

УДК 631.46

Оценка основных кинетических параметров каталазы в почве

Фариз Михайлов

Кафедра почвоведения и питания растений сельскохозяйственного факультета университета «Ыгдыр», 76000, г. Ыгдыр, Турция, fariz.m@igdir.edu.tr

АННОТАЦИЯ

По вопросам кинетики ферментативных процессов почв проведены многочисленные исследования, в которых кинетические параметры V_{\max} и K_M определяют с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен, в качестве значения скорости реакции обычно используют значения активности ферментов за короткий период времени от начала реакции. В отличие от этих исследований, нами в работе для определения значения начальной скорости ферментативной реакции применялись аналитические методы. Приведены расчеты для определения значений начальной скорости и кинетических параметров фермента каталазы в почве.

Ключевые слова: начальная скорость, кинетические параметры, каталаза, почва.

Assessment of the main parameters of catalase kinetics in soil

Fariz Mikayilov

Department of Soil Science and Nutrition of Plants of Agricultural Faculty of "Iğdır" University, 76000, Iğdir, Turkey, fariz.m@igdir.edu.tr

Abstract. Numerous studies have been carried out on the kinetics of enzymatic processes in soils in which the kinetic parameters V_{\max} and K_M are determined using the Michaelis-Menten equation. The enzyme activity values for a short period of time from the start of the reaction are usually used as the value of the reaction rate. In contrast to these studies, we used analytical methods to determine the initial rate of the enzymatic reaction. Calculations are made for determining the values of the initial velocity and kinetic parameters of catalase in the soil. The conducted studies show the dependence of the accumulation of the catalase enzymatic reaction products from the incubation time at various concentrations of substrates in the soils of Konya province. It has been shown that the amount of the reaction products grows nonlinearly, moreover it is described by the most accurate and adequate model - a polynomial of the 4th degree.

Using this model, the initial velocity values for each substrate concentration were calculated. The curves of the dependence of the initial rate of the catalase reaction in the soil from the substrate concentration for the soils of the Chumra region have a monotonous form. Thus, we were able to improve the accuracy of determining the initial reaction rate and the kinetic parameters V_{\max} and K_M of the enzymatic reaction of hydrogen peroxide decomposition by catalase in real soil conditions.

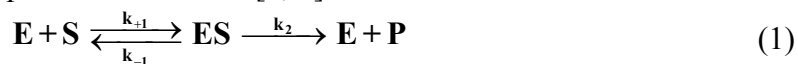
Key words: initial velocity, kinetic parameters, catalase, soil.

Введение. При исследовании механизма ферментативного катализа в энзимологии широко применяются кинетические методы – это определение скорости ферментативной реакции в зависимости от различных факторов – температуры, pH, концентрации фермента и субстрата, наличия кофакторов ингибиторов, адсорбции ферментов и т.д. [2, 3].

По вопросам кинетики ферментативных процессов почв проведены многочисленные исследования [1–4, 9, 11-14], которые позволяют утверждать о реальности применения

методов классической стационарной кинетики для описания энзиматических процессов в почве и познания механизма действия почвенных ферментов.

Простейшая схема ферментативного катализа включает обратимое образование промежуточного комплекса фермента (E) с реагирующим веществом (*субстратом*, S) и разрушение этого комплекса с образованием продуктов реакции (P). В простейшем случае уравнение реакции с участием фермента имеет вид [6, 8]:



где E – фермент; S – субстрат; [ES] – фермент-субстратный комплекс (так называемый комплекс Михаэлиса); P – продукт; k_{+1} – константа скорости реакции образования фермент-субстратного комплекса из фермента и субстрата; k_{-1} – константа скорости реакции диссоциации фермент-субстратного комплекса на фермент и субстрат; k_2 – константа скорости реакции превращения фермент-субстратного комплекса в фермент и продукт.

