

فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنپیش 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 روشن تر شدن سهم هر یک از بخش‌های آلی و کانی خاک از فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنپیش شده در آن انجام گردید. آنزیم سلولاز روزی برخی از نگهدارنده‌های آلی و کانی خاک بی‌جنپیش شد. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپیش شده در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری شد.

پایداری آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپیش 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 بی‌جنپیش شده بودند تاچیز بود. در برابر آن، کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که روی خاک و کانی‌های آن بی‌جنپیش شده بودند نسبتاً زیاد بود. از سوی دیگر، فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپیش 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 بی‌جنپیش شده‌اند. پوشاندن هر یک از نگهدارنده‌های کانی‌های رسی، خاک و آویسل با هیدروکسید الومینیم (چهار میلی‌مول بر گرم) به اندازه چشم‌گیری بر مقدار و فعالیت آنزیم‌های بی‌جنپیش شده روی آنها افزود. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپیش شده روی خاک و کانی‌های هم‌بیون شده با کلسیم بیشتر از آنزیم‌های بی‌جنپیش شده روی خاک و کانی‌های هم‌بیون شده با پاتاسیم 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 هم‌بیون کننده بر آنزیم‌های بی‌جنپیش شده روی آویسل چشم‌گیر نبوده است.

واژه‌های کلیدی: بی‌جنپیش 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

مقدمه

پیوندهای هیدروژنی میان آنها باعث افزایش فراوانی بستره

آنزیم‌های اندوگلوكاتنаз و اکرولوکاتناز می‌شود (۵).

آنزیم اکزوگلوكاتناز یا سلوبیوهیدرولاز به سر ناکاهنده (Nonreducing end) زنجیرهای بلند و کوتاه گلوکزی، پدید آمده از کار آنزیم‌های C₁ و اندوگلوكاتناز، می‌پیوندد و آنها را آبکافت می‌کند. این آنزیم مولکول‌های سلولز را به دوقندی (Disaccharide) سلوبیوز می‌شکند (۵ و ۲۴). آنزیم اکزوگلوكاتناز 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 سلوتربیاز (Cellothrease) نیز توانایی هیدرولیز و آبکافت سلوتربیوز را دارد.

گذشته از چند آنزیم درون یاخته‌ای مانند نیتروژن‌ناز و دهیدروژن‌ناز، 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 (۶ و ۱۸). این آنزیم‌ها می‌توانند درون و برون لایه‌های کانی‌های رسی خاک جذب سطحی شده و یا با کلریدهای هومیک و آلی محلول خاک از راه‌های جذب

فراوان ترین بخش مانده‌های گیاهی سلولز است، که نزدیک به ۱۵ تا ۶۵ 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 اندوگلوكاتناز (1,4- β -glucan glucanohydrolase, EC3. 3. 2. 1. 4, EG) 1, 4- β -glucan cellobiohydrolase, EC 3. 2. 1. (۱)، ۱, 4- β -glucan cellobiohydrolase, EC 3. 2. 1. (۹۱)، CBH و 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 گستردۀ تری از ریزجانداران آن را می‌سازند (۲، ۷ و ۱۹).

آنزیم اندوگلوكاتناز به میان زنجیره‌های بخش‌های بی‌ریخت (Amorphous) سلولز و زنجیره‌های گلوکزی آزاد پیوسته و پیوندهای β -(۱-۴) گلوکزیدی آنها را آبکافت می‌کند. این آنزیم مولکول سلولز را به چند قندی‌ها (Oligosaccharides) می‌شکند. بستره ویژه آنزیم اندوگلوكاتناز می‌تواند سلولز بی‌ریخت، زنجیره برهنه گلوکان و یا سلولز دارای گروه‌های جانشینی مانند کربوکسی‌متیل سلولز (CMC) یا Caboxymethyl Hydroxyethyl cellulose (cellulose HEC) یا یا Hydroxyethyl cellulose (cellulose) باشد (۲۴ و ۲۹). آنزیم اندوگلوكاتناز با میان-شکنی بخش‌های بی‌ریخت سلولز در مانده‌های گیاهی، سوراخی در رشته سلولز می‌سازد که آنزیم C₁ با فرورفتن در زیر زنجیره‌های گلوکزی و رشته‌های سلولزی بلورین و گشایش و شکستن

