دانشکده کشاورزی
گروه علوم خاک

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی فعالیت وخصوصیات جذبی آنزیم اوره‌آز در حضور رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت

حدیثه رحمانی

شهریور ۱۳۹۱

دانشکده کشاورزی
پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی فعالیت وخصوصیات جذبی آنزیم اوره‌آز در حضور رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت

حدیثه رحمانی

استاد راهنما
دکتر امیر لکزیان

استادان مشاور
دکتر علیرضا کریمی
مهندس اکرم حلاج نیا

شهریور ۱۳۹۱

دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک

از این پایان نامه کارشناسی ارشد توسط دانشجوی مقطع رشته

در تاریخ در حضور هیات داوران دفاع گردید. پس از بررسی های لازم، هیات

داوران این پایان نامه را با نمره عدد حروف و با درجه

مورد تایید قرار داد / نداد.

عنوان پایان نامه: بررسی فعالیت و خصوصیات جذبی آنزیم اوره آز در حضور رس های سپیولیت و ورمیکولیت

سمت در هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	گروه	موسسه / دانشگاه	امضاء
داور	سعید ملک‌زاده	استادیار	بیوتکنولوژی	دانشگاه فردوسی	
داور	حجت امامی	استادیار	علوم خاک	دانشگاه فردوسی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	رضا خراسانی	استادیار	علوم خاک	دانشگاه فردوسی	
استاد راهنما	امیر لکزیان	دانشیار	علوم خاک	دانشگاه فردوسی	
استاد مشاور	علیرضا کریمی	استادیار	علوم خاک	دانشگاه فردوسی	
استاد مشاور	اکرم حلاج نیا	کارشناس آزمایشگاه	علوم خاک	دانشگاه فردوسی	

تعهد نامه

عنوان پایان نامه: بررسی فعالیت وخصوصیات جذبی آنزیم اوره‌آز در حضور رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت

اینجانب حدیثه رحمانی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی دکتر امیر لکزیان متعهد می شوم:

۵- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.

۶- در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.

۷- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.

۸- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.

۹- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.

۱۰- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ: ۱۳۹۱/۶/۲۸

حدیثه رحمانی

مالکیت نتایج و حق نشر

۱۰-۲-۱,۱. کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.

۱۰-۲-۱,۲. استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

اوره یکی از پرکاربردترین کودهای نیتروژن‌دار در زمین‌های کشاورزی است. سرنوشت این کـود در خـاک بسیار وابسته به فعالیت آنزیم اوره‌آز بوده و این آنزیم نیز عمدتا به صورت جذب شده بر سطح کلوئیدهای خاک به‌ویژه رس‌ها قرار دارد. رس‌ها با داشتن سطوح جذبی برای آنزیم‌ها، نقش بسزایی در پایـداری ایـن ترکیبات پروتئینی در برابر عوامل محیطی گوناگون دارند . برای بررسی برهم‌کنش آنزیم اوره‌آز و رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت، چهار آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملا تصادفی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. دو آزمایش به ترتیب شامل شش سطح زمان (۰، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ روز) و پنج سطح دمایی (۱۰ تـا ۵۰ درجه سانتی‌گراد) و آزمایش سوم با آرایش فاکتوریل شامل اسیدیته 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. همچنین بـه منظـور بررسی ویژگی‌های سینتیکی اوره‌آز آزاد و جذب شده بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت، آزمایش چهارم با هشت سطح غلظت اوره (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ میلی مـولار) و غلظـت ۱ واحـد آنزیمی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ با دو تکرار انجام شد. نتایج نشان دادنـد کـه بـا گذشـت زمان، فعالیت آنزیم جذب شده بر سطح رس‌ها بیشتر از آنزیم آزاد بود. دمای بهینه فعالیـت آنـزیم آزاد و جذب شده به ترتیب ۳۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. بنابراین جذب آنزیم بر سطح رس، پایداری آن را در برابر تنش‌های محیطی افـزایش مـی‌دهـد. همچنـین بیـشترین میـزان جـذب اوره‌آز بـر سـطح سپیولیت و ورمیکولیت به ترتیب در pH ۹ و۷ رخ داد. بر اساس نتایج آزمایشات، همدماهای جـذب اوره‌آز بر سطوح هر دو رس سپیولیت و ورمیکولیت، بیشترین تطابق را با مـدل فرونـدلیچ نـشان دادنـد. بررسـی همدماهای جذب این آنزیم نشان داد که ورمیکولیت با شدت و توانایی بالاتری نسبت به سپیولیت، اوره‌آز را جذب می‌نماید. همچنین جذب اوره‌آز بر سطوح رس‌ها ویژگی‌های سینتیکی آن را نسبت به حالت آزاد تحـت تـاثیر قـرار داد. نتـایج نـشان دادنـد کـه اوره‌آز در هـر دو حالـت آزاد و جـذب شـده از سـینتیک میکائیلیس-منتن پیروی می‌نمود. بیشترین مقدار V_{max} پس از اوره‌آز آزاد در کمپلکس اوره‌آز-سـپیولیت و کمترین میزان K_m نیز در کمپلکس اوره‌آز-ورمیکولیت مشاهده گردید. همچنین نتایج نشان دادند کـه بیشترین کارآیی 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 جـذب شـده بـر سطح ورمیکولیت بود و این امر به نوعی مبین کاملتر بودن فرآیند پخشیدگی در حضور سپیولیت است.

