تأثیر زمان، دما، پ- اچ و غلظت اوره‌آز بر جذب و فعالیت آنزیم در رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت

حدیثه رحمانی*، امیر لکزیان، علیرضا کریمی کارویه و اکرم حلاج‌نیا[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۱۴)

چکیده

اوره‌آز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های چرخه نیتروژن است. رس‌ها با داشتن سطوح جذبی برای آنزیم‌ها، نقش بسزایی در پایداری این ترکیب‌های پروتئینی در برابر عوامل محیطی گوناگون دارند. برای بررسی برهم‌کنش اوره‌آز و رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت سه آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. دو آزمایش به‌ترتیب شامل شش سطح زمان (۰، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ روز) و پنج سطح دمایی(۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد) و آزمایش سوم با آرایش فاکتوریل شامل پ- اچ در سه سطح (۵، ۷ و ۹) و غلظت در شش سطح (۰/۰۵، ۰/۲۵، ۱، ۵، ۱۵ و ۳۰ واحد آنزیمی) با دو تکرار اجرا گردید. آزمایش‌ها نشان دادند که با گذشت زمان، فعالیت آنزیم جذب شده بر سطح رس‌ها بیشتر از آنزیم آزاد بود. دمای بهینه فعالیت آنزیم آزاد و جذب شده به‌ترتیب ۳۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. بنابراین جذب آنزیم بر سطح رس، پایداری آن را در برابر دشواری‌های محیطی افزایش می‌دهد. هم‌چنین بیشترین میزان جذب اوره‌آز بر سطح سپیولیت و ورمیکولیت به‌ترتیب در پ- اچ‌های ۹ و۷ رخ داد. بررسی همدماهای جذب این آنزیم نشان داد که ورمیکولیت با شدت و توانایی بالاتری نسبت به‌سپیولیت، اوره‌آز را جذب می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: اوره، اوره‌آز، کمپلکس آنزیم-رس، سپیولیت، ورمیکولیت

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

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: soilsun65@yahoo.com

مقدمه

خاک سیستمی پویاست که برهم‌کنش‌های گوناگونی میان بخش‌های آن رخ می‌دهد. از جمله مهم‌ترین این برهم‌کنش‌ها می‌توان برهم‌کنش میان ترکیبات پیچیده پروتئین‌ها و رس‌ها را یادآور شد. در این راستا، آنزیم‌ها مهم‌ترین ترکیب‌های پروتئینی خاک می‌باشند که بخش مهمی از پژوهش‌ها روی آنها انجام شده است. آنزیم‌ها پروتئین‌های پیچیده‌ای هستند که در بدن همه جانداران ساخته شده واکنش‌های گوناگونی را کاتالیز می‌نمایند، بدون این‌که خودشان هیچ‌گونه تغییری داشته باشند. در حقیقت آنها به‌عنوان کاتالیزور زیستی عمل می‌نمایند. (۴، ۱۷، ۱۸، ۲۲ و۳۰). در بیشتر پژوهش‌های انجام شده، بر کمپلکس شدن آنزیم‌ها با ترکیب‌های هومیک/ پلی فنولیک متمرکز شده است (۵، ۳۵ و۴۹)، اما تاکنون پژوهش‌های بسیار کمی پیرامون برهم‌کنش میان ترکیب‌های پروتئینی خاک (به‌ویژه آنزیم‌ها) و ذرات غیر آلی به‌ویژه کانی‌های رسی انجام شده است (۴۴). از آن‌جا که آنزیم‌ها از مهم‌ترین ترکیب‌های پروتئینی خاک هستند که انجام بسیاری از واکنش‌ها در خاک را آسان و گاهی انجام برخی از واکنش‌ها را امکان‌پذیر می‌سازند، بنابراین، بررسی پایداری آنها در شرایط گوناگون محیطی بسیار حائز اهمیت بوده و یکی از مسیرهای اصلی تحقیق در آنزیم‌شناسی کاربردی به‌شمار می‌رود (۱۰، ۱۹و۲۵).

بی جنبش شدن آنزیم‌ها یکی از روش‌ها برای پایدار نمودن آنزیم‌ها است (۳، ۱۶، ۳۶و۳۹). از این دیدگاه، با بی جنبش شدن آنزیم، غیرفعال شدن آن عمدتا کاهش و ارزش اقتصادی آن افزایش می‌یابد (۱۱ و۲۰). از دیگر برتری‌های بی جنبش شدن آنزیم‌ها می‌توان به‌ادامه و کنترل مناسب فرآیندهای آنزیمی، جداسازی ساده‌تر فرآورده واکنش‌ها، کاهش فرآورده ناخواسته، پایداری در دماها و پ- اچ بالا و ... اشاره نمود (۲۸). در این میان، سطوح رس‌ها در ماتریکس خاک، همانند یکی از محیط‌های کوچک اما بسیار مهم برای انجام واکنش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی، نقش بسزایی را در فرآیند بی‌جنبش شدن آنزیم‌ها ایفا نموده و در نگهداری و یا نابودی فعالیت این ترکیب‌های پروتئینی، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (۴۲). بیشتر پروتئین‌های کروی مانند آنزیم‌ها، کشش بالایی برای انباشتگی در سطوح رس‌ها دارند. این رفتار فیزیکی، کارکرد ویژه‌ای در بی جنبش شدن و پایداری آنزیم دارد (۲۷). همان‌طورکه مطرح گردید، آنزیم‌ها می‌توانند بر کانی‌های رسی و کلوئیدهای هومیکی درون خاک جذب و بی جنبش شوند (۳۷). رس‌های انبساط‌پذیر مانند اسمکتایت‌ها، توان بالایی برای جذب پروتئین‌ها دارند. صفری سنجانی و همکاران (۳۸) گزارش کردند که توانایی جذب رس‌های مونتموریلونیت و سپیولیت بسیار بیشتر از کائولینیت و ایلیت است و پوشاندن این نگهدارنده‌های آنزیمی با هیدروکسیدهای آلومینیوم، توان جذب آنها را به‌اندازه چشم‌گیری افزایش می‌دهد. فوسی و همکاران (۱۲) گزارش کردند که مونتموریلونیت می‌تواند مولکول‌های آنزیمی را بر روی هر دو سطوح خارجی و داخلی، جذب نماید.