شیلی، نیز از انجمن کانی‌شناسی امریکا خریداری شده است. خاک از لایه ۳۰-۰ سانتی‌متری تراس‌های بالایی رودخانه زاینده‌رود، و از کشتزارهای پل شهرستان اصفهان نمونه‌برداری شده است. این خاک را هنرجو و همکاران (۳) در فامیل خاک (Xerollic Camborthids, fine-carbonatic, thermic) گروه‌بندی کردند. 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 اسمنکیت، پالیگورسکیت، ایلیت، کائولینیت و کوارتز را دارد (۳). برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک آزمایش شده در جدول ۱ آمده است.

برای بی‌جنپش کردن سلولاز روی مانده‌های کشاورزی، سوسپانسیونی ۱٪ 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 ۱۹۰۰۰g، هر یک از آنها شسته شد. برای جلوگیری از رشد ریزجانداران در سوسپانسیون این نگهدارنده‌های آلی، مقداری تولوئن (غلظت ۰/۱٪) به هر یک از آنها افزوده گردید.

برای بی‌جنپش 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 ۹۵٪ شستشو شد. سرانجام برای جلوگیری از رشد ریزجانداران در آنها، به سوسپانسیون ۱٪ نگهدارنده‌ها مقداری تولوئن (غلظت ۰/۱٪) افزوده گردید. با افزودن دو میلی‌لیتر از محلول یک مولار کلرید آلومینیم به ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۱٪ رس‌ها، که دارای ۰/۵ گرم رس هم‌یون شده است، و به دنبال آن خشی نمودن آنها با هیدروکسید پتاسیم ۰/۵ مولار و سپس شستشوی آنها با آب مقطر در دستگاه سانتریفوژ، کمپلکس‌های نگهدارنده-هیدروکسید آلومینیم، که دارای نزدیک به چهار میلی‌مول آلومینیم بریک گرم آن بود آماده شد (۱).

سطحی (Adsorption)، 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، تهشیش شده و آنها را بی‌جنپش کنند و پایداری آنها را افزایش دهند (۶، ۱۱ و ۲۶).

پایداری و فعالیت آنزیم‌های نازیای خاک به ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیست‌شناسنخانه خاک، و همچنین اندازه و نوع مواد افزوده شده به خاک بستگی دارد. دما، نمایه، فشار اسمزی، تهویه، بافت، ساختمان، اندازه مواد آلی، H_p، عناصر پرنیاز و کمنیاز گیاهی، نمک‌ها، عناصر سنگین، آلانینده‌های هوا، آب و خاک، آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و ... هر یک از راهی ویژه بر فعالیت و پایداری آنزیم‌ها در خاک مؤثرند (۴، ۶، ۹، ۸، ۷، ۱۰، ۱۲، ۱۷، ۲۵، ۲۸ و ۳۲).

کانی‌های رسی خاک (به ویژه گروه اسمنکیت‌ها) (Smectites) و مواد آلی آن می‌توانند آنزیم‌های ریزجانداران خاک را جذب و نگهداری کرده، به پایداری آنها در خاک بیافزایند (۱۴). گفته می‌شود که این فرایندها از فروزنگی زیستی و کار آنزیم‌های پروتولیتیک، و به دنبال آن از آبکافت پروتئین آنزیم‌ها در خاک جلوگیری می‌کنند (۱۸). بنابراین، بررسی فعالیت و پایداری آنزیم‌های بی‌جنپش 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 بی‌جنپش 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 مونت‌موریلورنیت آریزونا، پالیگورسکیت فلوریدا، کائولینیت و ایلیت به دست آمده از تشکیلات کامبرین