کلید واژه‌ها: اوره، اوره‌آز، سپیولیت، کمپلکس، ورمیکولیت.

با سپاس ازسه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم...

موهایشان سپید شد تا ما روسفید شویم...

و عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند...

پدرعزیزم

مادر مهربانم

اساتید گرانقدرم

سپاسگزار کسانی هستم که سراغاز تولد من هستند. از یکی زاده می‌شوم و از دیگری‌جاودانه. استادی که سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم نگاشت و پدر و مادری که تارمویی از آن‌ها بپای من سیاه نماند.

فهرست مطالب

فصل اول – مقدمه ۱

۱-۱ مقدمه ۱

فصل دوم – بررسی منابع ۵

۲-۱ تاریخچه آنزیم‌شناسی ۵

۲-۲ طبیعت شیمیایی آنزیم‌ها ۵

۲-۳ آنزیم‌ها به عنوان ابزارهای مطالعاتی ۷

۲-۴ برهم‌کنش آنزیم‌های خاک ۸

۲-۵ اهمیت مطالعه آنزیم اوره‌آز در خاک ۱۳

۲-۶ بیوشیمی اوره‌آز ۱۵

۲-۷ سینتیک فعالیت اوره‌آز ۱۷

۲-۷-۱ معادلات تعیین ثابت‌های میکائیلیس-منتن ۱۹

۲-۸ معادلات تعیین همدماهای جذب اوره‌آز بر سطوح رس های سپیولیت و ورمیکولیت ۲۲

۲-۸-۱ مدل همدمای جذبی لانگمویر ۲۳

۲-۸-۲ مدل همدمای جذبی تمکین ۲۳

۲-۸-۳ مدل همدمای جذبی فروندلیچ ۲۳

۲-۹ خاستگاه اوره‌آز در خاک ۲۴

۲-۱۰ انرژی‌های واکنش اوره‌آز خاک ۲۶

۲-۱۱ pH بهینه ۲۶

۲-۱۲ اوره‌آز و خصوصیات خاک ۲۷

۲-۱۳ عوامل موثر بر فعالیت اوره‌آز خاک ۲۸
۲-۱۳-۱ دمای محیط ۲۸
۲-۱۳-۲ pH محیط ۲۹
۲-۱۳-۳ میزان رطوبت خاک ۲۹
۲-۱۳-۴ غلظت اوره در محیط ۳۰
۲-۱۳-۵ اکسیژن محیط ۳۰
۲-۱۳-۶ محتوای مواد آلی خاک ۳۱
۲-۱۴ پایداری اوره‌آز در خاک ۳۱
فصل سوم- مواد و روش‌ها ۳۵
۳-۱ کلیات ۳۵
۳-۲ آماده سازی نمونه‌های رس ۳۵
۳-۳ پیش آزمایش‌ها ۳۶
۳-۳-۱ تهیه منحنی استاندارد برای اندازه‌گیری میزان آمونیوم در محلول ۳۶
۳-۳-۲ تعیین زمان مورد نیاز جهت کمپلکس شدن آنزیم با نمونه‌های رس ۳۶
۳-۳-۳ تهیه تیمارهای آزمایش ۳۸
۳-۴ آزمایش‌های اصلی ۳۹
۳-۴-۱ تاثیر غلظت آنزیم بکار رفته و pH محلول آنزیمی بر جذب سطحی و کارآیی آنزیم اوره‌آز ۳۹
۳-۴-۲ تاثیر زمان برفعالیت ویژه آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده در کمپلکس ۴۰
