیثه رحمانی، امیر لکزبان، علیرضا کریمی و اکرم حلاج‌نیا^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲۱)

DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.20.78.1

چکیده

اوره یکی از پرکاربردترین کودهای نیتروژن‌دار در زمین‌های کشاورزی است. سرنوشت این کود در خاک بسیار وابسته به فعالیت آنزیم اوره‌آز بوده و این آنزیم نیز عمدتاً به صورت جذب شده بر سطح کلونیدهای خاک به ویژه رس‌ها قرار دارد. به منظور بررسی ویژگی‌های سینتیکی اوره‌آز آزاد و جذب شده بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت، آزمایشی با هشت سطح غلظت اوره (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی مولار) و غلظت ۱ واحد آنزیمی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و $\text{pH}=7$ انجام شد. جذب اوره‌آز بر سطوح رس‌ها ویژگی‌های سینتیکی آن را نسبت به حالت آزاد تحت تأثیر قرار داد. نتایج نشان دادند که اوره‌آز در هر دو حالت آزاد و جذب شده از سینتیک میکائلیس-متن پیروی می‌نمود. بیشترین مقدار V_{\max} پس از اوره‌آز آزاد در کمپلکس اوره‌آز-سپیولیت و کمترین میزان K_m نیز در کمپلکس اوره‌آز-ورمیکولیت مشاهده گردید. همچنین نتایج نشان دادند که بیشترین کارایی کاتالیزوری پس از اوره‌آز آزاد به ترتیب متعلق به اوره‌آز در حضور ورمیکولیت و سپیولیت بود. همچنین فاکتور اثربخشی برای اوره‌آز جذب شده بر سطح سپیولیت بیشتر از اوره‌آز جذب شده بر سطح ورمیکولیت بوده و این امر به نوعی مبین کامل‌تر بودن فرآیند پخشیدگی در حضور سپیولیت است.

واژه‌های کلیدی: اوره، اوره‌آز، سپیولیت، ورمیکولیت، ویژگی‌های سینتیکی

۱. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*: مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: Soilsun65@yahoo.com

مقدمه

بیش از یک قرن است که مطالعه فعالیت آنزیم‌ها در خاک با هدف درک بیوشیمی تجزیه ترکیبات مختلف، چرخه عناصر و همچنین پاسخ اکوسیستم به تغییرات جهانی در حال انجام است (۱۴، ۳۰، ۵۳ و ۵۵). از آنجایی که آنزیم‌های خاک به‌نوعی کسب میکروبی عناصر غذایی از مواد آلی را وساطت می‌نمایند، فعالیت آنها معمولاً به‌عنوان شاخصی از تقاضای میکروبی عناصر غذایی نیز تفسیر شده است (۲) و به همین دلیل آگاهی از سرنوشت آنزیم‌ها در خاک بسیار حائز اهمیت است.

به‌طور کلی، آنزیم‌هایی که در خاک تجمع می‌یابند شامل آنزیم‌های خارج سلولی آزاد شده از سلول‌های زنده، آنزیم‌های درون‌سلولی حاصل از تجزیه و فروپاشی سلول‌ها و آنزیم‌های پیوند شده به اجزای تشکیل‌دهنده سلول می‌باشند (۳ و ۲۶). اغلب پروتئین‌های کروی مانند آنزیم‌ها، تمایل شدیدی برای تجمع در سطوح دارند. این رفتار انفعالی، نقشی کلیدی در غیرمتحرک شدن و پایداری آنزیم دارد (۳۸). آنزیم‌های داخل و خارج سلولی رها شده به درون خاک، سریعاً جذب ترکیبات مختلف موجود در خاک از جمله مواد آلی و به‌ویژه ذرات خاک شده و تا حدودی غیرفعال می‌شوند (۵۶)، با این وجود، ماندگاری آنزیم‌ها در خاک می‌تواند به سبب حمایت آنها در برابر اثرات فیزیکوشیمیایی مختلف همچون خشک شدن و تابش اشعه گاما (۶۲)، همچنین در برابر پرتونکافت آنزیمی (۵۶)، افزایش یابد. از سوی دیگر، مطالعه مدل‌های مختلف نشان داده است که آنزیم‌ها می‌توانند توسط رس‌های خالص و ناخالص (پوشیده شده توسط دیگر اجزای خاک مانند اکسیدهای آهن) جذب شده، فعالیت خود را حفظ نموده و در برابر پروتئولیز محافظت شوند (۳۶، ۳۷ و ۵۸). در حقیقت، جذب آنزیم‌ها ممکن است به‌علت تغییرات ترکیب ساختمان آنزیم جذب شده، منجر به غیرفعال شدن آنها گردد و یا به‌علت افزایش غلظت آنزیم و بستری در سطح مشترک فاز جامد - آب، موجب افزایش فعالیت آنها شود (۴۷). پرواضح است که در بین جاذب‌های مختلف موجود در خاک، رس‌ها، با دارا بودن سطح

ویژه زیاد و همچنین ظرفیت جذب ترکیبات با وزن مولکولی زیاد و آروماتیک پیچیده، نقش مهمی را در فرآیند جذب پروتئین‌ها و به‌ویژه آنزیم‌ها ایفا می‌نمایند (۳۴). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که اگر آنزیم‌ها به فضای بین لایه‌ای کانی‌های رسی جذب شوند، این فرآیند ممکن است منجر به مسدود شدن جایگاه فعال آنزیم گردیده و یا تا اندازه‌ای در جهت تغییر شکل سطح آنزیم عمل نماید. در چنین شرایطی انتظار می‌رود که فعالیت آنزیم به‌صورت مشخصی کاهش یابد. برعکس، اگر جذب به تثبیت ساختمان آنزیم کمک کند، این فرآیند می‌تواند در جهت حفظ یا افزایش فعالیت آنزیم عمل نماید (۶۱). آنزیم‌ها در خاک عمدتاً توسط پیوند هیدروژنی، یونی یا کووالانس به کلوئیدهای خاک متصل می‌شوند (۲۷). جزئیات دقیق فرآیندهای جذب پروتئین‌ها توسط کانی‌های رسی همچنان در حال بررسی است. نوع ترکیب پروتئینی نیز در سرانجام این برهم‌کنش‌ها بسیار حائز اهمیت است، به‌طوری‌که هندریکس (۲۲) این چنین گزارش نموده است که "پروتئین‌های یک لایه و آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به پروتئین‌های چند لایه، با قدرت بیشتری بر روی مونتموریلونیت جذب و نگهداری می‌شوند که این امر می‌تواند ناشی از نیروهای کولمب و واندروالس باشد." فعالیت کاهش یافته آنزیم‌های غیرمتحرک شده، ممکن است مجدداً از طریق افزایش تماس آنزیم - بستری ناشی از تکان خوردن (۵۹) یا با استفاده از محلول‌های بافر فعال‌سازی مناسب، افزایش یابد (۳۱). در مطالعات مختلف نتایج جالب توجهی در این زمینه به‌دست آمده است که با توجه به نوع آنزیم، نوع رس مورد بررسی و اثرات متقابل آنها متفاوت می‌باشند. از مهم‌ترین این آنزیم‌ها که برهم‌کنش آن با کانی‌های رسی بسیار حائز اهمیت است، می‌توان به آنزیم اوره‌آز اشاره نمود. نیاز به کودهای نیتروژن‌دار جهت افزایش تولیدات کشاورزی کاملاً شناخته شده است و در میان کودهای نیتروژن‌داری که به‌صورت تجاری در دسترس هستند، اوره به‌عنوان یکی از منابع اصلی نیتروژن مطرح و با روندی رو به افزایش، در جهان مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵ و ۴۸).

(K_m و V_{max}) می‌گذارد. مطالعات نشان داده‌اند که در سیستم ناهمگنی مانند خاک، اوره‌آز سریعاً جذب ذرات خاک شده و بنابراین، مقادیر K_m (ثابت میکائیلیس) در برخی مکان‌ها بسته به روش اندازه‌گیری و خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک، اغلب بین $330-1/3$ mM تغییر می‌کند (۵، ۲۹، ۳۵ و ۳۹). اختلاف در مقادیر K_m ممکن است به کمپلکس‌های پایدار آلی- معدنی اوره‌آز و یا روابط رس- اوره‌آز نسبت داده شود و از طرفی منتج به سرعت‌های مختلف پخشیدگی بستره اوره به مکان‌های فعال اوره‌آز پیوندیافته با جاذب‌های آلی یا معدنی گردد (۱۱). همچنین تفاوت‌های مشاهده شده در مقادیر K_m می‌تواند به تفاوت‌های موجود بین اوره‌آزهای با خاستگاه‌های متفاوت و یا به تفاوت‌ها در ساختمان و توزیع بار در مکان فعال آنزیم، به دنبال تشکیل کمپلکس نسبت داده شود (۲۸). ذکر این نکته ضروری است که اگرچه، آنزیم‌های غیرمتحرک شده همچنان از سینتیک میکائیلیس- من تن (Michaelis-Menten) پیروی می‌نمایند، اما اتصال اینچنین آنزیم‌هایی به سطوح مشترک جامد، می‌تواند تمایل آنها را به سمت بستره تحت تأثیر قرار دهد که این امر ممکن است ناشی از نوع آنزیم، نوع رس و همچنین برهمکنش این دو با یکدیگر باشد (۳۲).

تاکنون مطالعات اندکی پیرامون برهم‌کنش آنزیم اوره‌آز با کانی‌های رسی خصوصاً از جنبه مقایسه‌ای انجام گرفته است. لذا در این آزمایش سعی گردید تا خصوصیات سینتیکی آنزیم اوره‌آز پس از جذب بر سطوح دو رس سپیولیت و ورمیکولیت هر دو از دسته فیلوسیلیکات‌ها، اما با ویژگی‌های ساختاری منحصر به فرد، مورد بررسی قرار گیرد. سپیولیت، یک کانی رسی ثانویه و مخلوط کمپلکس سیلیکات منیزیم با فرمول کلی $Mg_2Si_4O_{10}(OH)_2 \cdot 6H_2O$ بوده که دارای وزن مخصوص پایین و تخلخل بالا و به لحاظ شکل بلور، کریستوکریستالین رشته‌ای- بی‌شکل می‌باشد و ورمیکولیت با فرمول شیمیایی $(MgFe,Al)_2(Al,Si)_4O_{10}(OH)_2 \cdot 4H_2O$ ، دارای ریخت ورقه‌ای (فلس مانند) است.

یکی از رویکردهای مهم جهت افزایش میزان سودمندی کود اوره، کنترل هیدرولیز آن توسط اوره‌آز خاک می‌باشد و بدین منظور، درکی کامل از فعالیت اوره‌آز در درون خاک ضروری است. اوره‌آز (اوره آمیدو هیدرولاز، EC 3.5.1.5) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های موجود در خاک است که پیوندهای غیر پپتیدی C-N را در آمیدهای خطی هیدرولیز می‌نماید. اوره در خاک، به سبب فعالیت‌های آنزیم اوره‌آز به دی‌اکسید کربن و آمونیاک تجزیه می‌شود (۶).

فرآیند کمپلکس شدن اوره‌آز با ترکیبات هوموسی و غیر هوموسی مختلف در محیط خاک، در سیستم‌های کشاورزی بسیار حائز اهمیت است. گزارشات متعددی وجود دارد مبنی بر اینکه اتصال اوره‌آز خارج سلولی به کمپلکس‌های آلی- معدنی، پایداری آن را در مقایسه با اوره‌آز موجود در محلول خاک افزایش می‌دهد (۷). در صورت اتصال اوره‌آز به ترکیبات آلی این کمپلکس‌ها، مقاومت آن نسبت به آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین افزایش یافته و به علت منافذ بسیار زیاد موجود در مواد آلی، امکان عبور بستره‌ها (اوره و آب) و همچنین خروج محصولات (آمونیم و دی‌اکسید کربن) وجود دارد و بنابراین آنزیم قادر به حفظ فعالیت خود می‌باشد (۸ و ۴۰). در حقیقت بخش مهمی از فعالیت تجزیه‌ای اوره در خاک‌ها به وسیله اوره‌آز خارج سلولی انجام می‌شود که خود از طریق غیرمتحرک شدن بر کلئیدهای آلی و معدنی خاک در برابر عوامل مختلف محیطی پایدار شده است (۳۳). مطالعاتی پیرامون جنبه‌های مختلف غیرمتحرک شدن اوره‌آز بر سطح رس‌ها (۱۹) مواد هوموسی و شبه هوموسی (۷ و ۳۵)، هیدروکسیدهای آلومینیوم (۱۹) و کمپلکس‌های آلی- معدنی (۵ و ۱۷) صورت گرفته است و همگی به‌نوعی بر پایداری قابل توجه آنزیم در حالت جذب شده و بنابراین افزایش اهمیت جنبه اقتصادی آن به لحاظ توان ذخیره‌سازی آنزیم اشاره نموده‌اند (۳۵، ۶۳ و ۶۴). در این میان، یکی از مباحث جالب توجه پیرامون آنزیم‌های جذب شده، تأثیری است که جذب و غیرمتحرک شدن آنزیم بر ویژگی‌های سینتیکی آن

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ویژگی‌های سینتیکی آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده در کمپلکس آنزیم-رس (دو نوع رس نسبتاً خالص سپیولیت و ورمیکولیت) تعیین و بررسی گردید. در این آزمایش، آنزیم اوره‌آز خالص (EC 3.5.1.5, ۳۵ U/mg جامد پودری) و با نقطه ایزو الکتریک 5 (IP)) از شرکت سازنده مواد شیمیایی سیگما آلدریچ (Sigma-Aldrich chemie GmbH Riedstrasse 2, D-89555 STEINHIM) خریداری گردید. کیفیت اوره مورد استفاده نیز در حد عالی (مرک، آلمان) بود. یادآور می‌شود که یک واحد فعالیت آنزیمی (U) شامل مقدار آنزیم مورد نیاز برای هیدرولیز یک میکرومول اوره در یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت نیز به ترتیب از شهرستان یزد و بخش زمین‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد گردآوری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های رس

نمونه رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت به کمک آب از الک ۴۰۰ مش (۳۷ میکرومتر) گذرانده شد. نمونه‌های عبور داده شده از الک، با دستگاه (آسیاب مخلوط‌کن) Mixer mill خرد گردید. نمونه‌های خرد شده، در آغاز با اسیدکلریدریک ۱/۰ مولار شستشو و سپس به مدت ۸ ساعت با محلول کلرید سدیم ۰/۱ مولار اشباع گردیدند. سپس این نمونه‌ها، برای حذف سدیم و کلر محلول، سه مرتبه با آب مقطر شسته شدند. در انتها نمونه‌های سدیم-رس، به درون ظروف پتری دیش استریل منتقل شده و پس از خشک شدن در دمای اتاق، جهت استفاده‌های آتی در ظروف دربسته و در دمای مذکور نگهداری شدند (۱۸).