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

اندازه	ویژگی	meq l^{-1}	ویژگی در عصاره اشبع خاک	اندازه	ویژگی
۲۰/۴	CEC (Cmol Kg^{-1})	۰/۵۴	CO_3^{2-}	٪ ۱۷/۵	سنگریزه
۱/۲۸	EC (ds m^{-1})	۲/۴	HCO_3^-	٪ ۳۵/۸	شن
۷/۷	pH	۰/۱	SO_4^{2-}	٪ ۳۹/۶	سیلت
۰/۷۲	ESP (%)	۴/۸۲	Cl^-	٪ ۲۴/۶	رس
		۵/۴	Na^+	لوم رسی	بافت
		۳/۹	K^+	٪ ۴۲	کربنات کلسیم هم‌سنگ
		۷/۴	$(\text{Ca}+\text{Mg})^{2+}$	٪ ۱/۵	مواد آلی
		۶/۵	Ca^{2+}	٪ ۰/۰۲	پتاسیم تبادلی

به روش مندل و ویر (۲۰) ارزیابی گردید. سوبسترای به کار رفته برای ارزیابی فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز (F Pase) دو نوار $1 \times 3 \text{ cm}$ کاغذ صافی و اتمن شماره ۱، و برای آنزیم اندوگلوکاناز (CMCase) ۰/۰۵ گرم کربوکسی‌متیل سلولز (Carboxymethyl cellulose, low viscosity) بود. فعالیت آنزیم‌ها با محاسبه میلی مول قندهای احیا کننده آزاد شده در یک دقیقه، برای یک میلی متر از سوسپانسیون نگهدارنده- آنزیم (U/ml) و یا یک گرم از نگهدارنده (gr/U) برآورد و گزارش شده است.

نتایج

نتایج ارزیابی فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنیش شده روی مانده‌های کشاورزی در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز بی‌جنیش 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 بی‌جنیش 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 بی‌جنیش شده روی کاه نخود و جو زیاد، روی کاه برنج و گندم میانه، و روی خاک اره و پوسته

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 فلوكا) 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 ستای گریز از مرکز $19000 \times g$ 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 (بی‌جنیش شده) به غلظت ۳/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ساخته شد. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنیش شده روی نگهدارنده‌ها ارزیابی شد. سوسپانسیون نگهدارنده- آنزیم (بی‌جنیش شده) تا ۲۰ روز در یخچال نگهداری، و به فاصله‌های زمانی مختلف فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنیش شده روی آنها ارزیابی شد.

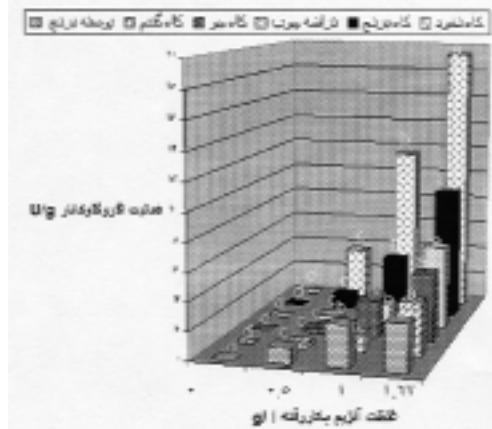
فعالیت آنزیم‌های بی‌جنیش شده به کمک اسپکتروفوتومتر و

فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن در نمودارهای ۳ تا ۶ نشان داده شده است. این نمودارها نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی آویسل به اندازه چشم‌گیری بیشتر از نگهدارنده‌های دیگر است. پس از آویسل، فعالیت آنزیم‌های بی‌جنپش شده روی نگهدارنده‌ها، به ترتیب از کانی پالیگورسکیت، به مونت موریلونیت، کائولینیت، خاک و ایلیت کاهش می‌یابد.