۳-۴-۳ تاثیر دما بر فعالیت ویژه آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده در کمپلکس ۴۱
۳-۴-۴ مطالعه خصوصیات سینتیکی آنزیم اوره‌آز درکمپلکس ۴۲
۳-۵ اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی ۴۳
فصل چهارم- نتایج و بحث ۴۵

۴-۱ تعیین اندازه ذرات کانی‌های رسی سپیولیت و ورمیکولیت ۴۵
۴-۲ تهیه منحنی استاندارد آمونیوم ۴۶
۴-۳ تعیین زمان بهینه تشکیل کمپلکس آنزیم-رس ۴۷
۴-۴ تعیین pH بهینه جذب انزیم اوره‌آز بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت ۵۱
۴-۵ رابطه غلظت اوره‌آز و میزان جذب آنزیم بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت ۵۴
۴-۵-۱ تعیین همدماهای جذب اوره‌آز ۵۴
۴-۶ تاثیر زمان بر فعالیت ویژه آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده در کمپلکس ۵۹
۴-۷ تاثیر دما بر فعالیت ویژه آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده در کمپلکس ۶۲
۴-۸ خصوصیات سینتیکی آنزیم اوره‌آز در کمپلکس آنزیم-رس ۶۵
۴-۸-۱ پارامترهای معادله میکائیلیس-منتن (V_{max} و K_m) ۶۵
۴-۸-۲ نسبت کارآیی کاتالیزوری (Catalytic Efficiency) و فاکتور اثربخشی (η) ۷۲
فصل پنجم – نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۷۵
۵-۱ نتیجه‌گیری ۷۵
۵-۲ پیشنهادات ۷۶
منابع ۷۸
پیوست ۸۹

فهرست شکل‌ها

عنوان شکل **صفحه**

شکل ۱-۱. برهم‌کنش آنزیم و بستره ۱

شکل ۱-۲. ساختمان معمول پروتئین – اتصال دو آمینو اسید توسط یک باند پپتید ۶

شکل ۲-۲. هالو آنزیم‌ها – آپو آنزیم همراه با انواع مختلف کوفاکتورها ۶

شکل ۳-۲. شماتیک ساختاری آنزیم ۹

شکل ۲-۴. شماتیک تشریح هیدرولیز مستقیم و واکنش چگالش ناشی از جذب مولکول‌های زیستی ۹

شکل ۵-۲. تاثیر دما بر سرعت واکنش آنزیمی ۲۸

شکل ۶-۲. تاثیر pH بر سرعت واکنش آنزیمی ۲۹

شکل ۷-۲. تاثیر غلظت بستره بر سرعت واکنش آنزیمی ۳۰

شکل ۸-۲. حضور آنزیم در میان ذرات رس ۳۲

شکل ۳-۱. شماتیک نحوه اعمال تیمارها در آزمایش تعیین زمان مورد نیاز جهت کمپلکس شدن آنزیم اوره‌آز با نمونه‌های رس ۳۸