Выражение для начальной скорости (v_0) реакции выглядит так [6-9]:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (2)$$

где $[S]_0$ – начальная концентрация субстрата, V_{\max} – максимальная скорость реакции при полном насыщении фермента субстратом и $K_M = (k_{-1} + k_2) / k_{+1}$ – называется *константой Михаэлиса теории Бриггса – Холдейна*.

Уравнение (2) является фундаментальным уравнением ферментативной кинетики и обычно называется *уравнением Михаэлиса – Ментен* или *Бриггса–Холдейна*. Оно служит полезной отправной точкой для анализа кинетики ферментативных процессов.

Известно, что со временем скорость реакции $v = d[P]/dt$ уменьшается, так как уменьшается накопление продукта. Уменьшение скорости может объясняться следующими причинами:

- поскольку в ходе реакции концентрация субстрата уменьшается, то уменьшается и степень насыщения фермента субстратом;
- продукты реакции могут угнетать активность фермента;
- при увеличении концентрации продуктов реакция равновесия может сдвигаться влево;
- возможна инактивация фермента или кофермента из-за нестабильности условий, при которых проводится опыт;
- все перечисленные факторы могут действовать одновременно.

Для того чтобы избежать влияния этих факторов на кинетику ферментативных реакций, стараются оперировать не скоростью реакции вообще, а скоростью реакции в начальный момент времени ($t=0$, т.е. начальной скоростью v_0). В этот начальный период времени всевозможные нежелательные факторы еще не успевают проявить свое действие

Одной из основных задач ферментативной кинетики является нахождение значения начальной скорости v_0 от времени. Эта задача решается в основном аналитическим методом.

Аналитический метод определения начальной скорости ферментативных реакций основан на установлении наиболее истинного (адекватно описывающего) аналитического выражения кинетической кривой $v=P(t)$. Для этого можно воспользоваться полиномом степени n по t:

$$[P(t)] = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_n t^n = \sum_{k=0}^n a_k t^k, \quad (n = 4, 5, 6, 7) \quad (3)$$

Коэффициенты a_i находятся с применением математических пакетов. Величину $[P(t)]$ измеряют через определенные промежутки времени t .

Следовательно, если имеется аналитическое уравнение для кинетической кривой $v=P(t)$, то с помощью формулы $v_0 = d[P]/dt|_{t=0}$ можно определить начальную скорость v_0 . Для выражения (3) она имеет вид:

$$v_0 = d[P]/dt|_{t=0} = (a_1 + 2a_2t + \dots)|_{t=0} = a_1 \quad (4)$$

В принципе, чем больше членов содержит модель (3), тем лучше можно описать кинетическую кривую.

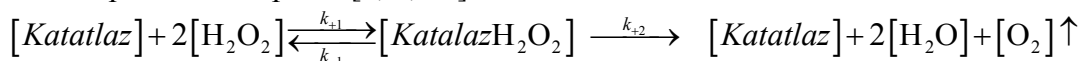
Метод определения v_0 с помощью (4) обладает своими достоинствами и недостатками. С одной стороны, этот метод можно применять независимо от того, известно ли истинное уравнение скорости реакции; метод пригоден и в тех случаях, когда процесс осложняется во времени денатурацией фермента.

С другой стороны, использование (4) дает гораздо меньше информации о кинетической кривой. Коэффициенты a_0, a_1, a_2, \dots - не имеют физического смысла, и их нельзя преобразовать в параметры, связанные с механизмом ферментативного процесса [6].

После определения значения начальной скорости v_0 , далее на основе формулы (2), легко можно найти кинетические параметры V_{max} , K_M и V_{max}/K_M .

Показателем экологического состояния почв и ее биологической активности является наличие и активность каталазы ($H_2O_2:H_2O_2$), которая характеризует потенциальную способность экосистемы сохранять гомеостаз.

Роль каталазы в почве заключается в том, что она разрушает ядовитую для организмов перекись водорода [5, 7, 12].