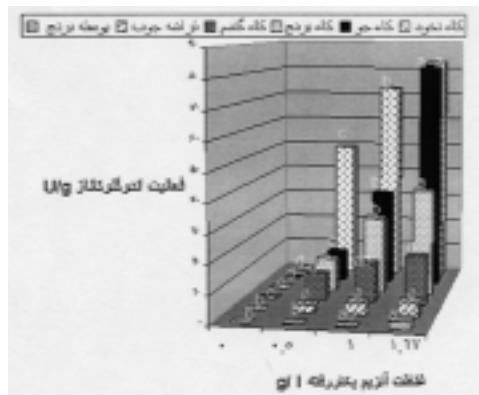
پوشاندن هر یک از نگهدارنده‌ها با هیدروکسید الومینیم توان بی‌جنپش‌سازی آنها را به اندازه چشم‌گیری افزایش می‌دهد (داده‌ها گزارش نشده است) (۱). همان گونه که در نمودارهای ۳ و ۴ دیده می‌شود، فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و به ویژه اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی هر یک از نگهدارنده‌ها، در تیمار آنها با هیدروکسید الومینیم نیز به اندازه چشم‌گیری افزایش یافته است. به هر حال، افزایش فعالیت آنزیم‌ها به ویژه اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی آویسل در برابر دیگر نگهدارنده‌ها، در تیمار هیدروکسید الومینیم کمتر است.

نمودارهای ۵ و ۶ فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی نگهدارنده‌های پوشانده شده با هیدروکسید الومینیم و هم‌یون شده با پتاسیم یا کلسیم را پس از ۲۰ روز نگهداری در یخچال نشان می‌دهد. فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش 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 بی‌جنپش شده روی آویسل نسبتاً زیاد است، و پس از ۲۰ روز افت کمی را نشان می‌دهد.

در باره کاهش فعالیت آنزیم‌ها پس از بی‌جنپش شدن آنها گزارش‌های فراوانی شده است (۲۲، ۲۳ و ۳۱). در این رشته آزمایش‌ها، دیده شد که اندازه سلولاز بی‌جنپش شده روی نگهدارنده‌ها به ترتیب زیر کاهش می‌یابد: خاک > پالیگورسکیت ~ مونتموریلونیت > آویسل ~ کائولینیت ~ ایلیت (داده‌ها گزارش نشده است) (۱). بنابراین، شاید بتوان پیش‌بینی کرد که بخش بزرگی از آنزیم‌های بی‌جنپش شده در خاک روی مواد آلی هومیک و پوسیده آن نگهداری شود و کار کاتالیزی خود را انجام دهند. داده‌های ارزیابی اندوگلوکاناز و اگزوگلوکاناز بی‌جنپش 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.

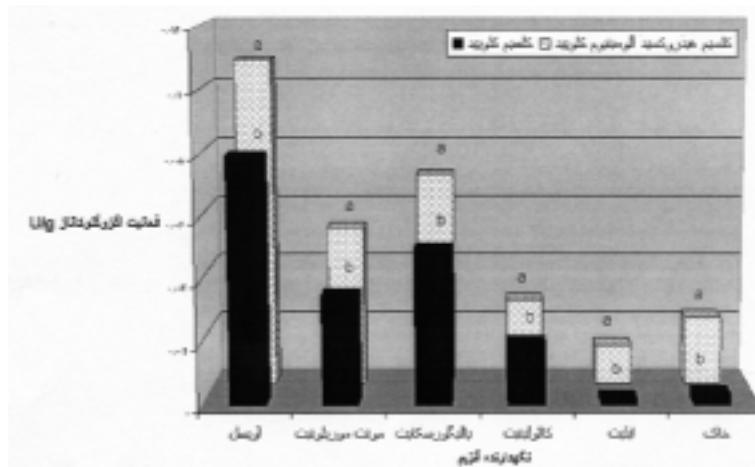


نمودار ۱. فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی برخی از مانده‌های کشاورزی