در برابر آن، صفری سنجانی و همکاران (۳۸) گزارش کردند که آنزیم سلولاز نمی‌تواند در میان لایه‌های رس‌های خاک جذب شود و تنها بر سطح بیرونی رس‌ها جذب می‌شود. گزارش شده است که زمان جذب آغازین پروتئین‌ها بر رس‌های کائولینیت و مونتموریلونیت کوتاه است و نزدیک سه چهارم جذب بیشینه در چند دقیقه آغازین برهمکنش آنزیم‌ها با رس‌ها رخ می‌دهد (۲۴). از سوی دیگر، جذب آنزیم‌ها بر سطوح رس، بسیار وابسته به‌نقطه ایزوالکتریک آنها است (۳۴) و جذب آنزیم‌ها بر رس‌ها، در پ-اچ بالای نقاط ایزوالکتریک پروتئین‌ها، پایین است (۴۱). بر پایه آنچه که از پژوهش‌های گوناگون برمی‌آید، برهم‌کنش میان آنزیم‌ها و رس‌های گوناگون، ناهمانند بوده و خود وابسته به‌عوامل زیستی، فیزیکی و شیمیایی مختلفی است. آنزیم‌ها نیز همچون دیگر ترکیب‌های پروتئینی می‌توانند بسته به‌ویژگی‌های گوناگون زیستگاه‌ها، در هر لحظه از زمان بر رس‌های گوناگون جذب و یا دفع شوند که شناخت این بر هم‌کنش‌ها برای پیش‌بینی سرانجام ترکیب‌های پروتئینی در خاک و به‌ویژه کارآیی یک آنزیم در یک خاک ویژه اهمیت

بالایی دارد. از گروه آنزیم‌هایی که به‌تازگی بر رفتار و سرنوشت آن در خاک پژوهش‌هایی انجام شده است، آنزیم اوره‌آز (EC 3.5.1.5) می‌باشد (۱). در زمینه کشاورزی، اوره از کودهایی است که دگرگونی و آبکافت آن در خاک، به‌کارکرد آنزیم اوره‌آز در خاک وابسته است و این فرآیند یک واکنش کلیدی در چرخه نیتروژن به‌شمار می‌رود (۶). کارآیی و سرنوشت این کود در خاک بسیار وابسته به‌بودن، فعالیت و هم‌چنین پایداری آنزیم اوره‌آز در خاک می‌باشد. اوره‌آز آنزیمی است که آبکافت اوره به‌دی اکسیدکربن و آمونیاک را کاتالیز می‌کند (۶، ۲۱، ۲۹و۴۰).

این پژوهش برهم‌کنش میان آنزیم اوره‌آز که یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های چرخه نیتروژن درخاک است و رس‌های ورمیکولیت و سپیولیت آزمایش شد. هم‌چنین تأثیر دو فاکتور پ- اچ و غلظت آنزیم به‌کار رفته بر چنین برهم‌کنش‌هایی بررسی گردید. سپیولیت، یک کانی رسی ثانویه و مخلوط کمپلکس سیلیکات منیزیم با فرمول کلی $Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2{\cdot}6H_2O$ می‌باشد. این کانی سفیدرنگ، دارای وزن مخصوص پایین و تخلخل بالاست و به‌لحاظ گروه‌بندی، در دسته فیلوسیلیکات‌ها جا دارد. ورمیکولیت نیز با فرمول شیمیایی $(MgFe,Al)_3(Al,Si)_4O_{10}(OH)_2.4H_2O$ از دسته فیلوسیلیکات‌ها است. این کانی سفید تا قهوه‌ای رنگ، به‌لحاظ ریخت ورقه‌ای (فلس مانند) خود کاملاً قابل تمایز نسبت به‌اغلب کانی‌ها است.

باید یادآور شد که در میان آنزیم‌ها بر هم‌کنش میان آنزیم اوره‌آز و کانی‌های رسی کمتر بررسی شده است که هدف این پژوهش شناخت برخی از این برهم‌کنش‌ها است.

مواد و روش‌ها

اثر غلظت آنزیم، پ- اچ، زمان و دما بر جذب و فعالیت آنزیم اوره‌آز در کمپلکس آنزیم- رس (دو نوع رس نسبتاً خالص سپیولیت و ورمیکولیت) در آزمایش‌های جداگانه بررسی شد. در این آزمایش‌ها، آنزیم اوره‌آز خالص ((EC 3.5.1.5)، 35 U/mg جامد (پودری) و با نقطه ایزو الکتریک((Isoelectric Point (IP) ۵) از شرکت سازنده مواد شیمیایی سیگما آلدریچ(Sigma-Aldrich chemie GmbH Riedstrasse 2, D-89555 STEINHIM) خریداری گردید. یادآور شود 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 به‌ترتیب از شهرستان یزد و بخش زمین‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد گردآوری شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های رس

پس از گردآوری نمونه‌های رس سپیولیت و ورمیکولیت از مراکز مربوطه، نمونه‌ها به کمک آب از الک با مش ۴۰۰ (۳۷ میکرومتر) گذرانده شده و آنچه روی الک بود، با دستگاه Mixer mill (آسیاب مخلوط‌کن) آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد خرد گردید. نمونه‌های خرد شده، در آغاز با HCl ۰/۱ مولار شستشو و سپس با محلول NaCl ۰/۱ مولار اشباع گردیدند. این نمونه‌ها پس از ۸ ساعت نگهداری در محلول NaCl، برای زدودن سدیم و کلر محلول، با آب مقطر برای سه بار شسته شدند. نمونه‌های سدیم-رس خشک گردیده و در دمای اتاق نگهداری شدند (۱۳).