شکل ۳-۲. شماتیک نحوه اعمال تیمارها در آزمایش غلظت آنزیم- pH محلول ۴۰

شکل ۳-۳. شماتیک نحوه اعمال تیمارها در آزمایش بررسی پایداری آنزیم‌های آزاد و جذب سطحی شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت ۴۱

شکل ۳-۴. شماتیک نحوه اعمال تیمارها در آزمایش بررسی پیامد گرما بر کارآیی آنزیم آزاد و جذب شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت ۴۲

شکل ۳-۵. شماتیک نحوه اعمال تیمارها در آزمایش مربوط به تعیین ویژگی‌های سینتیک آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت ۴۳

شکل ۴-۱. تصویر SEM از ذرات رس سپیولیت (A) و ورمیکولیت (B) ۴۶

شکل ۴-۲. منحنی استاندارد آمونیوم ۴۷

شکل ۴-۳. برهم‌کنش زمان شیک و غلظت اوره‌آز بر درصد جذب آنزیم بر سطح سپیولیت..... ۴۹
شکل ۴-۴. برهم‌کنش زمان شیک و غلظت اوره‌آز بر درصد جذب آنزیم بر سطح ورمیکولیت ۵۰
شکل ۴-۵. تاثیر pH بر میزان آنزیم اوره‌آز جذب شده در رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت (غلظت یک واحد آنزیمی) ۵۲
شکل ۴-۶. رابطه غلظت تعادلی و میزان اوره‌آز جذب شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت.... ۵۴
شکل ۴-۷. همدمای جذب لانگمویر در ارتباط با جذب اوره‌آز بر سطح رس ورمیکولیت (خط پیوسته) و سپیولیت (خط چین) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد..... ۵۵
شکل ۴-۸. همدمای جذب تمکین در ارتباط با جذب اوره‌آز بر سطح رس ورمیکولیت (خط پیوسته) و سپیولیت (خط چین) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ۵۷
شکل ۴-۹: همدمای جذب فروندلیچ در ارتباط با جذب اوره‌آز بر سطح رس ورمیکولیت (خط پیوسته) و سپیولیت (خط چین) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد..... ۵۸
شکل ۴-۱۰. تغییرات فعالیت آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده در رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت در طی ۲۰ روز ۶۱
شکل ۴-۱۱. چگونگی دگرگونی فعالیت آنزیم اوره آزاد و جذب شده در رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت در گستره دمایی ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتیگراد.....۶۳
شکل ۴-۱۲. نمودار میکائیلیس-منتن برای اوره‌آز آزاد و جذب‌شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت ۶۶
شکل ۴-۱۳. نمودار لاین‌ویور بارک برای اوره‌آز آزاد و جذب‌شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت۶۷
شکل ۴-۱۴. نمودار ادی-هافستی برای اوره‌آز آزاد و جذب‌شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت۶۸
شکل ۴-۱۵. نمودار هانس-وولف برای اوره‌آز آزاد و جذب‌شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت۶۹

فهرست جدول‌ها

عنوان جدول **صفحه**

جدول ۴-۱. ضرایب تبیین همدماهای جذب اوره‌آز بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت ۵۶

جدول ۴-۲. ثابت‌های معادله فروندلیچ مربوط به اوره‌آز جذب شده بر سطح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت ۵۹

جدول ۴-۳. خصوصیات سینتیکی آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده بر سطوح دو رس سپیولیت و ورمیکولیت ۷۰

جدول ۴-۴. ثابت و کارآیی کاتالیزوری آنزیم اوره‌آز در حالت آزاد و جذب شده بر سطوح دو رس سپیولیت و ورمیکولیت ۷۳