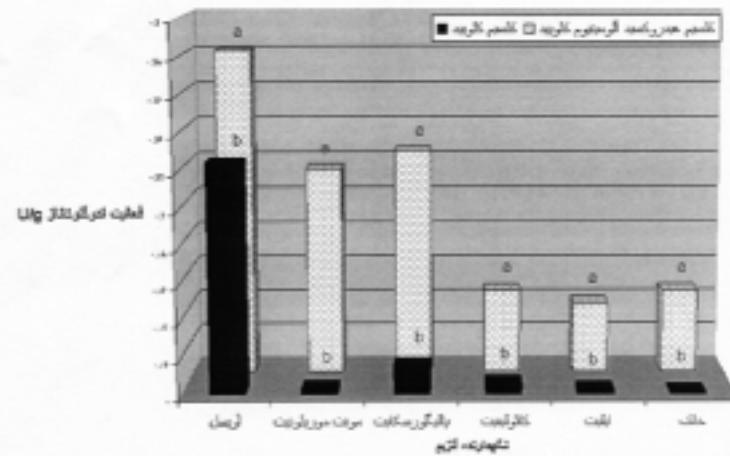


نمودار ۲. فعالیت آنزیم اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی برخی از مانده‌های کشاورزی

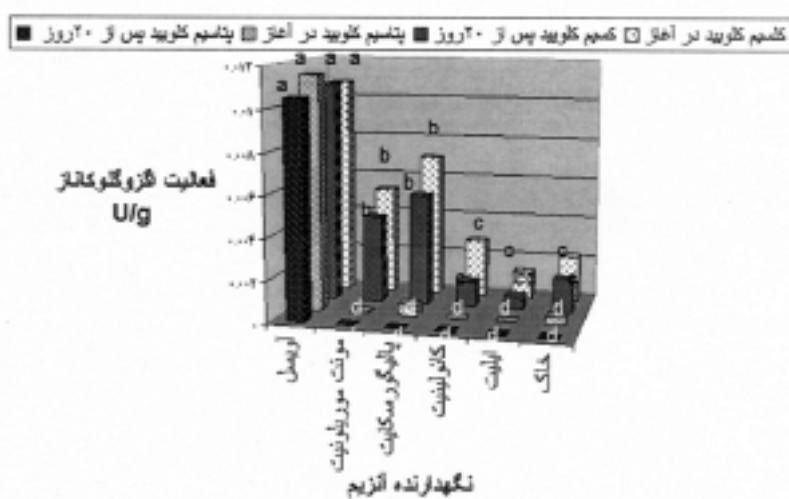
برنج کمترین است. گذشته از پوسته برنج، دیده می‌شود که روی هم رفته فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنپش شده روی مانده‌های کشاورزی با درصد نیتروژن زیادتر (کاه نخود)، بیشتر از مانده‌های دیگر (کاه گندم، برنج و خاک اره) است. این نتیجه ممکن است وابسته به توان بی‌جنپش‌سازی بهتر آنها باشد (۱). بنابراین، شاید بتوان پیش‌بینی کرد که بخش بزرگی از آنزیم‌های بی‌جنپش شده در خاک روی مواد آلی هومیک و پوسیده آن نگهداری شود و کار کاتالیزی خود را انجام دهند. داده‌های ارزیابی اندوگلوکاناز و اگزوگلوکاناز بی‌جنپش 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.



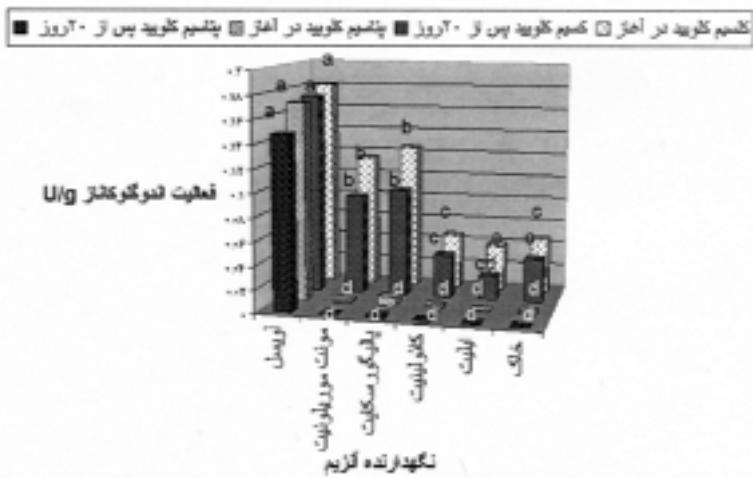
نمودار ۳. فعالیت آنزیم اگزوگلوکاتاز بی جنبش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن در برابر آنچه که با هیدروکسید آلومینیم پوشانده شده‌اند.