تیمار رس‌ها با آنزیم اوره‌آز در پ-اچ‌های گوناگون

برای بررسی اثر پ- اچ و غلظت آنزیم بر جذب آنزیم آوره‌آز بر رس‌های ورمیکولیت و سپیولیت، کمپلکس‌های آنزیم-رس، در پ-اچ و غلظت‌های گوناگون آنزیم آماده شد (۱۳و۳۲). برای این کار، مقدار ۳۰ میلی‌گرم از هر رس با یک میلی‌لیتر از محلول اوره‌آز-بافر، مطابق غلظت و پ- اچ مورد نظر (غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۲۵، ۱، ۵، ۱۵ و ۳۰ واحد آنزیمی و پ- اچ‌های ۵، ۷ و ۹) و هم‌چنین یک قطره تولوئن برای توقف فعالیت‌های میکروبی احتمالی موجود، ترکیب و نمونه‌ها برای ۲۱ ساعت به آرامی و به‌صورت دورانی شیک گردیدند. پس از آماده‌سازی کمپلکس‌ها، فعالیت آنزیمی در نمونه‌های محتوی

رس (به تفکیک بخش محلول رویی و فاز جامد) و تیمارهای شاهد اندازه‌گیری شد. یادآور شود که برای کاربرد پ- اچ ۵ از بافر استات سدیم و هم‌چنین برای کاربرد پ- اچ‌های ۷ و ۹ از بافر فسفات سدیم استفاده گردید (۱۴). شیوه تهیه کمپلکس‌ها در آزمایش‌های مربوط به بررسی اثر تغییرات زمان و دما بر فعالیت آنزیم اوره‌آز جذب شده بر سطح رس نیز به همین صورت بوده با این تفاوت که در این آزمایش‌ها کمپلکس‌ها با غلظت آنزیمی ۱ واحد آنزیمی (۰/۰۲۸۵۷ میلی‌گرم آنزیم به‌ازای ۳۰ میلی‌گرم رس) و پ- اچ ۷ آماده شدند (۱۳، ۳۲). همزمان با نمونه‌های حاوی رس، نمونه‌های شاهد که دارای اوره‌آز آزاد (بدون رس) می‌باشند نیز آماده و بررسی شدند.

۱. بررسی پایداری آنزیم‌های آزاد و جذب سطحی شده

برای بررسی پایداری آنزیم‌های آزاد و جذب شده اوره‌آز، آزمایشی با شش زمان (۰، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ روز) و دو تکرار در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد. پس از ساخت کمپلکس‌های اوره‌آز-رس، نمونه‌ها برای کاربرد تیمارهای زمان در شرایط استاندارد شامل دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و محیط بدون نور (برای حذف عوامل محیطی احتمالی مؤثر بر فعالیت آنزیم آزاد و یا جذب شده) نگهداری شده و پس از گذراندن هر یک از دوره‌های زمانی مربوطه، فعالیت آنزیمی در نمونه‌ها خوانده شد. یادآور شود که برای زمان صفر، بی‌درنگ پس از ساخت کمپلکس‌ها، کارآیی آنزیم اوره‌آز خوانده شد.

۲. بررسی پیامد گرما بر کارآیی آنزیم آزاد و جذب شده اوره‌آز

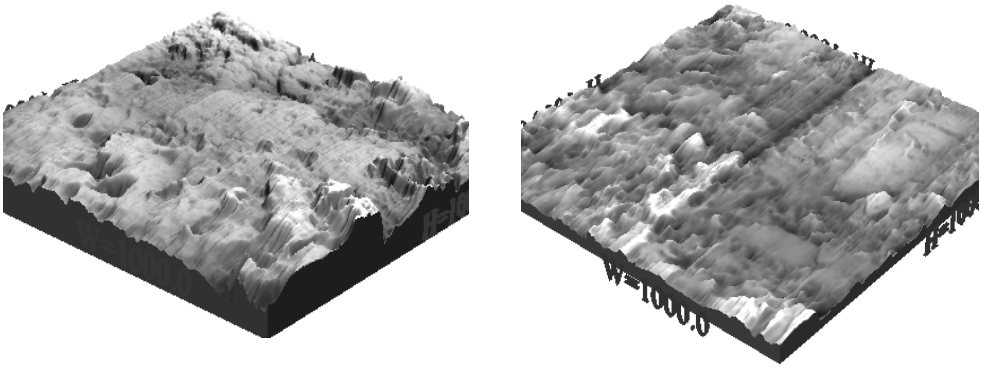
همزمان با آزمایش زمان و برای بررسی پیامد دما بر فعالیت آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده بر رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت، آزمایش دیگری با پنج سطح دمایی (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد) با دو تکرار در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی طراحی و انجام شد. پس از تهیه کمپلکس‌های آنزیم-رس، نمونه‌ها برای کاربرد هر یک از تیمارهای دمایی یاد شده، برای ۱۸ ساعت در داخل انکوباتور دارای هر یک از تیمارهای دمایی یاد شده قرار گرفته و پس از آن فعالیت آنزیمی در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (۳۲).

۳. بررسی پیامد غلظت آنزیم به‌کار رفته و پ- اچ محلول آنزیمی بر جذب سطحی و کارآیی آنزیم اوره‌آز

برای بررسی پیامد پ- اچ محلول و غلظت اوره‌آز به‌کار رفته بر جذب و فعالیت آنزیم در کمپلکس‌های آنزیم-رس، آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل فاکتور پ- اچ در سه سطح (۵، ۷ و ۹) و فاکتور غلظت آنزیم در شش سطح (۰/۰۵، ۰/۲۵، ۱، ۵، ۱۵ و ۳۰ واحد آنزیمی به‌ازای ۳۰ میلی‌گرم رس) در دو تکرار، انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

پس از تیمار رس‌ها با هر یک از محلول‌های آنزیمی، نمونه‌های دارای اوره‌آز آزاد و هم‌چنین سوسپانسیون‌ها برای ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه (RPM) سانتریفوژ شده، محلول رویی به لوله‌های اپندورف دو میلی‌لیتری منتقل و سپس به هر لوله اپندورف یک میلی‌لیتر محلول اوره- بافر ۶۶ میلی‌مولار افزوده شد. نمونه‌ها دوباره برای ۱۰ دقیقه بر روی شیکر دورانی با ۱۸۰ دور بر دقیقه مخلوط گردیدند (۱۴). در پایان، فعالیت آنزیمی نمونه‌های یاد شده، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خوانده شد. برای این کار، به اندازه 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 (۸) که برای برآورد غلظت یون آمونیوم در محلول واکنشی آنزیم بهره‌گیری می‌شود، و به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل WPA S2000UV/Vis اندازه‌گیری شد. در این روش معرف‌های افزوده شده به نمونه، در پایان مایه پیدایش رنگ آبی می‌گردند. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی همه نمونه‌های آزمایشی در شرایط استاندارد، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بدور از نور مستقیم (برای حذف عوامل احتمالی مؤثر بر فعالیت آنزیمی)



شکل ۱. تصویر STM از سطوح رس‌های سپیولیت (راست) و ورمیکولیت (چپ)