مطالعه خصوصیات سینتیکی آنزیم اوره‌آز در کمپلکس

به منظور مطالعه خصوصیات سینتیکی آنزیم اوره‌آز در حضور رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت، ابتدا کمپلکس‌های هر یک از رس‌های فوق با آنزیم اوره‌آز تهیه و سپس تغییرات سرعت

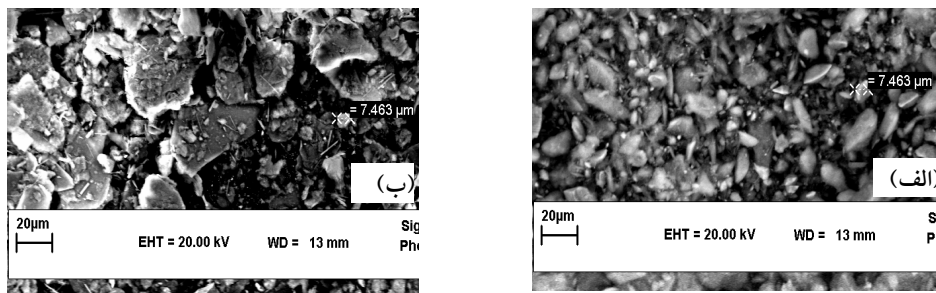
واکنش‌های آنزیمی (اوره‌آز آزاد (Free-U)، کمپلکس اوره‌آز-سپیولیت (Sep-U) و کمپلکس اوره‌آز-ورمیکولیت (Ver-U)) در برابر غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار بستره (اوره)، به‌ازای غلظت ۱ واحد آنزیمی (۰/۰۲۸۵۷ میلی‌گرم آنزیم به ازای ۳۰ میلی‌گرم رس) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ با دو تکرار بررسی شد.

تهیه کمپلکس‌های اوره‌آز-رس

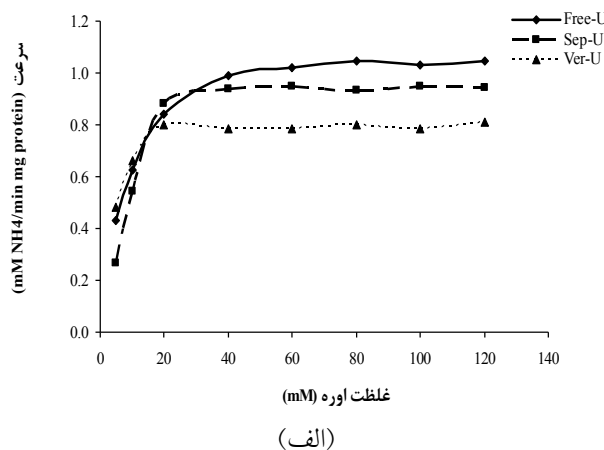
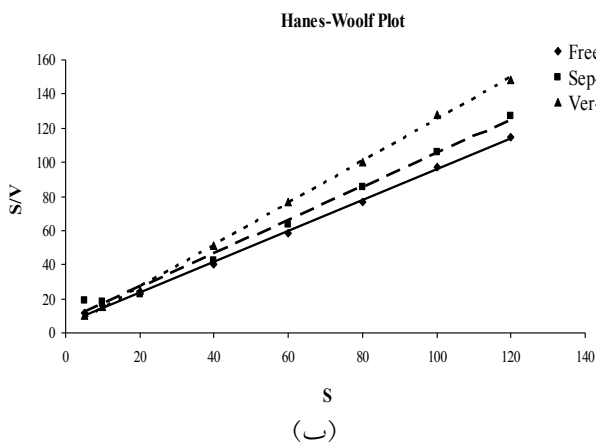
برای تهیه سوسپانسیون‌های اوره‌آز-رس، مقدار ۳۰ میلی‌گرم از هر رس با یک میلی‌لیتر از محلول اوره‌آز-بافر فسفات سدیم (pH=۷) با غلظت ۱ واحد آنزیمی و همچنین یک قطره تولوئن برای توقف فعالیت‌های میکروبی احتمالی موجود ترکیب و نمونه‌ها برای ۲۱ ساعت به‌آرامی و به‌صورت دورانی شیک گردیدند (۱۹ و ۴۱). پس از آماده‌سازی کمپلکس‌ها، فعالیت آنزیمی در نمونه‌های محتوی رس (به تفکیک بخش محلول رویی و سوسپانسیون) و تیمارهای شاهد اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

پس از تهیه کمپلکس‌های آنزیم-رس، به هر یک از نمونه‌های دارای اوره‌آز آزاد و همچنین سوسپانسیون‌ها یک میلی‌لیتر محلول اوره-بافر با غلظت‌های مورد آزمایش (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار) افزوده شد. نمونه‌ها برای ۱۰ دقیقه بر روی شیکر دورانی با ۱۸۰ دور بر دقیقه مخلوط گردیدند (۱۹). در پایان، فعالیت آنزیمی نمونه‌های یاد شده، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. برای این کار، به‌اندازه ۰/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه تیمار شده با محلول اوره-بافر به درون ارلن‌های ۲۵ میلی‌لیتری استریل شده ریخته و فعالیت آنزیمی بر پایه روش چنی و ماریچ (۱۰) که برای برآورد غلظت یون آمونیوم در محلول واکنشی آنزیم بهره‌گیری می‌شود، و به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل WPA S2000UV/Vis اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی همه نمونه‌های آزمایشی در شرایط استاندارد، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به



شکل ۱. الف) تصویر SEM از ذرات رس سپولیت و ب) ورمیکولیت



شکل ۲. الف) نمودار میکائلیس-متن و ب) هانس- وولف برای اوره‌آز آزاد و جذب شده بر سطح رس های سپولیت و ورمیکولیت

شده بر سطح رس های سپولیت و ورمیکولیت را نشان می دهد. نتایج آزمایش نشان داد که آنزیم اوره‌آز در هر دو حالت آزاد و جذب شده از سینتیک میکائلیس-متن پیروی می نماید. در معادله میکائلیس-متن (معادله ۱)، V_{max} بیانگر سرعت بیشینه واکنش آنزیمی و K_m (ثابت میکائلیس) به نوعی تمایل آنزیم به بستره را نشان داده و بیانگر غلظتی از بستره است که در آن سرعت واکنش آنزیمی معادل با نیمی از سرعت بیشینه می باشد (۲۵ و ۲۰).