Активность каталазы в почве в большей степени зависит от воздушного режима, гранулометрического состава почв, окислительно-восстановительного потенциала и других условий [10]. Изменение свойств почв на фоне освоения оказывает влияние и на активность каталазы. При сельскохозяйственном освоении возможно нарушение работы ферментных комплексов, поэтому изучение активности каталазы в почвах является актуальным.

Вопросы изменения кинетических характеристик каталазы в почвах Турции на основе использования начальной скорости до настоящего времени оставались неизученными.

Целью наших исследований являлось повысить точность определения *начальной скорости и кинетических параметров* изучения кинетических характеристик каталазы ($V_0, K_M, V_{max}, V_{max}/K_M$) в почвах района Чумры (Провинция Конья, Турция). Эти параметры являются важной характеристикой почвенной биологической активности и почвенного плодородия.

Условия, материалы и методы исследования. Район исследования Чумра (Çumra) расположен в Центральной Анатолии, в провинции Конья, в центральной части Турции между 37–38° восточной долготы и 33–34° северной широты на высоте 1013 м н.у.м.

Климатические условия района Чумры и его окружения формируются под воздействием различных географических факторов, из которых самым главным является континентальность: лето жаркое и сухое, а зима холодная и малоснежная. Средняя годовая температура составляет около 11°C, а среднегодовая сумма осадков 324 мм.

Количество осадков заметно снизилось в последние годы по сравнению с предыдущими годами исследований.

На опытном участке сельскохозяйственного факультета университета Сельджук (г. Конья) был заложен почвенный разрез. Опытный участок (с выращиваемой традиционной для района сахарной свеклой) орошался капельным способом полива.

Почвенные образцы были отобраны в слое 0–30 см. Физико-химическая характеристика исследованных образцов представлена в таблице 1. Почва опытного участка имеет тяжелый гранулометрический состав по всему профилю. По международной классификации почва является аллювиальной карбонатной тяжелосуглинистой.

Таблица 1. Физико-химическая характеристика почвы (0–30 см)

S	pH	Corg	N	CaCO ₃	EC	Глина	Пыль	Песок	Текстура	C
	1:1	%	%	%	dS/m	%	%	%		
–	7.63	0.86	0.13	2.37	0.832	40.80	53.52	5.68	SC	

Silty Clay (Средняя легкая тяжелая глина)

Для определения активности каталазы использовали газометрический метод в модификации Галстяна [5,12].

Результаты исследования. Активность каталазы определяли при постоянном помешивании в воздушно-сухих почвенных образцах, используя свежеприготовленные субстраты различной концентрации (3, 6, 9, 18 и 24 %). Фиксировали количество выделяющегося кислорода за 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 и 5 мин. (Таблица 2 и рисунок 1).

Скорость разложения пероксида водорода каталазой в почвах выражали по объему выделившегося кислорода в мл ($[P]=O_2$) за $t=0.5, 1.0, \dots, 4.5$ и 5 мин на 1 г сухой почвы. Опыт проводили при температуре 18–20 °C.

Таблица 2. Количество выделившегося кислорода [P], в мл O₂ на 1 г почвы

i	Время, t мин	Концентрации субстрата, H ₂ O ₂ , %					
		3	6	9	12	18	24
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0,5	2,37	5,57	9,07	10,93	13,97	12,40
3	1,0	6,93	11,37	13,13	16,77	19,37	16,80
4	1,5	7,93	13,07	15,30	21,90	25,37	19,05
5	2,0	8,40	15,83	17,17	25,63	26,93	20,65
6	2,5	8,20	18,20	19,73	28,63	29,23	21,52
7	3,0	8,47	20,20	21,97	30,37	31,60	22,11
8	3,5	8,80	20,80	22,03	30,93	31,63	22,96
9	4,0	9,00	20,43	23,20	32,03	32,20	23,76
10	4,5	9,33	21,00	24,40	32,80	33,83	24,66
11	5,0	9,53	20,70	24,47	34,17	34,93	25,57

Рис 1. Изменение объема выделившегося кислорода в мл ($[P]=O_2$) на 1 г почвы.