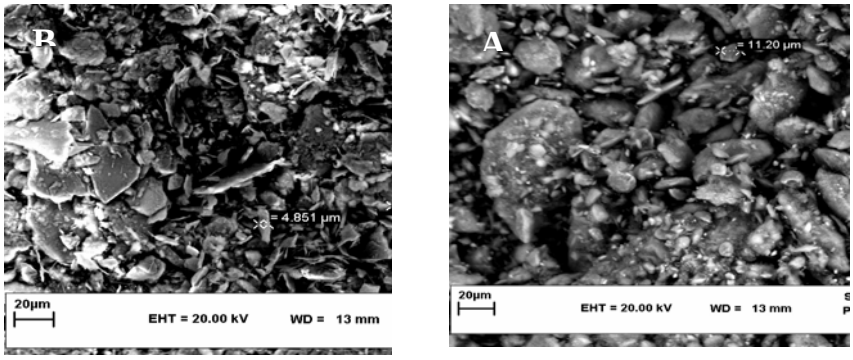
انجام گردید. به موازات اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی نمونه‌ها، منحنی‌های استاندارد نیز رسم و مقادیر آنزیم جذب شده (واحد فعال) مطابق محاسبات اختصاصی تعیین گردید.

داده‌های به‌دست آمده از آزمایش به کمک نرم‌افزار آماری MSTATC آنالیز و میانگین داده‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه گردیدند.

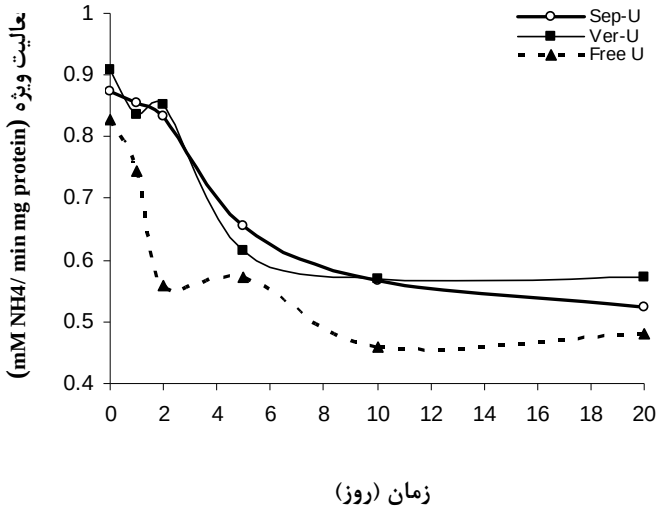
نتایج و بحث

برای دست‌یابی به اندازه دانه‌ای مناسب از رس‌های یاد شده، تصاویر STM و SEM در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد آماده شد (شکل ۱ و ۲). شکل ۱ تصاویر سه بعدی (1000 3D) توپوگرافی سطح کانی‌های رسی را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در تصاویر پیدا است، چگونگی پستی و بلندی‌های سطح دانه‌های هر یک از کانی‌های رس سپیولیت و ورمیکولیت با هم ناهمانند بوده که این پدیده به ساختمان کانی سپیولیت و ورمیکولیت وابسته است. با نگاه به شکل ۱، توزیع پستی و بلندی‌ها در سطح ورمیکولیت کمتر از سپیولیت بوده که این شاید بستگی به ورقه‌ای بودن ساختمان این کانی در برابر سپیولیت داشته باشد. شکل ۲ تصاویر SEM نمونه‌های رس را نشان می‌دهد. سپیولیت دارای دانه‌بندی کشیده (کمی سوزنی شکل) اما ورمیکولیت ریختی رقه‌ای دارد. با توجه به تصاویر SEM، محدودهٔ ابعاد ذرات رس سپیولیت و ورمیکولیت به‌طور متوسط زیر ۳۷ میکرومتر تعیین گردید.

شکل ۳ پایداری اوره‌آز جذب شده بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت را در برابر زمان نشان می‌دهد. آزمایش‌ها نشان دادند که با گذشت زمان، فعالیت هردو آنزیم آزاد و جذب شده بر سطح رس‌ها، کاهش یافت و پس از گذشت ۱۰ روز، این تغییرات، روند نسبتاً ثابتی را دنبال نمود، اگرچه در کل، کاهش فعالیت آنزیمی اوره‌آز آزاد بیشتر از اوره‌آز جذب شده بود. بیشترین شیب کاهش فعالیت این آنزیم‌های جذب شده پس از دو روز به وضوح آشکار شد. بررسی رفتار اوره‌آز جذب شده بر روی رس‌ها نشان داد که تا زمان ۱۰ روز، میزان کاهش فعالیت اوره‌آز جذب شده بر سطح سپیولیت کمتر از اوره‌آز جذب شده بر ورمیکولیت بود، اما پس از زمان ۱۰ روز، روندی کاملاً وارونه دیده شد. پس از ۲۰ روز از کاربرد تیمارها، اوره‌آز جذب شده بر سطح سپیولیت و ورمیکولیت به‌ترتیب ۵۹/۷۵ و ۶۲/۸۵ درصد از فعالیت نخستین خود را داشتند. آزمایش‌ها نشان دادند که جذب شدن آنزیم بر سطح رس، پایداری آن را نسبت به زمان در برابر آنزیم آزاد افزایش داد. مارزادوری و همکاران (۲۳) نیز در بررسی رفتار اوره‌آز جذب شده بر سطح هیدروکسی آپاتیت به یافته‌های همانندی دست یافتند. آنها گزارش کردند که پس از چهار روز از جذب اوره‌آز بر سطح هیدروکسی آپاتیت، اوره‌آز جذب شده همچنان ۶۰ درصد از فعالیت نخستین خود را داشت. هر چند در برخی پژوهش‌ها گزارش شده است اتصال آنزیم به تکیه‌گاه ممکن است موجب کاهش تمایل آنزیم به سوبسترا به‌دلیل از



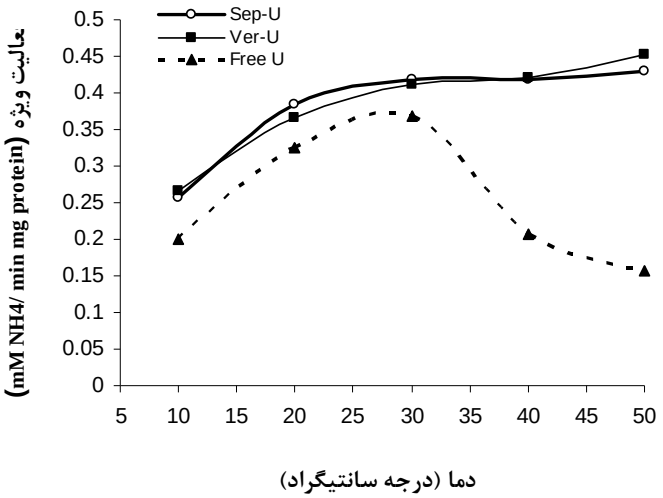
شکل ۲. تصویر SEM از ذرات رس سپیولیت (راست) و ورمیکولیت (چپ)



شکل ۳. تغییرات فعالیت آنزیم اورآز آزاد و جذب شده در رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت در طی ۲۰ روز

دست دادن انعطاف‌پذیری آنزیم و یا درگیر شدن گروه‌های عاملی آنها در فرآیند بی جنبش شدن گردد (۳، ۷).