پارامترهای این معادله براساس معادلات لاین ویور-بارک با ترسیم معکوس سرعت ($\frac{1}{V}$) در برابر معکوس غلظت بستره ($\frac{1}{S}$)، هانس- وولف با ترسیم نسبت غلظت به سرعت ($\frac{S}{V}$) در برابر غلظت بستره (S) و ادی - هافستی با ترسیم سرعت (V) در برابر نسبت سرعت به غلظت ($\frac{V}{S}$) در جدول (۱) نشان داده شده است (۱۰، ۱۹ و ۵۱). نمود ترسیمی رگرسیون

دور از نور مستقیم (برای حذف عوامل احتمالی مؤثر بر فعالیت آنزیمی) انجام گردید. به موازات اندازه گیری فعالیت آنزیمی نمونه ها، منحنی های استاندارد نیز رسم و مقادیر آنزیم جذب شده (واحد فعال) مطابق محاسبات اختصاصی تعیین گردید.

نتایج و بحث

برای دستیابی به اندازه دانه ای مناسب از رس های یاد شده، تصاویر SEM در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد آماده شد (شکل ۱). همان طور که در تصاویر مشخص است، سپولیت دارای دانه بندی کشیده (کمی سوزنی شکل) اما ورمیکولیت ریختی ورقه ای دارد. با توجه به تصاویر SEM، محدوده ابعاد ذرات رس سپولیت و ورمیکولیت به طور متوسط کمتر از ۳۷ میکرومتر تعیین گردید.

شکل (۲-الف)، نمودار سینتیک اوره‌آز آزاد و غیرمتحرک

جدول ۱. خصوصیات سینتیکی آنزیم اوره آز آزاد و جذب شده بر سطوح دو رس سپیولیت و ورمیکولیت

اوره آز- ورمیکولیت				اوره آز- سپیولیت				اوره آز آزاد				معادله
SSRes ($\times 10^{-3}$)	R ²	K _m	V _{max}	SSRes ($\times 10^{-3}$)	R ²	K _m	V _{max}	SSRes ($\times 10^{-3}$)	R ²	*K _m	*V _{max}	
۱۲/۶	۰/۹	۳/۸	۰/۹	۲۷۹/۲	۰/۹	۲۱/۶	۱/۵	۸/۵	۰/۹	۸/۸	۱/۲	لاین ویور- بارک
۱۲/۲	۰/۹	۲/۱	۰/۸	۴۹/۰	۰/۹	۷/۶	۱/۰	۶/۲	۰/۹	۶/۷	۱/۱	هانس- وولف
۹/۷	۰/۹	۳/۵	۰/۹	۵۸/۱	۰/۷	۱۲/۱	۱/۲	۷/۲	۰/۹	۸/۷	۱/۲	ادی- هافستی
-	-	۳/۱	۰/۹	-	-	۱۳/۸	۱/۲	-	-	۸/۱	۱/۲	میانگین
-	-	۰/۳		-	-	۰/۱		-	-	۰/۱		V _{max} / K _m

mM:K_m, mM NH₄ / min mg protein : V_{max} *

غلظت اوره، سرعت واکنش آنزیمی در هر دو حالت آزاد و جذب شده (کمپلکس) افزایش یافت با این وجود بالاترین سطوح افزایش سرعت واکنش، برای آنزیم اوره آز آزاد و پس از آن به ترتیب برای کمپلکس های اوره آز با سپیولیت و ورمیکولیت مشاهده گردید (شکل ۲-ب).

همچنین، براساس نتایج حاصل از نمودار هانس- وولف، متوسط سرعت بیشینه (V_{max}) برای آنزیم اوره آز آزاد بیشتر از آنزیم های جذب شده بر سطوح رس های سپیولیت و ورمیکولیت بود (جدول ۱) که این مقدار برای اوره آز آزاد معادل با $0.1 \text{ mM NH}_4 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ محاسبه گردید. از طرفی، در حالت جذب شده نیز بیشترین مقادیر V_{max} به ترتیب برای اوره آز جذب شده بر سطح سپیولیت ($1.0 \text{ mM NH}_4 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) و سپس ورمیکولیت ($0.8 \text{ mM NH}_4 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) مشاهده گردید. این امر نشان می دهد که احتمالاً جذب اوره آز بر سطح رس سپیولیت در مقایسه با ورمیکولیت، فعالیت آنزیم را نسبت به حالت آزاد کمتر تحت تأثیر قرار می دهد. جاینفردا و همکاران (۱۹) نیز گزارش نمودند که جذب اوره آز بر سطح مونتموریلونیت منجر به کاهش V_{max} در مقایسه با اوره آز آزاد می شود. از طرفی، برخی از مطالعات کاهش V_{max} را پس از غیرمتحرک شدن فسفاتاز اسیدی و نیز اوره آز بر کائولینیت، مونتموریلونیت و ایلیت گزارش نموده اند (۲۳ و ۴۳). مطالعات صداقت و همکاران (۵۰) نیز کاهش ۴/۲ برابری در V_{max} و افزایش ۳/۳

خطی داده های معادله میکائیلیس- منتن، بیشترین تطابق را با بیشترین مقادیر ضرایب تبیین (R²) و کمترین مقادیر مجموع مربعات باقی مانده (SSRes) برای اوره آز در حالت آزاد و کمپلکس، با منحنی هانس- وولف نشان داد (شکل ۲-ب). استفاده از معادله هانس- وولف که در حقیقت شکل اصلاح شده معادله میکائیلیس- منتن می باشد، روشی معمول جهت تعیین پارامترهای سینتیکی واکنش آنزیم آزاد و جذب شده، در غلظت های مختلف بستره می باشد (معادله ۲).

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad [1]$$

$$\frac{[S]}{V} = \frac{1}{V_{\max}}[S] + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad [2]$$

در نمودار رسم شده بدین روش، شیب خط راست معادل با $\frac{1}{V_{\max}}$ و محل تلاقی نمودار با محور Y، $\frac{K_m}{V_{\max}}$ و همچنین محل تلاقی نمودار با محور X، -K_m می باشد. از مهم ترین ویژگی های این نمودار می توان به یکنواخت بودن توزیع خطها در این روش نسبت به روش های لاین ویور- بارک و ادی- هافستی اشاره نمود (۵۲).

نتایج آزمایش، تغییر مقادیر V_{max} و K_m را پس از جذب اوره آز بر سطوح رس های سپیولیت و ورمیکولیت در مقایسه با آنزیم آزاد نشان داد (جدول ۱). صداقت و همکاران (۵۰) نیز احتمال تغییر در مقادیر K_m و V_{max} را پس از برهمکنش مکان های فعال آنزیم ها با جاذب ها گزارش نموده اند. براساس نتایج حاصل از منحنی هانس- وولف، با افزایش

غالب بودن پیوندهای کووالانسی بین آنزیم و رس در مقایسه با سایر پیوندها دلالت می‌نماید (۴۹). نتایج آزمایشات مختلف نشان می‌دهند که تأثیر جذب آنزیم بر فعالیت آن بسته به نوع آنزیم و نوع رس متفاوت است. جاینفردا و همکاران گزارش نمودند که مقادیر K_m آنزیم اوره‌آز پس از جذب بر سطح مونتوریلونیت کاهش را نشان می‌دهد (۱۹). از طرفی، مطالعات رانگ و اونگ-جیان نشان داد که ثابت میکائیلیس گلوکوآمیلاز جذب شده بر سطح مونتوریلونیت، برابر بیشتر از آنزیم آزاد است (۴۵). همچنین مطالعات کاراسکو و همکاران نشان داد که جذب فسفات از قلیایی بر سطح سپیولیت سدیمی مقادیر K_m را از $2/36 \text{ mM}$ در محلول آبی به $18/32 \text{ mM}$ برای آنزیم غیرمتحرک شده افزایش داد (۹). البته گزارشاتی نیز مبنی بر تأثیر نه‌چندان زیاد جذب آنزیم بر تمایل آن به سمت بستره وجود دارد. به‌عنوان مثال سانجای و سوگونان گزارش نمودند که جذب گلوکوآمیلاز بر سطح مونتوریلونیت تمایل آنزیم به سمت بستره را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد (۴۹).