فهرست علائم و اختصارات

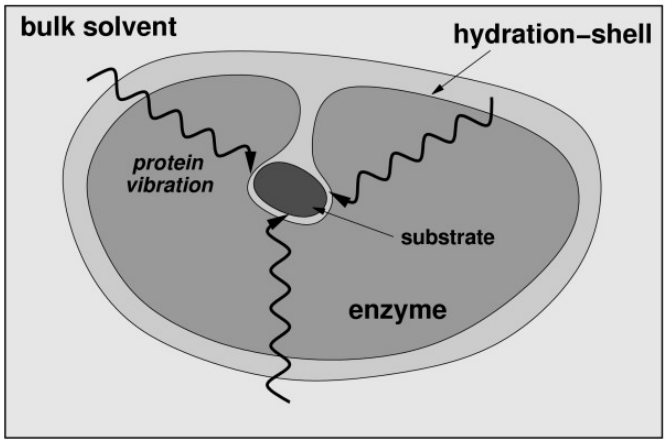
معادل فارسی	معادل انگلیسی	علامت
فاکتور اثربخشی	effectiveness factor	η
غلظت تعادلی	Concentration at equilibrium time	C_e
ظرفیت تبادل کاتیونی	Cation Exchange Capacity	CEC
ثابت کاتالیتیکی	Catalytic constant	K_{cat}
ثابت همدمای لانگمویر	Langmuir isotherm constant	K_L
ثابت میکائیلیس	Michaelis constant	K_m
کربن آلی	Organic Carbon	OC
ظرفیت جذب تعادلی	Equilibrium adsorption capacity	q_e
ظرفیت جذب بیشینه	Maximum adsorption capacity	q_m
ثابت جهانی گازها	Universal gas constant	R
دور در دقیقه	Revolutions Per Minutes	RPM
سپیولیت	Sepiolite	Sep
غلظت بستره	Substrate conc.	Si
دما	Tempreture	T
اوره‌آز	Urease	U
واحد	Unit	U
ورمیکولیت	Vermiculite	Ver
سرعت بیشینه	Maximum velocity	V_{max}
ثابت (فاکتور) وابسته به گرمای جذب	The constant is related to the heat of adsorption	b

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

خاک سیستمی پویاست که برهم‌کنش‌های متفاوتی میان اجزاء مختلف آن رخ می‌دهد. از جمله مهمترین این برهم‌کنش‌ها می‌توان به ترکیبات پیچیده پروتئین‌ها و رس‌ها اشاره کرد. در این راستا، آنزیم‌ها مهمترین ترکیبات پروتئینی خاک می‌باشند که بخش مهمی از مطالعات را به خود اختصاص داده‌اند. آنزیم‌ها پروتئین‌های پیچیده‌ای هستند که توسط تمامی سلول‌های زنده تولید می‌شوند. این پروتئین‌ها، واکنش‌های متفاوتی را کنترل نموده بدون اینکه خودشان متحمل هیچ نوع تغییری شوند. در حقیقت آن‌ها به عنوان کاتالیزور عمل می‌نمایند (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱: بر هم‌کنش آنزیم و بستره (آگاروال، ۲۰۰۶)

آنزیم‌ها ترکیباتی با وزن مولکولی بالا هستند که عمدتا از زنجیره‌های اسیدهای آمینه ساخته شده‌اند (بنت و فریدن، ۱۹۶۹؛ هولوم، ۱۹۶۸؛ مارتینک، ۱۹۶۹؛ هارو و مازور، ۱۹۵۸؛ فیفر، ۱۹۵۴). بیشتر