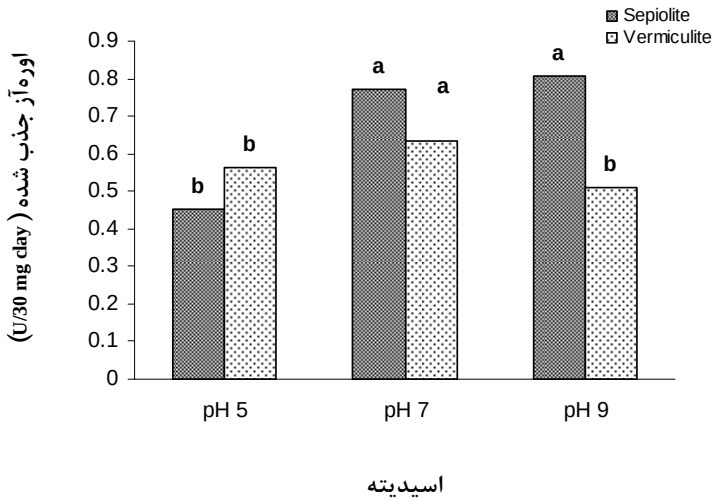
شکل ۴، دگرگونی فعالیت آنزیمی اوره‌آز آزاد و جذب شده را در برابر دگرگونی دما نشان می‌دهد. با افزایش دما از ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم اوره‌آز جذب شده بر سطح هر دو رس سپیولیت و ورمیکولیت افزایش یافت حال آن‌که فعالیت آنزیم آزاد تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد افزایش و پس از آن به گونه آشکاری کاهش یافت. این بخش از پژوهش‌ها نشان دادکه دمای بهینه برای فعالیت آنزیم جذب شده بر سطح هر دو رس سپیولیت و ورمیکولیت ۵۰ درجه سانتی‌گراد و برای آنزیم آزاد ۳۰ درجه سانتی‌گراد است (شکل ۴). هم‌چنین دیده شد که جذب شدن اثر مثبتی را بر پایداری آنزیم داشت و در برابر آنزیم آزاد، اوره‌آز جذب شده پایداری دمایی بالاتری را دارا بود. آنیتا و همکاران (۲) نیز در بررسی دگرگونی فعالیت اوره‌آز آزاد و جذب شده بر سطح ورمیکولیت در برابر دگرگونی دما، یافته‌های همانندی را گزارش کردند. آنها دمای بهینه فعالیت اوره‌آز آزاد را ۲۵ درجه سانتی‌گراد و برای اوره‌آز جذب شده ۶۵ درجه سانتی‌گراد در پ- اچ ۶/۵ گزارش کردند. البته از آنجائی که در این آزمایش بالاترین دمای به‌کار رفته ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود بنابراین دمای بهینه برای آنزیم جذب شده می‌تواند بالاتر هم باشد. البته در دمای های بالاتر از ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌دلیل تغییر شکل ساختاری آنزیم فعالیت آن بسیار کاهش می‌یابد. گلدستین (۱۵) گزارش نمود که افزایش پایداری اوره‌آز جذب شده در برابر اوره‌آز آزاد در دماهای بالا می‌تواند



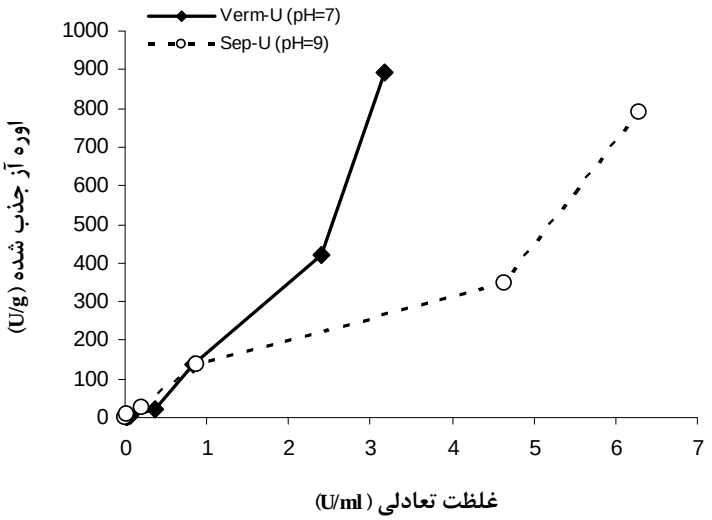
شکل ۴. چگونگی دگرگونی فعالیت آنزیم اوره آزاد و جذب شده در رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت در گستره دمایی ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد

به‌دلیل جلوگیری از هضم خود به خودی آنزیم جذب شده نسبت به آنزیم آزاد باشد (۲و۱۵). هم‌چنین طرفدار و چانکار (۴۳) گزارش نمودند که با افزایش دما، عمدتاً میزان جذب آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز قلیایی و فسفاتاز اسیدی بر سطح کانی‌های رسی افزایش می‌یابد. هرچند در دماهای بسیار بالا (بیش از ۶۵ درجه سانتی‌گراد) به‌علت دگرگونی ساختار آنزیم، روند جذب بیشتر کاهشی است (۲). بنابراین، شاید بتوان یکی دیگر از عوامل افزایش فعالیت آنزیمی آنزیم جذب شده بر سطح رس در دماهای بالا را به افزایش میزان جذب آنزیم در این دماها و بنابراین حضور مقادیر بیشتری آنزیم فعال و پایدار در سطح رس و به دنبال آن مقادیر بالاتر فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده در چنین شرایطی نسبت داد. از سوی دیگر بررسی‌ها نشان می‌دهند که پایداری اوره‌آز جذب شده بر سطح ورمیکولیت در برابر افزایش دما بسیار بیشتر از ترکیب‌هایی همچون پروتئاز خنثی جذب شده بر سطح همین رس است (۹).