نمودار ۴. فعالیت آنزیم اندوگلوکاتاز بی جنبش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن در برابر آنچه که با هیدروکسید آلومینیم پوشانده شده‌اند.



نمودار ۵. پایداری آنزیم اگزوگلوکاتاز بی جنبش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن که با کلسیم یا پاتاسیم هم یون شده و با هیدروکسید آلومینیم پوشانده شده‌اند.



نمودار ۶. پایداری آنزیم اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی آویسل، خاک و برخی از کانی‌های آن که با کلسیم یا پتاسیم هم‌یون شده و با هیدروکسید الومینیم پوشانده شده‌اند.

روی آویسل هم‌یون شده با پتاسیم و کلسیم ناهمانندی چشم‌گیری ندارد. شاید چگونگی و روش بی‌جنپش شدن آنزیم‌های سلولولیتیک روی سوبسترای آن یا مانده‌های کشاورزی و آویسل، با خاک و کانی‌های آن ناهمانند باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه بی‌جنپش‌سازی آنزیم‌ها در بیوتکنولوژی، بیشتر برای بهره‌گیری دوباره از آنزیم‌ها و کاهش هزینه فراوری آنها انجام می‌شود (۲۱)، ولی گزارش شده است که پیوند کووالانت چندگانه یک آنزیم روی یک نگهدارنده مایه افزایش سختی مولکول آنزیم می‌شود، و پایداری ساختار فضایی آن را در برابر باز شدن افزایش می‌دهد (۱۶). به هر ترتیب، هنگام بی‌جنپش‌سازی آنزیم‌ها، بخشی از فعالیت و کنشوری آنها، بسته به روش بی‌جنپش شدن آن روی نگهدارنده‌ها، ساختمان آنزیم و ساختار نگهدارنده، از دست می‌رود (۲۲، ۲۳ و ۳۱). نشان داده شده که در میان آنزیم‌های سلولولیتیک بی‌جنپش شده، تنها فعالیت و کنشوری ویژه (Specific activity) آنزیم D-β-D-گلوكزیداز بیشتر از آنزیم‌های آزاد آن است. با این که از فعالیت دیگر آنزیم‌های سلولولیتیک کاسته می‌شود، بی‌جنپش کردن آنزیم‌ها، پایداری آنها را در برابر یخ زدن- ذوب شدن و خشک

فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی خاک در میان نگهدارنده‌ها بیشترین است. در برابر آن، افت فعالیت آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی آویسل کمترین است. شاید این ناهمانندی‌ها وابسته به گوناگونی فرایندها در بی‌جنپش شدن آنزیم‌ها روی این نگهدارنده‌ها باشد. کم بودن فعالیت آنها روی آویسل و مانده‌های کشاورزی، نشان می‌دهد که بیشتر فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک خاک‌ها وابسته به بخش آلی آن است.

فعالیت اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی خاک و کانی‌های هم‌یون شده با کلسیم به اندازه چشم‌گیری بیشتر از پتاسیم است. دیده شده است که از یک سو فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک در کنار کاتیون کلسیم بیشتر از پتاسیم ارزیابی می‌شود، و از سوی دیگر افزایش بار مثبت پل کاتیونی از پتاسیم به کلسیم مایه افزایش توان جذب سطحی و بی‌جنپش شدن آنزیم‌ها روی نگهدارنده‌ها می‌گردد (۱). این فرایند در افزایش فعالیت آنزیم‌های بی‌جنپش شده روی نگهدارنده‌های هم‌یون شده با کلسیم هم‌کردار است، و جدا کردن آنها نیاز به پژوهشی ویژه دارد. به هر صورت، در این نمودارها دیده می‌شود که فعالیت اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده

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 بی‌جنپش می‌شوند.