لازم به‌ذکر است که K_m از جمله مهم‌ترین پارامترهایی است که مطالعه آن در مقیاس جهانی خصوصاً برای آنزیم‌های هیدرولیزکننده خارج سلولی، به‌دلیل اطلاعاتی که از تمایل آنزیم به بستره‌های مختلف به‌دست می‌دهد بسیار حائز اهمیت است (۱۶، ۵۷ و ۶۵).

در این مطالعه، آنزیم‌های اوره‌آز غیرمتحرک شده بر سطوح سپیولیت و ورمیکولیت نسبت به آنزیم آزاد، با سرعت کمتری اوره را به دی‌اکسید کربن و آمونیاک تبدیل نمودند. این امر از دیدگاه کشاورزی می‌تواند حائز اهمیت باشد. به‌دلیل وجود پتانسیل تلفات نیتروژن حاصل از کاربرد کود اوره، به‌ویژه اوره گرانوله توسط فرآیند تبخیر بر روی زمین‌های فاقد عملیات خاکورزی، توسعه بازدارنده‌های مؤثر آنزیم اوره‌آز و بنابراین بهبود کارایی استفاده از نیتروژن حاصل از اوره دارای اهمیت است. در این میان، شاید بتوان از رس‌های ورمیکولیت و سپیولیت و به‌ویژه ورمیکولیت (به‌دلیل اثر کاهشی بیشتر بر

برابری در K_m را برای آنزیم فسفاتاز قلیایی غیرمتحرک شده بر سطح سپیولیت سدیمی در مقایسه با آنزیم آزاد نشان داد. آنها این امر را به برخی تغییرات احتمالی در ساختار طبیعی آنزیم به محض غیرمتحرک‌شدن بر سطح کانی رسی نسبت دادند. این در حالی است که مطالعات مک بول و اتو (۳۲) پیرامون تأثیر کانی‌های رسی اشباع شده با کلسیم بر فعالیت فسفاتاز اسیدی، افزایش V_{max} این آنزیم را در حضور مونتوریلونیت نشان داد در حالی که حضور ایلیت و کائولینیت منجر به افزایش این پارامتر نگردید. آنها در این باره چنین استدلال نمودند که ظاهراً مکان‌های واکنش‌پذیر فسفاتاز اسیدی پس از جذب بر مونتوریلونیت در مقایسه با ایلیت یا کائولینیت بیشتر پوشیده و حفظ شده بودند (۳۲). براساس نتایج به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی و تفرق اشعه ایکس، برای لیزوزیم و آریل سولفاتاز، این امر همچنین ممکن است تا حدودی بر مبنای فرآیند تثبیت درون شبکه‌ای اضافی بخش قابل توجهی از مولکول‌های آنزیم شرح داده شود (۱ و ۲۴). به‌علاوه، نقش سطح ویژه و چگالی بار سطحی رس نیز نباید نادیده گرفته شود (۲۱). تنگ نیز افزایش ثابت‌های سرعت معادله میکائیلیس-متن را همزمان با جذب آنزیم بر سطوح رس‌ها، در مقایسه با آنزیم آزاد گزارش نمود (۶۰).

همچنین مقادیر K_m براساس نتایج آزمایش و مطابق نمودار هانس-وولف برای حالت آزاد و جذب شده آنزیم اوره‌آز متفاوت بود. مقادیر K_m برای اوره‌آز جذب شده بر سطح ورمیکولیت ($2/1 \text{ mM}$) و سپیولیت ($7/6 \text{ mM}$) به ترتیب کمتر و بیشتر از اوره‌آز آزاد ($6/7 \text{ mM}$) بود. این امر بر این حقیقت دلالت دارد که تمایل اوره‌آز برای بستره اوره پس از جذب شدن بر سطح ورمیکولیت به مراتب بسیار بیشتر از اوره‌آز آزاد و همچنین اوره‌آز جذب شده بر سطح سپیولیت می‌باشد. نتایج مشابه به‌وسیله راتو و همکاران نیز گزارش شده است (۴۲). مقادیر K_m بالاتر نشان دهنده تمایل کمتر آنزیم برای یک بستره خاص می‌باشد (۲۰ و ۳۲). از طرفی، این افزایش تمایل آنزیم به بستره پس از جذب شدن بر سطح ورمیکولیت به‌نوعی بر

جدول ۲. ثابت و کارایی کاتالیزوری آنزیم اوره‌آز در حالت آزاد و جذب شده بر سطوح دو رس سپیولیت و ورمیکولیت

اوره‌آز- ورمیکولیت		اوره‌آز- سپیولیت		اوره‌آز آزاد		معادله
Efficiency Kcat/Km (s ⁻¹ M ⁻¹)	Kcat (×۱۰ ^{-۱}) (s ⁻¹)	Efficiency Kcat/Km (s ⁻¹ M ⁻¹)	Kcat (×۱۰ ^{-۱}) (s ⁻¹)	Efficiency Kcat/Km (s ⁻¹ M ⁻¹)	Kcat (×۱۰ ^{-۱}) (s ⁻¹)	
۶/۹	۰/۳	۲/۱	۰/۴	۱۳۴/۳	۱۲/۰	لاین ویور- بارک
۱۱/۵	۰/۲	۴/۰	۰/۳	۱۶۷/۰	۱۱/۰	هانس- وولف
۷/۵	۰/۳	۲/۹	۰/۴	۱۳۵/۷	۱۲/۰	ادی- هافستی
۰/۷		۰/۹		-		η (هانس- وولف)

نسبت‌هایی بین $10^8 - 10^9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ می‌باشد. کارایی برخی از آنزیم‌ها می‌تواند عملاً به این دامنه نزدیک شده که در این صورت هر برخورد آنزیم و بستره منجر به تشکیل کمپلکس آنزیم- بستره شده و بنابراین کارایی چنین آنزیم‌هایی نسبتاً کامل در نظر گرفته می‌شود (۴ و ۱۲). براساس نتایج آزمایش، بین مقادیر کارایی کاتالیزوری اوره‌آز آزاد و اوره‌آز جذب شده بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت تفاوت قابل توجهی مشاهده شد (جدول ۲). بیشترین کارایی کاتالیزوری برای اوره‌آز در حالت آزاد ($167/0 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) و پس از آن به ترتیب برای آنزیم‌های جذب شده بر سطح ورمیکولیت ($11/5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) و سپیولیت ($7/5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) (۴/۰) به دست آمد. بر این اساس کارایی اوره‌آز در حضور ورمیکولیت در حدود ۲/۹ برابر بیشتر از کارایی آن در حضور سپیولیت بود. لازم به ذکر است که نسبت V_{\max}/K_m نیز گاهی به عنوان معیاری از کارایی کاتالیزوری یک آنزیم در نظر گرفته می‌شود (۴۴). در این راستا، نتایج آزمایش نشان دادند که مقدار عددی این نسبت برای واکنش آنزیمی در حضور ورمیکولیت بیشتر از این نسبت در حضور سپیولیت بود (جدول ۱) که این امر نیز بالاتر بودن کارایی اوره‌آز در حضور ورمیکولیت را تأیید می‌نماید.