یافته‌های به‌دست آمده از تأثیر غلظت آنزیم بر میزان آنزیم جذب شده نشان داد که بیشترین جذب برای هر دو رس در غلظت یک واحد آنزیمی رخ داد. از این‌رو این غلظت برای بررسی تأثیر پ- اچ بر میزان جذب اوره‌آز بر رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت بهره‌گیری شد. یافته‌های به‌دست آمده از این بخش آزمایش نشان داد که بیشترین جذب آنزیمی بر رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت به‌ترتیب در پ- اچ‌های ۹ و ۷ رخ داد (شکل ۵). هرچند از دیدگاه آماری تفاوت چشم‌گیری در میزان جذب آنزیم بر سپیولیت در پ- اچ‌های ۷ و ۹ دیده نشد. طرفدار و چانکار (۴۳) گزارش نمودند که بیشینه جذب اوره‌آز بر سطح ورمیکولیت در پ- اچ ۷/۵ که اوره‌آز بیشترین فعالیت آنزیمی را در حالت آزاد نشان می‌دهد، رخ داده است. از سوی دیگر آنیتا و همکاران (۲) نشان دادند که ناهمانندی پ- اچ بهینه به‌دست آمده برای جذب آنزیم اوره‌آز بر سطح رس‌های گوناگون، گذشته از ویژگی‌های کانی‌شناسی هر رس، وابسته به ویژگی‌هایی همچون منبع آنزیم اوره‌آز، روش بی جنبش‌سازی و هم‌چنین نوع بافرهای به‌کار رفته می‌باشد. از سوی دیگر آنیون‌های فسفات بافر، می‌تواند در پ- اچ‌های پایین با مولکول‌های آنزیم برای جذب بر جایگاه‌های جذبی رقابت نموده و این فرآیند مایه کاهش جذب در پ- اچ‌های پایین شود (۲۶). طبق گزارش کوئی‌کوآمپویکس (۳۳)، زمانی که پ- اچ در نزدیکی نقطهٔ ایزوالکتریک آنزیم می‌باشد، میزان بار خالص آنزیم پایین است و بنابراین برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک آنزیم با سطوح کانی‌ها ضعیف است (۳۳). در این راستا، نیجا و همکاران (۲۶) در بررسی رفتار جذبی تیروزیناز بر سطح مونتموریلونیت گزارش نمودند که در



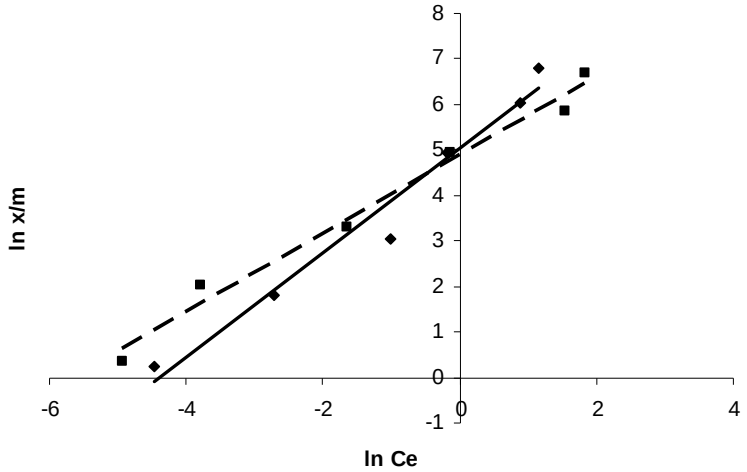
شکل ۵. تأثیر پ- اچ بر میزان آنزیم اوره‌آز جذب شده در رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت (غلظت یک واحد آنزیمی)



شکل ۶. رابطه غلظت تعادلی و میزان اوره‌آز جذب شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت

شرایط ضعف نیروهای الکترواستاتیک (در پ- اچ‌های بالا یا پایین)، به نظر می‌رسد که افزون بر برهم‌کنش‌های جذبی واندروالس، پیوند هیدروژنی بین گروه‌های کربوکسیل و آمینو زنجیره پلی پپتیدی پروتئین و ورقه‌های تتراهدرال سطح رس نیز در جذب آنزیم بر سطح رس، کارآیی داشته باشند. شاید بتوان افزایش جذب اوره‌آز در پ- اچ‌های بالاتر از ۷ بر سطح سپیولیت را وابسته به چنین نیروهایی دانست.

شکل ۶ رابطه غلظت تعادلی و میزان اوره‌آز جذب شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت و شکل ۷ همدماهای جذب اوره‌آز بر سطح این رس‌ها را نشان می‌دهند. با توجه به شکل ۶، همدماهای جذب اوره‌آز بر سطوح هر دو رس سپیولیت و ورمیکولیت از نوع همدمای جذبی فروندلیچ بود. این همدمای جذبی، بیشتر برای سیستم‌های انرژی سطحی نامتجانس با جذب چند لایه‌ای همراه با برهم‌کنش میان مولکول‌های جذب شده کاربرد دارد (۳۱). با افزایش غلظت اوره‌آز در محلول واکنشی، میزان جذب اوره‌آز نیز بر سطوح هر دو رس سپیولیت و ورمیکولیت افزایش یافت. هم‌چنین نتایج نشان دادند که ورمیکولیت در پ- اچ ۷ که دارای



شکل ۷. همدما جذب فروندلیچ در ارتباط با جذب اوره‌آز بر سطح رس ورمیکولیت (خط پیوسته) و سپیولیت (خط چین) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

جدول ۱. ثابت‌های معادلهٔ فروندلیچ مربوط به اوره‌آز جذب شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت

رس جذب‌کننده	$K_F \times 10^2$ (U g^{-1}) (U ml^{-1})$^{-1/n}$	n^{-1}	r^2
سپیولیت	۱/۳۰۴۰	۰/۸۵۹۸	۰/۹۸۴۱
ورمیکولیت	۱/۵۲۶۳	۱/۱۴۸۳	۰/۹۶۸۸

بیشترین میزان جذب آنزیم است، در غلظت‌های تعادلی کمتر (۳/۱۸ U ml^{-1}) در برابر سپیولیت در پ- اچ ۹، به بالاترین مقادیر جذب آنزیمی(۶/۲۹ U ml^{-1}) رسید که این اندازه تقریباً نصف غلظت تعادلی واکنش با سپیولیت بود.