Используя экспериментальные данные (Таблица 2), для полиномов 4, 5, 6 и 7 степени, с применением математического пакета Statistica 12, для каждой концентрации (3, 6, 9, 12, 18 и 24 %) субстрата, были вычислены коэффициенты модели (3).

Потом, используя значения этих коэффициентов, с помощью формулы (4) вычислили значения начальной скорости фермента каталазы (Таблица 3) и основные статистические параметры, показывающие адекватность моделей (3) (Таблица 4).

Таблица 3. Значение начальной скорости v_0 (мл O_2 / минута на 1 г почвы)

№	Концентрация Субстрата	Значение начальной скорости V_0 (мл O_2 / минута на 1 г почвы)			
	$[S]_0$	Степени полинома (3)			
	%	4	5	6	7
1	0	0	0	0	0
2	3	9,9187	6,45751	0,2326	-6,2821
3	6	13,1444	15,81568	14,93456	2,6424
4	9	19,2821	24,5523	30,0087	23,76976
5	12	22,1924	25,5420	30,2236	33,0360
6	18	29,6878	34,6685	39,7757	39,5005
7	24	27,8943	33,2218	37,5814	41,2383

Таблица 4. Основные статистические параметры моделей (3) для 4, 5, 6 и 7.

№		Степени полинома (3)			
		4	5	6	7
1	ESS	15,93	33,98	173,51	397,81
2	R^2_{adj}	0,97	0,96	0,88	0,80
3	RMSE	1,79	2,61	5,89	8,92
4	A, %	5,85	12,07	598,26	95,14
5	AICc	1,82	2,58	4,21	5,04
6	F	204,07	139,19	37,60	19,72
7	$F(\alpha=0,05)$	6,61	6,61	6,61	6,61
8	$F(\alpha=0,01)$	16,26	16,26	16,26	16,26

Здесь, ESS – остаточная сумма квадратов, характеризующая отклонение от регрессии, R^2_{adj} – скорректированный коэффициент детерминации, RMSE – средняя квадратичная ошибка модели, A – относительная ошибка аппроксимации, AICс – информационный критерий Акаике, F, $F(\alpha=0,05)$ и $F(\alpha=0,01)$ – соответственно вычисленные и табличные значения критерия Фишера.

Анализируя статистические показатели всех рассмотренных моделей, приведенные в таблице 4, установили, что зависимость между [P] и t лучше всего описывается полиномом 4-той степени.

Далее, для определения параметров V_{max} и K_m модели (2), использовали найденные значения начальной скорости (Таблица 3). Для всех рассмотренных степеней полинома (3), с помощью программы Statistica 12, вычислили значения этих кинетических параметров и их статистические показатели (Таблица 5).

Таблица 5. Основные статистические параметры моделей (2).

	Estimate	Standard error	t-value df = 5	p-level	Lo. Conf Limit	Up. Conf Limit
n=4						
V_{max}	44,5896	5,8128	7,6709	0,0006	29,6472	59,5320
K_m	11,9193	3,3285	3,5810	0,0159	3,3631	20,4755
n=5						
V_{max}	58,2428	10,7673	5,4092	0,0029	30,5645	85,9211
K_m	14,9743	5,4128	2,7664	0,0395	1,0601	28,8884
n=6						
V_{max}	78,8743	36,2784	2,1741	0,0817	-14,3824	172,1309
K_m	21,0899	16,7247	1,2610	0,2629	-21,9024	64,0821
n=7						
V_{max}	267,0588	777,0818	0,3437	0,7451	-1730,4936	2264,6112
K_m	116,4604	391,8019	0,2972	0,7782	-890,6985	1123,6193

Анализируя статистических (**Standard Error, t-value for df = 5, p-level, Lo. Conf** и **Up. Conf Limit**) показателей параметров V_{max} и K_m модели (2), еще раз показывает, что результаты нами проведенных анализов лучше описывается полиномом 4-той степени.