از آنجا که کانی‌های رسی در خاک با هیدروکسیدهای آهن و آلومینیم پوشیده شده‌اند، در باره چگونگی جذب آنزیم‌ها در میان لایه‌های مونت‌موریلوفیت 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 (۲۲).

این پژوهش نشان داد که پوشاندن هر یک از نگهدارنده‌های کانی خاک با هیدروکسید آلومینیم به اندازه چشم‌گیری بر فعالیت آنزیم‌های بی‌جنپش شده در آنها می‌افزاید. فعالیت آنزیم‌های بی‌جنپش 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 (۱)، در باره پیامد مثبت این روش بی‌جنپش سازی بر فعالیت این آنزیم‌ها چیزی نمی‌توان گفت. به هر حال، این پیامد مثبت در میزان و فعالیت آنزیم‌های بی‌جنپش 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.

شدن-تر شدن پی در پی خاک افزایش می‌دهد. پس از ۱۰ بار بیخ زدن-ذوب شدن، آنزیم‌های آزاد ۴۲-۵۶ درصد و آنزیم‌های بی‌جنپش شده ۶۰-۱۴۵ درصد از فعالیت نخست خود را نشان می‌دهند. فرایند خشک-تر کردن نمونه‌ها، در براب بیخ زدن-ذوب شدن آنها، بر فعالیت آنزیم‌های بی‌جنپش شده پیامد بدتری دارد. پس از ۱۰ بار خشک-تر کردن، آنزیم D-β-گلوکریداز ۵۵-۱۰۵ درصد اگزوگلوکاناز ۱۲-۶۰ درصد و اندوگلوکاناز ۰-۵ درصد از فعالیت نخست خود را نگه می‌دارد (۳۱). نگهداشت آنزیم‌های لاکاز (Laccase)، پراکسیداز (Peroxidase) و اسید فسفاتاز (Acid phosphatase) در دمای ۱۰-۱۱.۷ EC و ۱.۱.۱.۷ Laccase با بافت سیلت لوم در دمای چهار درجه سانتی گراد برای خاکی با پژوهش نشان داد که در فعالیت و کنشوری آنها به 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 (جنپش‌دار)، و همچنین آنزیم اسید فسفاتاز آزاد و بی‌جنپش شده روی شیشه، پس از نگهداشت در همان دما نزدیک به ۵۰٪ کاهش داشته است (۱۳).

در این پژوهش دیده شد که پایداری آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده به ساختمان نگهدارنده آن وابستگی بسیار دارد. به گونه‌ای که پس از ۲۰ روز نگهداری در دمای چهار درجه سانتی گراد، کاهش فعالیت آنزیم‌های بی‌جنپش شده روی نگهدارنده‌های آلی (مانند آویسل) ناچیز، ولی روی نگهدارنده‌های کانی چشم‌گیر است. کاهش فعالیت و کنشوری آنزیم‌های اگزوگلوکاناز و اندوگلوکاناز بی‌جنپش شده روی کانی‌های رسی، و به ویژه خاک، به اندازه چشم‌گیری بیشتر از آویسل و مانده‌های

منابع مورد استفاده

۱. صفری سنجانی، ع. ۱۳۷۹. فروزنگی زیستی برخی از مانده‌های کشاورزی و ارزیابی کارایی آنزیم‌های لیگنوسلولولیتیک قارچ‌ها در خاک. پایان‌نامه دکتری خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.
۲. کوچکی، ع.، م. حسینی و ح. ر. خزاعی. ۱۳۷۶. بوم‌شناسی خاک (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۳. هنرجو، ن. ۱۳۷۱. مقایسه 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. Invertase (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. Batista, 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 International 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-montmrrillonite 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, Berlin.
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.