یکی دیگر از پارامترهای مهمی که مبین نقش فرآیند پخشیدگی در واکنش است، فاکتور اثربخشی (η) می‌باشد (معادله ۶) (۴۹).

$$\eta = \frac{\text{سرعت آنزیم‌های غیرمتحرک}}{\text{آنزیم آزاد}} \quad [6]$$

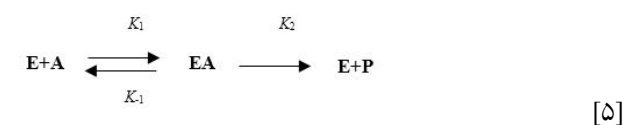
سرعت تجزیه اوره توسط اوره‌آز غیرمتحرک شده، در مقایسه با اوره‌آز آزاد) در عین حفظ فعالیت آنزیم بهره جست. از طرفی، تمایل اوره‌آز جذب شده بر سطح ورمیکولیت به اوره، بیشتر از اوره‌آز جذب شده بر سطح سپیولیت بود. بنابراین به نظر می‌رسد که سپیولیت، اثر بازدارندگی بهتری نسبت به ورمیکولیت دارد. بنابراین در این انتخاب، هر دو پارامتر سینتیکی K_m و V_{\max} تاثیرگذار بوده و همزمان باید مد نظر قرار گیرند.

از جمله مهم‌ترین کاربردهای پارامترهای معادله میکائیلیس- متن (K_m و V_{\max})، تعیین کارایی آنزیم با استفاده از نسبت کارایی کاتالیزوری می‌باشد (معادله ۳).

$$\frac{K_{cat}}{K_m} = \text{time}^{-1} \text{conc}^{-1} (\text{S}^{-1} \text{mM}^{-1}) \quad [3]$$

$$K_{cat} = \frac{V_{\max}}{E_t} \quad [4]$$

در این نسبت K_{cat} ، ثابت کاتالیزوری (ثابت سرعت تبدیل کمپلکس آنزیم- بستره به محصول) (معادله ۴) و K_m ثابت میکائیلیس- متن می‌باشد. در حقیقت این نسبت (K_{cat}/K_m) معیاری از اختصاصی بودن بستره برای یک واکنش آنزیمی خاص و نیز کارایی کاتالیزوری آنزیم می‌باشد. زمانی که K_{cat} به طور مشخصی بزرگ‌تر از K_m در معادله واکنش آنزیمی باشد (معادله ۵)، فرآیند کاتالیتیکی بسیار سریع بوده و کارایی آنزیم به توانایی آن برای پیوند با بستره بستگی خواهد داشت.



براساس قوانین پخشیدگی، حد بالایی برای چنین

ورمیکولیت سرعت بیشینه (V_{max}) و ثابت میکائیلیس (K_m) را در مقایسه با اوره‌آز آزاد تحت تأثیر قرار داد به نحوی که بیشترین مقدار V_{max} پس از اوره‌آز آزاد، در کمپلکس اوره‌آز-سپیولیت و کمترین میزان K_m نیز در کمپلکس اوره‌آز-ورمیکولیت مشاهده گردید. در این میان، تغییرات احتمالی در ساختار طبیعی آنزیم به محض غیرمتحرک شدن، حفظ و یا تغییر جایگاه‌های فعال آنزیم پس از جذب بر سطح رس، تثبیت درون شبکه‌ای مولکول‌های آنزیم، سطح ویژه و چگالی بار سطحی رس و ... از جمله عواملی هستند که منجر به رفتارهای متفاوت آنزیم پس از جذب شدن بر سطوح رس‌ها می‌گردند. در هر حال، به نظر می‌رسد که جذب اوره‌آز بر سطوح کانی‌های مورد مطالعه، به دلیل کاهش سرعت تبدیل اوره به دی‌اکسید کربن و آمونیاک در مقایسه با آنزیم آزاد، پتانسیل مطالعه جهت کاربرد به منظور کاهش تلفات اوره ناشی از تبخیر در اراضی فاقد خاک‌ورزی را دارا است. همچنین نتایج نشان دادند که بیشترین کارایی کاتالیزوری پس از آنزیم اوره‌آز آزاد به ترتیب متعلق به آنزیم اوره‌آز در حضور ورمیکولیت و سپیولیت بود. از سوی دیگر، نتایج حاصل از آزمایش نشان دادند که فاکتور اثربخشی برای اوره‌آز جذب شده بر سطح سپیولیت بیشتر از اوره‌آز جذب شده بر سطح ورمیکولیت بود و بنابراین احتمالاً فرآیند پخشیدگی در حضور رس سپیولیت بهتر از ورمیکولیت صورت می‌پذیرد. به نظر می‌رسد که در آزمایشات آنزیم-رس، نوع رس، نوع آنزیم مورد بررسی و همچنین شرایط انجام آزمایش، از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده بر نتایج حاصله باشند.

در شرایطی که پخشیدگی به‌طور کامل اتفاق بیفتد، مقدار $\eta=1$ می‌شود. چنین حالتی در مورد واکنش‌های همگن و تنها با حضور آنزیم آزاد اتفاق می‌افتد (۴۹). این فاکتور برای بیان مقاومت‌های داخلی و خارجی در سیستم‌های متخلخل، به‌ویژه برای واکنش‌هایی که از سینتیک درجه اول پیروی می‌نمایند نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳ و ۴۶). وجود مقاومت پخشیدگی توده‌ای در اطراف آنزیم می‌تواند کارایی کاتالیست را به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار دهد (۱۳).

سینتیک آنزیم پیوند شده به یک ذره متخلخل می‌تواند توسط مقاومت پخشیدگی خارجی و داخلی تحت تأثیر قرار گیرد که به ترتیب با انتقال بستره و محصولات از محلول اطراف به سطح بیرونی آنزیم-ذره و انتقال درونی این گونه‌ها به درون سیستم متخلخل در ارتباط است (۵۴). نتایج حاصل از آزمایش نشان دادند که فاکتور اثربخشی η برای اوره‌آز جذب شده بر سطح سپیولیت (۰/۹) بیشتر از اوره‌آز جذب شده بر سطح ورمیکولیت (۰/۷) بود (جدول ۲). بر این اساس، به نظر می‌رسد که فرآیند پخشیدگی در حضور رس سپیولیت بیشتر و کاملتر از این فرآیند در حضور ورمیکولیت صورت می‌پذیرد.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج این پژوهش، جذب اوره‌آز بر سطوح هر دو رس سپیولیت و ورمیکولیت، فعالیت آنزیمی را در مقایسه با آنزیم آزاد تحت تأثیر قرار داد. نتایج نشان دادند که آنزیم اوره‌آز در هر دو حالت آزاد و جذب شده از سینتیک میکائیلیس-منتن پیروی می‌نمود. جذب اوره‌آز بر سطوح هر دو رس سپیولیت و

منابع مورد استفاده

1. Albert, J. T. and R. D. Hatter. 1973. Adsorption of lysozyme and ovalbumin by clay: effect of clay suspension pH and clay mineral type. *Soil. Sci.* 115: 130-136.
2. Allison, S. D., T. B. Gartner, K. Holland, M. Weintraub and R. L. Sinsabaugh. 2007. Soil enzymes: linking proteomics and ecological process. PP: 704-711. *In: Hurst, C. J., J. L. Garland and A. L. Mills. (Eds.), Manual of Environmental Microbiology, ASM Press, 3rd Edition, Washington D. C.*
3. Badiane, N. N. Y., J. L. Chotte, E. Pate, D. Masse and C. Rouland. 2001. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Appl. Soil. Ecol.* 18: 229-238.
4. Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer. 2008. *Enzymes: Kinetics, Lecture 11. Chapter 8.* PP: 216-225. 6th Ed., BIOC 460.