مطالعات انجام شده، بر تنظیم فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی، تولید و آزادسازی آنزیم (جونز و لاک، ۱۹۸۹؛ رومانی و ساباتر، ۲۰۰۰) و همچنین کمپلکس شدن آنزیم‌ها با ترکیبات هومیک/ پلی فنولیک متمرکز شده است (وتزل، ۱۹۹۱؛ بوآویدا و وتزل، ۱۹۹۸؛ رائو و جیانفردا، ۲۰۰۰)، اما تاکنون مطالعات بسیار کمی پیرامون اثرات متقابل بین ترکیبات پروتئینی خاک (به ویژه آنزیم‌ها) و ذرات غیر آلی به خصوص کانی‌های رسی صورت گرفته است (تیجن و وتزل، ۲۰۰۳). از آن‌جا که آنزیم‌ها از مهمترین ترکیبات پروتئینی خاک هستند که انجام بسیاری از واکنش‌ها در خاک را تسهیل و در مواردی انجام واکنش‌ها را امکان پذیر می‌سازند، بنابراین، مطالعه پایداری آن‌ها در شرایط مختلف محیطی بسیار حائز اهمیت بوده و یکی از مسیرهای اصلی تحقیق در آنزیم شناسی کاربردی به شمار می‌رود (کاکس و کلیبانوف، ۱۹۸۸؛ موزهیو و همکاران، ۱۹۸۹). غیرمتحرک شدن آنزیم‌ها یکی از روش‌ها جهت پایدار نمودن آنزیم‌ها است (صداقت و همکاران، ۲۰۰۹a)، از این منظر، با غیرمتحرک شدن آنزیم، غیر فعال شدن آن عمدتا کاهش و ارزش اقتصادی آن افزایش می‌یابد (کاچالسکی-کتزیر، ۱۹۹۳؛ فاگین، ۲۰۰۳). از دیگر مزایای غیرمتحرک شدن آنزیم‌ها می‌توان به ادامه و کنترل مناسب فرآیندهای آنزیمی، جداسازی ساده‌تر محصولات واکنش‌ها، کاهش محصولات ناخواسته، پایداری در دماها و pH بالا و ... اشاره نمود (پارک و همکاران، ۲۰۰۲).

در این بین، سطوح رس‌ها در ماتریکس خاک، به عنوان یکی از محیط‌های کوچک اما بسیار مهم جهت انجام واکنش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی، نقش بسزایی را در فرآیند غیرمتحرک شدن آنزیم‌ها ایفا نموده و در حفظ و یا مختل شدن فعالیت این ترکیبات پروتئینی، از اهمیتی خاص برخوردار هستند (استاتزکی، ۱۹۷۲). بنابراین مطالعه چگونکی تاثیر کانی‌های رسی بر پروتئین‌ها و بر هم‌کنش آن‌ها، ما را در شناخت سیستم پیچیده خاک در جهت اعمال راهکارهای مدیریتی مطلوب کمک خواهد کرد. به عنوان مثال، در یک مطالعه آزمایشگاهی در مورد تاثیر رس‌ها بر نگهداری مواد آلی طی فرآیند هوموسی شدن، مشخص شد که رس مونتموریلونیت اثر مشخصی را در نگهداری کربن- به عنوان یکی از عناصر مهم در ترکیبات آلی- از خود نشان می‌دهد، به طوری که با افزودن ۱۰٪ از رس مونتموریلونیت به شن،