نتایج موجود در جدول ۱ نیز چنین روندی را توجیه می‌نمایند. داده‌های جدول، ثابت‌های معادله فروندلیچ مربوط به اوره‌آز جذب شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت را نشان می‌دهند (معادلهٔ ۱).

$$\ln(q_e) = \ln(K_F) + \frac{1}{n}\ln(C_e) \qquad [1]$$

در این معادله، q_e، نسبت مقدار ماده جذب شونده به مقدار ماده جاذب در نقطه تعادل، C_e، غلظت در فاز محلول در حالت تعادل، K_F معادل با فاکتور ظرفیت فروندلیچ و n^{-1} بیانگر پارامتر شدت جذب فروندلیچ می‌باشد. همان‌گونه در جدول ۱ مشخص است، مقدار n^{-1} و هم‌چنین K_F برای رس ورمیکولیت بیشتر از سپیولیت به‌دست آمد که این نشان‌دهنده شدت جذب بیشتر آنزیم توسط ورمیکولیت و هم‌چنین توانایی جذب بالاتر این رس در برابر سپیولیت بود. این امر خود می‌تواند دلیلی بر راندمان جذب بالاتر اوره‌آز توسط ورمیکولیت نسبت به سپیولیت در غلظت‌های تعادلی پایین‌تر باشد.

نتیجه‌گیری

این پژوهش نشان داد که با گذشت زمان، فعالیت آنزیم اوره‌آز در هر دو حالت آزاد و جذب شده کاهش یافت، اگرچه این کاهش در کارآیی آنزیم آزاد بارزتر بود. هم‌چنین، جذب آنزیم بر سطح هر دو رس سپیولیت و ورمیکولیت اثر مثبتی را در راستای افزایش پایداری آنزیم اوره‌آز در برابر افزایش دما داشت. در حقیقت جذب آنزیم بر سطح رس، ماندگاری و پایداری آنزیم را در برابر دشواری‌های محیطی افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، رفتار این رس‌ها از جنبه جذب اوره‌آز در پ- اچ‌های گوناگون به‌کار رفته ناهمانند بود. بیشترین جذب

اوره‌آز بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت به‌ترتیب در پ- اچ‌های ۹ و ۷ رخ داد. افزون بر این، ویژگی کانی‌شناسی جاذب و نوع گروه‌های عاملی پیوندی نیز بر میزان جذب و پایداری آنزیم موثرند. الگوی جذب اوره‌آز بر هر دو رس با همدمای جذبی فروندلیچ همخوانی داشت. بر پایه رابطه غلظت تعادلی و اوره‌آز جذب شده و هم‌چنین با بررسی ثابت‌های فروندلیچ آشکار شد که شدت و توانایی جذب رس ورمیکولیت در برابر سپیولیت بالاتر است. از آنجایی که رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت در خاک‌های قلیایی سرزمین‌های خشک و نیمه خشک به وفور یافت می‌شوند، بنابراین به لحاظ پایداری این آنزیم در چنین خاک‌هایی نیز دارای اهمیت هستند.

منابع مورد استفاده

1. Andrews, R. K., R. L. Blakeley. and B. Zerner. 1989. Urease: A Ni(II) metalloenzyme. PP. 141-166. *In*: J. R. Lancaster(Ed.), The Bioinorganic Chemistry of Nickel, VCH Pub., New York.
2. Anita, A., C. A. Sastry. and M. A. Hashim. 1997. Immobilization of urease on vermiculite. Bioproc. Eng. 16:375-380.
3. Bayramoglu, G., M. Yilmaz. and M. Y. Arica. 2004. Immobilization of a thermostableα-amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis. Food Chem. 84: 591–599.
4. Bennett, T. P. and E. Frieden. 1969. Modern Topics in Biochemistry, Macmillan, London.
5. Boavida, M. J. and R.G. Wetzel. 1998. Inhibition of phosphatase activity by dissolved humic substances and hydrolytic reactivation by natural ultraviolet light. Freshwater Biol. 40: 285–293.
6. Bremner, J. M. and R. L. Mulvaney. 1978. Urease activity in soils. *In*: R. G. Burns(Ed.), Soil Enzymes. Academic Press, London.
7. Chang, M.Y. and R. S. Juang. 2005. Activities , stabilities and reaction kinetics of three free and chitosan–clay composite immobilized enzymes. Enzyme and Microbial Technol. 36: 75–82.
8. Charney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Clinical Chemistry. (Wlnston Salem, N.C.). 8: 130-132.
9. Chellapandian, M. and C. A. Sastry. 1992. Vermiculite as an economic support for immobilization of neutral protease. Bioproc. and Biosys. Eng. 8:27-31.
10. El-Batal, A.I., K. S. Atia and M. Eid. 2005. Stabilization of α-amylase by using anionic surfactant during the immobilization process. Radiation Phys. and Chem. 74: 96–101.
11. Fagain, C.O. 2003. Enzyme stabilization—recent experimental progress. Enzyme and Microbiol. Technol. 33: 137–149.
12. Fusi, P., G.G. Ristori, L. Calamai and G. Stotzky. 1989. Soil Biol. and Biochem. 21: 911–920.
13. 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. and Biochem. 26:581-587.
14. 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. and Biochem. 24:51-58.
15. Goldstein, L. 1973. A new polymine carrier for immobilization of proteins of water insoluble derivatives of pepsin and trypsin. Biochimica et Biophysica Acta 327:132-137.
16. 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.
17. Harrow, B. and A. Mazur. 1958. Textbook of Biochemistry. Saunders, Philadelphia.
18. Holum, J. 1968. Elements of General and Biological Chemistry. 2nd ed., Wiley Pub., NY.
19. Kaks, A. and A. M. Klibanov. 1988. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. Biol. Chem. 263: 3194–3201.
20. Katchalski-Katzir, E. 1993. Immobilized enzymes-learning from past successes and failures. Trends in Biotechnol. 11: 471–478.
21. Kiss, S., M. Dragan-Bularda. and D. Radulescu. 1975. Biological significance of enzymes in soil. Adv. in Agron. 27: 25–91.
22. Martinek, R. 1969. Practical clinical enzymology. Amer Med Technol. 31: 162.
23. Marzadori, C., S. Miletti, C. Gessa and S. Ciurli. 1998. Immobilization of Jack Bean Urease on hydroxyapatite: Urease immobilization in alkaline soils. Soil Biol. and Biochem. 30: 1485-1490.