5. Boyd, S. A. and M. M. Mortland. 1985. Urease activity on a clay-organic complex. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 49: 619-622.
6. Bremner, J. M. and R. L. Mulvaney. 1978. Urease activity in soils. *In: Burns, R. G. (Ed.), Soil Enzymes*, Academic Press, London.
7. Burns, R. G. 1986. Interaction of enzyme with soil mineral and organic colloids. PP: 429-452. *In: Huang, P. M. (Ed.), Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*, Soil Science Society of America, Madison.
8. Burns, R.G., A. H. Pukite and A. D. McLaren. 1972. Concerning the location and persistence of soil urease. *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.* 36: 308-311.
9. Carrasco, M. S., J. C. Rad and S. González-Carcedo. 1995. Immobilization of alkaline phosphatase by sorption on Na-sepiolite. *Bioresource. Technol.* 51: 175-181.
10. Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8: 130-132.
11. Dharmakeerthi, R. S. and M. W. Thenabadu 1996. Urease activity in soils: A review. *J. Natn. Sci. Coun. Sri Lanka.* 24: 159-195.
12. Estevez, M., J. Skarda, J. Spencer, L. Banaszak and T. M. Weaver. 2002. X-ray crystallographic and kinetic correlation of a clinically observed human fumarase mutation. *Protein. Sci.* 11: 1552-1557.
13. Fink, D. J., N. A. Tsung- Yen and J. S. Schultz. 1973. Effectiveness factor calculations for immobilized enzyme catalysts. *Biotechnol. Bioeng.* 15: 879-888.
14. Finzi, A. C., R. L. Sinsabaugh, T. M. Long and M. P. Osgood. 2006. Microbial community responses to atmospheric CO₂ enrichment in a Pinus taeda forest. *Ecosystems* 9: 215-226.
15. Gautney, J., A. R. Barnard, D. B. Penney and Y. K. Kim. 1986. Solid-state decomposition kinetics of phenyl phosphorodiamidate. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 50: 792-797.
16. German, D. P., M. N. Weintraub, A. S. Grandy, C. L. Lauber, Z. L. Rinkes and S. D. Allison. 2011. Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil. Biol. Biochem.* 43: 1378- 1397.
17. Gianfreda, L., A. De Cristofaro, M. A. Rao and A. Violante. 1995. Kinetic behavior of synthetic organo- and organo-mineral-urease complexes. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 59: 811-815.
18. Gianfreda, L., M. A. Rao and A. Violante. 1991. Invertase (β -fructosidase): effects of montmorillonite, Al-hydroxide and Al(OH)_x-montmorillonite complex on activity and kinetic properties. *Soil. Biol. Biochem.* 26: 581-587.
19. Gianfreda, L., M. A. Rao and A. Violante. 1992. Adsorption, activity and kinetic properties of urease on montmorillonite, aluminium hydroxide and Al (OH)_x-montmorillonite complexes. *Soil. Biol. Biochem.* 24: 51-58.
20. Gopinath, S. and S. Sugunan. 2007. Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Appl. Clay. Sci.* 35: 67-75.
21. Harter, R. D. and G. Stotzky. 1971. Formation of clay-protein complexes. *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.* 35: 383-389.
22. Hendrieks, S. B. 1941. Base exchange of the clay mineral montmorillonite for organic cations and its dependence upon adsorption due to van der Waals forces. *J. Phys. Chem.* 45: 65-81.
23. Huang, Q. and H. Shindo. 2000. Inhibition of free and immobilized acid phosphatase by zinc. *Soil. Sci.* 165: 793-802.
24. Hughes, J. D. and G. H. Simpson. 1978. Arylsulphatase-clay interactions. II. The effect of kaolinite and montmorillonite on arylsulphatase activity. *Aust. J. Soil. Res.* 16: 35-40.
25. Johnson, K. A. and R. S. Goody. 2011. The original michaelis constant: translation of the 1913 michaelis-menten paper. *Biochemistry* 50: 8264-8269.
26. Kiss, S., M. Dragan-Bularda and D. Radulescu. 1975. Biological significance of enzymes in soil. *Adv. Agron.* 27: 25-91.
27. Ladd, J. N. and J. H. A. Butler. 1975. Humus-enzyme systems and synthetic, organic polymer-enzyme analogs. PP: 143-194. *In: Paul, E. P and A. D. McLaren. (Eds.), Soil Biochemistry*, Dekker, New York.
28. Ladd, J. N. and R. B. Jackson. 1982. Biochemistry of ammonification. PP: 173-228. *In: Stevenson, F. J. (Ed.), Nitrogen in agricultural soils*, Agronomy series, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
29. Lai, C.M. and M. A. Tabatabai. 1992. Kinetic parameters of immobilized urease. *Soil. Biol. Biochem.* 24: 225-228.
30. Lipson, D.A., R. F. Wilson and W. Oechel. 2005. Effects of elevated atmospheric CO₂ on soil microbial biomass, activity, and diversity in a Chaparral ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8573-8580.
31. Makboul, H. E. and J. C. G. Ottow. 1978. The protective effect of buffers on the inactivation of urease sorbed to montmorillonite and kaolinite clay soils and minerals. PP: 649-659. *In: Krumbein, W. E. (Ed.), Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology*, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan.
32. Makboul, H. E. and J. C. G. Ottow. 1979b. Michaelis Constant (K_m) of Acid Phosphatase as Affected by Montmorillonite, Illite, and Kaolinite Clay Minerals. *Microb. Ecol.* 5: 207-213.