در موارد خاصی فرآیند مذکور تا دو برابر افزایش می‌یابد (آلیسون و همکاران، ۱۹۴۹). با وجود اهمیت این برهم‌کنش‌ها میان ترکیبات پروتئینی و رس‌ها، تنها تعدادی تحقیقات محدود بنیادی در مورد کمپلکس‌های ترکیبات آلی-رس انجام شده و از سوی دیگر در عمده این مطالعات نیز کانی غالب منطقه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. از گروه آنزیم‌هایی که به طور گسترده بر رفتار و سرنوشت آن در خاک پژوهش‌هایی انجام شده است، آنزیم اوره‌آز (EC 3.5.1.5) می‌باشد (اندروز و همکاران، ۱۹۸۹). در زمینه کشاورزی، اوره از کودهایی است که دگرگونی و هیدرولیز آن در خاک، به کارکرد آنزیم اوره‌آز در خاک وابسته است و این فرآیند یک واکنش کلیدی در چرخه نیتروژن به شمار می‌رود (برمنر و مولوانی، ۱۹۷۸). کارآیی و سرنوشت این کود در خاک بسیار وابسته به حضور، فعالیت و همچنین پایداری آنزیم اوره‌آز در خاک می‌باشد. اوره‌آز آنزیمی است که آبکافت اوره به دی اکسیدکربن و آمونیاک را کاتالیز می‌کند (برمنر و مولوانی، ۱۹۷۸؛ کیس و همکاران، ۱۹۷۵؛ پتیت و همکاران، ۱۹۷۶؛ کوجینز، ۱۹۶۷).

در این پژوهش برهم‌کنش میان آنزیم اوره‌آز که یکی از مهمترین آنزیم‌های چرخه نیتروژن در خاک است و رس‌های ورمیکولیت و سپیولیت، با توجه به وفور آن‌ها در ایران و موارد استفاده فراوان از آن‌ها در بسیاری از مطالعات مشابه (آنیتا و همکاران، ۱۹۹۷؛ صداقت و همکاران، ۲۰۰۹a) آزمایش شد. همچنین تاثیر فاکتورهای pH و غلظت آنزیم به کار رفته بر چنین برهم‌کنش‌هایی بررسی گردید. متعاقبا در آزمایشاتی جداگانه، علاوه بر مطالعه اثر فاکتورهای دما و زمان بر این برهم‌کنش‌ها، ویژگی‌های سینتیکی آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده نیز مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که 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 به لحاظ گروه‌بندی، در دسته فیلوسیلیکات‌ها جا دارد. ورمیکولیت نیز با فرمول شیمیایی $[Mg(H_2O)_6]_{n/2}[(Mg^{2+}, Fe^{2+})_3(Si_{4-n}, Al_n)O_{10}(OH)_2]$ از دسته فیلوسیلیکات‌ها است. این کانی سفید تا قهوه‌ای رنگ، به لحاظ ریخت ورقه‌ای (فلس مانند) خود کاملا قابل تمایز نسبت به اغلب 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 در راستای پاسخگویی به سوالات زیر می‌باشد:

۱- آیا غلظت آنزیم بر فعالیت و جذب آنزیم اوره‌آز در رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت تاثیرگذار است؟

۲- در کدام pH، آنزیم اوره‌آز در برهم‌کنش با رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت، بیشترین فعالیت را دارا است؟

۳- آیا فعالیت آنزیم اوره‌آز در زمان‌ها و تیمارهای دمایی مختلف در کانی‌های رسی سپیولیت و ورمیکولیت تغییر می‌کند؟

۴- خصوصیات سینتیکی آنزیم اوره‌آز آزاد و جذب شده بر سطوح رس‌های سپیولیت و ورمیکولیت چگونه است؟