Окончательные значение кинетических параметров V_{max} , K_m и V_{max} / K_m , вычисленные с помощью значений начальных скорости, определенные по полиному 4-степени и имеют следующие значения: $V_{max}=44,5896$ мл O₂/мин на 1 г почвы, $K_m=11,9193$ % и $V_{max} / K_m=3,7409$.

Выводы

Проведенные исследования показывают зависимость накопления продуктов ферментативной реакции для каталазы от продолжительности инкубации при различных концентрациях субстратов в почвах провинции Коньи: количество продуктов реакции растет нелинейно, более того описывается наиболее точной и адекватной моделью – полиномом 4 степени. С использованием этой модели были вычислены значения начальной скорости для каждой концентрации субстрата. Кривые зависимости начальной

скорости каталазной реакции в почве от концентрации субстрата для почв района Чумра имеют монотонную форму. Таким образом, нам удалось повысить точность определения начальной скорости реакции и кинетических параметров V_{\max} и K_M ферментативной реакции разложения перекиси водорода каталазой в реальных почвенных условиях.

Список литературы

1. Алиев С. А., Гаджиев Д. А., Микайылов Ф. Д. Кинетические показатели активности каталазы в основных типах почв Азербайджанской ССР // Почвоведение, 1981. №9. С. 107–112.
2. Алиев С. А., Гаджиев Д. А., Микайылов Ф. Д. Кинетические и термодинамические характеристики ферментов инвертазы и уреазы в почвах Азербайджанской ССР // Почвоведение, 1984. №11. С. 55–66.
3. Асеева И.В., Паников Н.С. Кинетика ферментативных процессов распада нуклеиновых кислот в почве // Экологические условия и ферментативная активность почв. Уфа, 1979. С. 112–125.
4. Водопьянов В.В., Гузаиров М.Б., Киреева Н.А. Математическое моделирование процессов в антропогенно нарушенных почвенных биосистемах. М.: Машиностроение, 2010. 232 с.
5. Галстян А. Ш. Унификация методов определения активности ферментов почв // Почвоведение, 1978. №2. С. 107–114.
6. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. 280 с.
7. Купревич В. Ф., Щербакова Т. А. Почвенная энзимология. Минск: Наука и техника, 1966. 275 с.
8. Курский М. Д., Костерин С.А., Рыбальченко В. К. Биохимическая кинетика. Киев: Высшая школа, 1977. 262 с.
9. Микайылов Ф.Д., Хабиров И.К. Некоторые вопросы моделирования ферментативных процессов в почве // Почва как связующее звено функционирования природных и антропогенно-преобразованных экосистем: Материалы III Международной научно-практической конференции Иркутск (Россия), 2011, 15–22 августа. С.166–171.
10. Раскова Н.В., Звягинцев Д.Г. Активность каталазы в почвах под широколиственно-еловым лесом и лугом // Почвоведение, 1981. №6. С. 76–81.
11. Хазиев Ф.Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М.: Наука, 1983. 203 с.
12. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 254 с.
13. Kızılkaya R, Samofalova I, Mudrykh N, Mikailsoy F, Akça İ, Sushkova S, Minkina T. Assessing the impact of azadirachtin application to soil on urease activity and its kinetic parameters. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2015. 39(6). Pp. 976 – 983.
14. Mikayilov F.D., Erol A.S., Agircan B., Temel K.A. Mathematical modeling of catalase activity in soils // Proceedings of the International Conference on ‘Prospects of Innovative Development of Agriculture’, (11 – 14 march, 2014, Ufa, Russia). Гафб 2014. Part 1. Pp. 182 – 190.