33. Marzadori, C., S. Miletta, C. Gessa and S. Ciurli. 1998. Immobilization of Jack Bean Urease on hydroxyapatite: Urease immobilization in alkaline soils. *Soil. Biol. Biochem.* 30: 1485-1490.
34. Namjesnik-Dejanovic, K., P. A. Maurice, G. R. Aiken, S. Cabaniss, Y. P. Chin and M. J. Pullin. 2000. Adsorption and fractionation of a muck fulvic acid on kaolinite and goethite at pH 3, 7, 6, and 8. *Soil. Sci.* 165: 545-559.
35. Nannipieri, P., B. Ceccanti, S. Cervelli and P. Sequi. 1978. Stability and kinetic properties of humus-urease complexes. *Soil. Biol. Biochem.* 10: 143-147.
36. Nannipieri, P., P. Sequi and P. Fusi. 1996. Humus and enzyme activity. PP: 293-328. *In: Piccolo, A. (Ed.), Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*, Elsevier, Amsterdam.
37. Nielsen, K. M., L. Calamai and G. Pietramellara. 2006. Stabilization of extracellular DNA and proteins by transient binding to various soil components. PP: 141-157. *In: Nannipieri, P. and K. Smalla. (Eds.), Nucleic Acids and Proteins in Soil*, Springer Verlag, Heidelberg, Germany.
38. Norde, W. 1993. Proceedings of an International Symposium Held in Maastricht. PP: 3-11. *In: Twed, W. J. J., A. van den Harder and R. M. Buitelaar. (Eds.), Stability and Stabilization of Enzymes*, The Netherlands, Elsevier Science, Amsterdam.
39. Paulson, K. N. and L. T. Kurtz. 1970. Michaelis constant of soil urease. *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.* 340: 70-72.
40. Pettit, N. M., A. R. J. Smith, R. B. Freedman and R. G. Burns. 1976. Soil urease: activity, stability and kinetic properties. *Soil. Biol. Biochem.* 8: 479-484.
41. Pinnavaia, T. J., M. M. Mortland and S. A. Boyd. 1986. Clay- Enzyme complexes and method for preparing same. Michigan State University, East Lansing, Mich. Pinnavia, American Chemical Society Symposium Series 192:241-253.
42. Rao, M. A., A. Violante and L. Gianfreda. 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organo-mineral complexes: kinetics and stability. *Soil. Biol. Biochem.* 32: 1007-1014.
43. Rao, M. A., L. Gianfreda, F. Filmena and A. Violante. 1996. Interactions of acid phosphatase with clays, organic molecules and organic mineral complexes. *Soil. Sci.* 161: 751-760.
44. Rawn, J. D. 1989. *Biochemistry*. Patterson, New York.
45. Rong, Y and S. Ong-Jian. 2008. Study on the immobilization of glucoamylase on montmorillonite K-10 by absorption. *J. South China Normal Univ. Natur. Sci. Ed.* 103-128.
46. Rony, P. R. 1971. Multiphase catalysis. II. Hollow fiber catalysts. *Biotechnol. Bioeng.* 13: 431-447.
47. Safari Sinegani, A. A., G. Emtiazi and H. Shariatmadari. 2001. PP: 104-105. *In: Faz, A., Ortiz, R., Mermut, A. R. (Eds.), International Symposium on Sustainable Use and Management of Soils in Arid and Semiarid Regions*, Vol. II.
48. Sahrawat, K. L. 1980. Control of urea hydrolysis and nitrification in soil by chemicals-prospects and problems. *Plant. Soil.* 57: 335-352.
49. Sanjay, G and S. Sugunan. 2005. Glucoamylase immobilized on montmorillonite: Synthesis, characterization and starch hydrolysis activity in a fixed bed reactor. *Catal. Commun.* 6: 525-530.
50. Sedaghat, M. E., M. Ghiaci, H. Aghaei and S. Soleimanian-Zad. 2009. Enzyme immobilization. Part 4. Immobilization of alkaline phosphatase on Na-sepiolite and modified sepiolite. *Appl. Clay. Sci.* 46: 131-135.
51. Segel, I. H. 1975. *Enzyme Kinetics*. Wiley, New York.
52. Silverman, R. B. 2000. *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. Academic Press. CSA.
53. Sinsabaugh, R. L., M. E. Gallo, C. Lauber, M. Waldrop and D. R. Zak. 2005. Extracellular enzyme activities and soil carbon dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry.* 75: 201-215.
54. Siso, M. I. G., M. Graber, J. S. Condoret and D. Cornbes. 1990. Effect of diffusional resistances on the action pattern of immobilized alpha-amylase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 48: 185-200.
55. Skujins, J. 1978. History of abiotic soil enzyme research. PP: 1-50. *In: Burns, R. G. (Ed.), Soil Enzymes*, Academic Press, New York.
56. Skujins, J. J. 1976. Extracellular enzymes in soil. *CRC. Crit. Rev. Microbiol.* 6: 383-421.
57. Stone, M. M., M. S. Weiss, C. L. Goodale, M. B. Adams, I. J. Fernandez, D. P. German and S. D. Allison. 2012. Temperature sensitivity of soil enzyme kinetics under N-fertilization in two temperate forests. *Global. Change. Biol.* 18: 1173-1184.
58. Stotzky, G. 1986. Influence of soil mineral colloids and metabolic processes, growth adhesion, and ecology of microbes and viruses. PP: 305-428. *In: Huang, M. and M. Schnitzer. (Eds.), Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*, Special Publication, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
59. Tabatabai, M. A. 1973. Michaelis constants of urease in soils and soil fractions. *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.* 37: 707-710.
60. Theng, B. K. G. 2012. Chapter 8-Proteins and Enzymes in: Formation and Properties of Clay-Polymer Complexes.

Developments in Clay Science. 4: 245-318.

61. Tietjen, T. and R. G. Wetzel. 2003. Extracellular enzyme-clay mineral complexes: Enzyme adsorption, alteration of enzyme activity, and protection from photodegradation. *Aquat. Ecol.* 37: 331-339.
62. Zantua, M. I. and J. M. Bremner. 1976. Production and persistence of urease activity in soils. *Soil. Biol. Biochem.* 8: 369-374.
63. Zantua, M. I. and J. M. Bremner. 1977. Stability of urease in soils. *Soil. Biol. Biochem.* 9: 135-140.
64. Zhai, R., B. Zhang, L. Liu, Y. Xie, H. Zhang and J. Liu. 2010. Immobilization of enzyme biocatalyst on natural halloysite nanotubes. *Catal. Commun.* 12: 259-263.
65. Zhang, Y. L., L. J. Chen, C. X. Sun, D. P. Li, Z. J. Wu and Z. H. Duan. 2010. Kinetic and thermodynamic properties of hydrolases in northeastern China soils affected by temperature. *Agrochimica* 54: 232-244.

Kinetic Properties of Urease Enzyme in the Presence of Sepiolite and Vermiculite Clays

H. Rahmani*, A. Lakzian, A. R. Karimi and A. Halajnia¹

(Received: July 13-2012 ; Accepted: May 10-2016)
DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.20.78.1

Abstract

Urea is one of the most commonly used nitrogen fertilizers in agricultural lands. The fate of this fertilizer in soils is greatly related to the soil urease enzyme activity, while this enzyme commonly exists in the adsorbed state on the surface of soil colloids, and especially clay minerals. In order to examine the kinetic properties of free and adsorbed Urease on the surface of sepiolite and vermiculite, an experiment was carried out with eight levels of urea concentration (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 and 120 mM). This experiment was done with enzyme concentration of 1 unit in temperature of 25°C and pH=7. Adsorption of urease on the clay surfaces affected its kinetic properties compared to the free state. The results showed that urease enzyme obeyed Michaelis-Menten kinetic in both free and adsorbed states on the clay surfaces. Except free urease, the highest and lowest values of V_{max} and K_m were observed in urease-sepiolite and urease-vermiculite complexes, respectively. Also, the results showed that except free urease, the highest levels of Catalytic Efficiency were related to urease in the presence of vermiculite and sepiolite, respectively. The Effectiveness Factor was more for adsorbed urease on the sepiolite surface than adsorbed urease on the vermiculite surface, and the fact somehow suggests more complete diffusion in the presence of sepiolite.

Keywords: Kinetic properties, Sepiolite, Urea, Urease, Vermiculite.

1. Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Ferdowsi Univ. of Mashhad, Mashhad, Iran.

*: Corresponding Author, Email: soilsun65@yahoo.com