۵- آیا نوع رس بر فعالیت آنزیم اوره‌آز در شرایط آزمایش اثرگذار است؟

فصل دوم

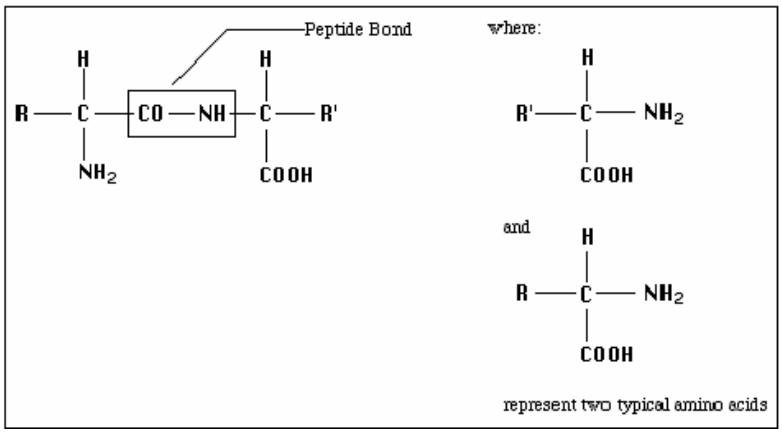
بررسی منابع

۲-۱ تاریخچه آنزیم‌شناسی

در سال ۱۸۳۵، ژان ژاکوب برزلیوس شیمیدان سوئدی، عبارت "کاتالیز واکنش‌های شیمیایی" را مطرح نمود. این آغاز، توسط دستاوردی بزرگ از جیمز بی. سامنر (۱۹۲۶)، محقق دانشگاه کورنل کامل شد. سامنر موفق به جداسازی و تبلور آنزیم اوره‌آز (اوره آمیدوهیدرولاز، EC 3.5.1.5) از لوبیا (*Canavelia enciformis*) گردید. این موفقیت، جایزه نوبل را برای او در سال ۱۹۴۷ به ارمغان آورد (فیفر، ۱۹۵۴؛ هارو و مازور، ۱۹۵۸؛ بنت و فریدن، ۱۹۶۹؛ مارتینک، ۱۹۶۹؛ دیک و طباطبایی، ۱۹۹۲).

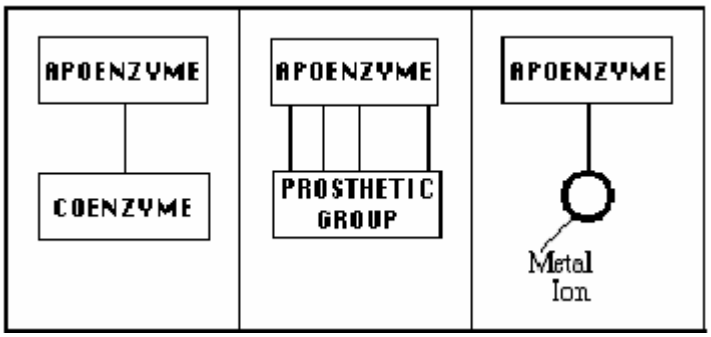
۲-۲ طبیعت شیمیایی آنزیم‌ها

تقریبا تمام آنزیم های شناخته شده، از جنس پروتئین‌ها هستند. آن‌ها ترکیباتی با وزن مولکولی بالا (۱۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰۰ دالتون)، متشکل از زنجیره‌های اسیدهای آمینه می‌باشند (شکل ۲-۱).



شکل ۲-۱: ساختمان معمول پروتئین – اتصال دو آمینو اسید توسط یک باند پپتید (مارتینک، ۱۹۶۹)

بسیاری از آنزیم‌ها جهت فعالیت‌های کاتالیتیکی خود، نیاز به حضور ترکیبات دیگری چون "کوفاکتورها" دارند. ترکیب اصلی شرکت کننده به عنوان کاتالیزور، در حقیقت کمپلکسی فعال به نام[1] هولو آنزیم می‌باشد که ترکیبی از یک بخش پروتئینی[2] (آپو آنزیم)، به اضافه کوفاکتور است (شکل ۲-۲).



شکل ۲-۲: هولو آنزیم‌ها – آپو آنزیم همراه با انواع مختلف کوفاکتورها (مارتینک، ۱۹۶۹)

کوفاکتور ممکن است شامل یکی از موارد زیر باشد:

۱- یک کوآنزیم: ترکیبی آلی غیر پروتئینی، قابل تجزیه، مقاوم در برابر حرارت و دارای اتصال ضعیف به بخش پروتئینی.

۲- یک گروه پراستتیک: ترکیبی آلی، قابل تجزیه، مقاوم در برابر حرارت و دارای اتصال قوی به پروتئین یا بخش آپوآنزیم.

[1] Holoenzyme
[2] Apoenzyme