24. McLaren, A. D., G. H. Peterson. and I. Barshad. 1958. The Adsorption and Reactions of Enzymes and Proteins on Clay Minerals: IV. Kaolinite and Montmorillonite. Soil Sci. Soc. of Amer. 22:239-244.
25. Mozhaev, V.V., Y. L. Khmelnitsky, M. V. Sergeeva, A. B. Belova, N. L. Klyachko, A. V. Levashov and K. Martinek. 1989. Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/ organic cosolvent mixtures: a-chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. Eur. J. Biochem. 184: 597–602.
26. Naidja, A., A. Violante and P. M. Huang. 1995. Adsorption of Tyrosinase onto montmorillonite as influenced by hydroxyaluminum coatings. Clays and Clay Min. 43:647-655.
27. Norde, W. 1993. Stability and Stabilization of Enzymes. PP. 3–11. *In*: W.J.J. Twed, A. van den Harder, R.M. Buitelaar (Eds.) Proceedings of an International Symposium Held in Maastricht, The Netherlands, Elsevier Science, Amsterdam.
28. Park, S.W., Y. I. Kim, K. H. Chung, S. I. Hong and S. W. Kim. 2002. React. Funct. Polym. 51: 79–92.
29. Pettit, N. M., A. R. J. Smith, R. B. Freedman and R. G. Burns. 1976. Soil urease: activity, stability and kinetic properties. Soil Biol. and Biochem. 8:479-484.
30. Pfeiffer, J. 1954. Enzymes, the Physics and Chemistry of Life. Simon & Schuster, New York.
31. Piccin, J. S., G. L. Dotto and A. A. Pinto. 2011. Adsorption isotherms and thermochemical data of FD & C RED N° 40 binding by Chitosan. Brazilian J. Chem. Eng. 28: 295-304.
32. 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.
33. Quiquampoix, H. 1987. A stepwise approach to the understanding of extraceUular enzyme activity in soil I. Effect of lectrostatic interactions on the conformation of a β-D glucosidase adsorbed on different mineral surfaces. Biochimie. 69: 753-763.
34. Quiquampoix, H., S. Stauton, M. H. Baron. and R. G. Ratcliffe. 1993. Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil. Colloids Surfaces A: Physicochem. and Eng. Aspects 75: 85–93.
35. Rao, M.A. and L. Gianfreda. 2000. Properties of acid phosphatasetannic acid complexes formed in the presence of Fe and Mn. Soil Biol. and Biochemi. 32: 1921–1926.
36. Reshmi, R., G. Sanjay and S. Sugunan. 2007. Immobilization of α-amylase on zirconia. .:a heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis. Catalysis Communications. 8: 393–399.
37. Safari Sinegani, A. A., G. Emtiazi. and H. Shariatmadari. 2001. PP. 104–105. *In*: A. Faz, R. Ortiz, A.R. Mermut (Eds.), International Symposium on Sustainable Use and Management of Soils in Arid and Semiarid Regions.Cartagena, Murica, Spain
38. Safari Sinegani, A. A., G. Emtiazi. and H. Shariatmadari. 2005. Sorption and immobilization of cellulase on silicate clay minerals. . Colloid and Interface Sci. 290: 39-44.
39. 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.
40. Skujins, J. J. 1967. enzymes in soil. PP. 371-414. *In*: A. D. McLaren and G. H. Peterson (Eds.), Soil Biochemistry. Dekker Pub., New York.
41. Staunton, S. and H. Quiquampoix. 1994. J. Colloid and Interface Sci. 166: 89– 94.
42. Stotzky, G. 1972. Activity, ecology and population dynamics of microbes in soil. Critical Rev. Microbiol. 2: 59-137.
43. Tarafdar, J.C. and P. K. Chhonkar. 1982. Urease Clay Interactions: I – adsorption of urease on clays saturated with different cations. Ind. Soci. of Soil Sci. 30: 27–32.
44. Tietjen, T. and R. G. Wetzel. 2003. Extracellular enzyme-clay mineral complexes: Enzyme adsorption, alteration of enzyme activity, and protection from photodegradation. Aquatic Ecol. 37: 331- 339.
45. Wetzel, R.G. 1991. Extracellular enzymatic interactions in aquatic ecosystems: Storage, redistribution, and interspecific communication. PP. 6–28. *In*: Chróst R.J. (Ed.), Microbial Enzymes in Aquatic Environments. Springer-Verlag, New York, USA.

Effects of Time, Temperature, pH and Urease Concentration on Enzyme Adsorption and Activity of Vermiculite and Sepiolite

H. Rahmani*, A. Lakzian, A. R. Karimi Karouyeh and A. Halajnia[1]

(Received : Sep. 1-2011 ; Accepted : Nov. 5 -2011)

Abstract

Urease is one of the most important enzymes in nitrogen cycle. The clay particles (with high surface area) play an important role in the stability of these protein compounds (enzymes) against various environmental factors. In order to examine the interactions between urease with sepiolite and vermiculite, three in vitro experiments were conducted separately in a completely randomized design. Two experiments were carried out with two replications. Treatments included six incubation times (0, 1, 2, 5, 10 and 20 days) and five levels of temperature (10, 20, 30, 40 and 50 ˚C). The third experiment was carried out in a factorial arrangement with two replications. Factors included three levels of pH (5, 7 and 9), and six-levels of enzyme concentrations (0.05, 0.25, 1, 5, 15 and 30 units). The results showed that the activity of adsorbed enzyme was more than free enzyme during the incubation time. The optimum temperatures for activity of free and adsorbed enzymes were 30 and 50 ˚C, respectively. It was concluded that enzyme adsorption on clay surfaces increases enzyme stability against environmental changes. Also, the results showed that the highest levels of urease adsorption on sepiolite and vermiculite occurred at pH 9 and 7, respectively. Adsorption isotherms of Enzyme showed that Vermiculite adsorbed urease with higher affinity compared to Sepiolite.

Keywords: urea, urease, enzyme-clay complex, Sepiolite, Vermiculite.

1. Dept. of Soil Sci., College of Agric., Ferdowsi Univ. of Mashhad, Mashhad, Iran.
*: Corresponding Author, Email: soilsun65@yahoo.com