

БИОХИМИЯ

А. Ш. Галстян

Влияние температуры на активность ферментов почвы

(Представлено академиком АН Армянской ССР Г. С. Давтяном 25/IX 1964)

Процессы разложения и синтеза органических веществ в почве происходят под действием ферментов. Сущность каталитического действия ферментов заключается в значительном снижении энергии активации, необходимой для преодоления энергетического барьера при соответствующей химической реакции ( $1-4$ ). В связи с этим скорость ферментативных реакций почвы находится в определенной зависимости от температуры среды. До сих пор этот вопрос в специальной литературе недостаточно освещен, имеются лишь отдельные данные, касающиеся скорости ферментативных реакций при сравнительно низких температурах и энергии активации действия инвертазы и каталазы почв ( $5-7$ ).

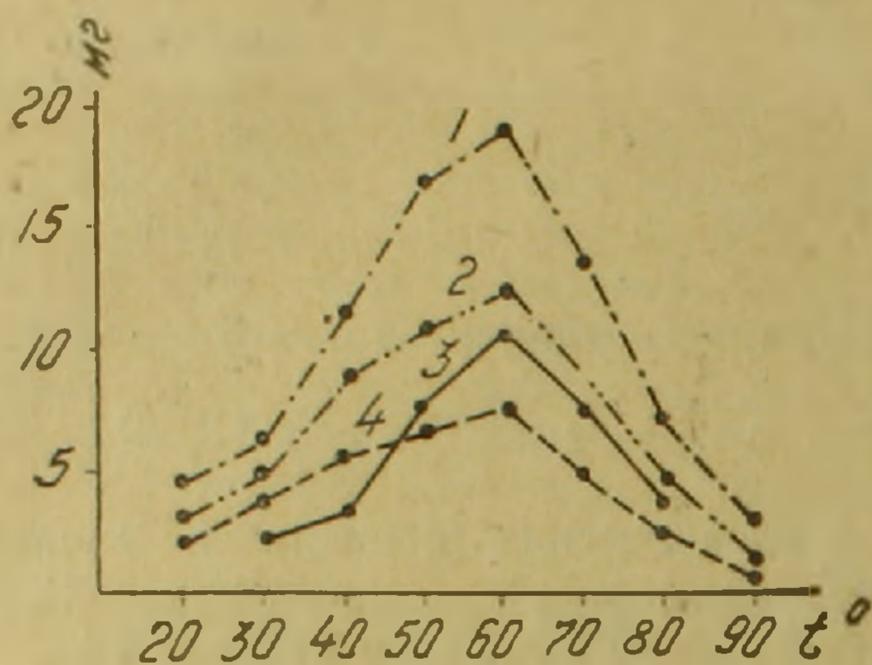
В этой работе приводятся некоторые данные о влиянии температуры на скорость ферментативных реакций почвы и нагревания почвы на активность ее ферментов. Эти данные могут представить определенный интерес для познания характера действия ферментов в почве.

Исследование проводилось на черноземе, каштановой и бурой почвах. Образцы почв высушивались при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния, очищались от корней и поступали на анализ. Активность ферментов почвы определялась методами, принятыми в нашей лаборатории ( $8$ ).

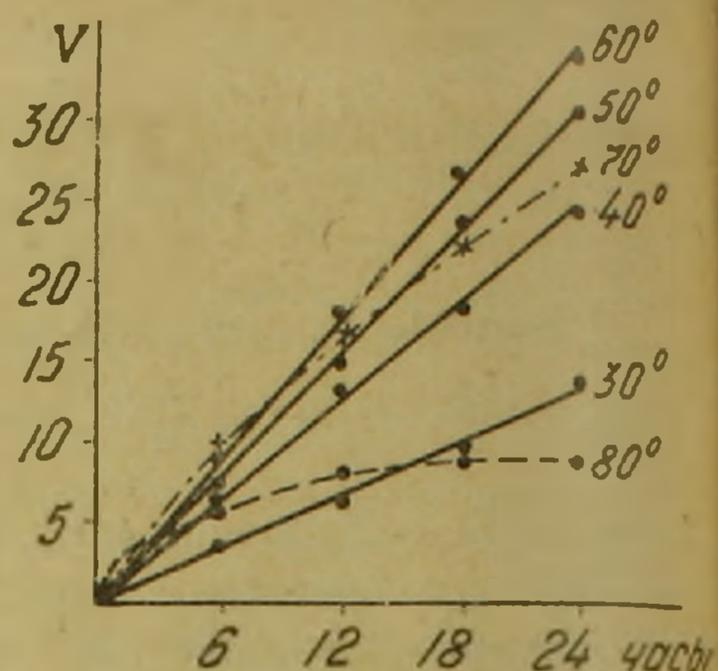
Для выявления зависимости скорости ферментативной реакции от времени почву с субстратом инкубировали при различных значениях температуры в течение определенного периода времени. Зависимость активности ферментов почвы от температуры, которая почти одинакова для исследованных почв, изображена кривыми (фиг. 1). Оптимальная температура для почвенных гидролаз находится около  $60^\circ$ , после чего скорость реакции падает. Выше  $80^\circ$  образовавшийся при уреазной реакции аммиак улетучивается из среды, что не дает возможности определить ее активность при высоких температурах.

Температура оказывает двоякое влияние на скорость ферментативной реакции почвы. Это становится очевидным, когда скорость реакции определяется в более короткие промежутки времени (фиг. 2). В начале инкубации при всех температурах имеет место повышение скорости

ферментативной реакции почвы. В течение первых двух часов инкубации при температуре 70 и 80° скорость реакции большая, но она сохраняется сравнительно короткий период времени. Затем наблюдается падение скорости реакции. Здесь одновременно с повышением скорости



Фиг. 1. Влияние температуры на активность гидролитических ферментов почвы. 1 — инвертаза; 2 — β-глюкозидаза; 3 — уреазы; 4 — амилаза.



Фиг. 2. Зависимость скорости инвертазной реакции почвы от температуры и времени ее определения.

ферментативной реакции происходит тепловая инактивация, что является результатом денатурации белка, при которой происходит деструкция молекулы фермента. При остальных температурах течение ферментативной реакции не меняется, что отражается в прямолинейной зависимости скорости реакции от времени ее определения. Течение этой реакции в почве аналогично с реакцией чистого ферментного препарата инвертазы (2). Разница лишь в том, что в почве при 60° она не инактивируется.

Изменение скорости ферментативной реакции под влиянием температуры можно выражать с помощью температурного коэффициента  $Q_{10}$  (1-4), показывающего во сколько раз увеличивается скорость реакции при повышении температуры на 10°. Температурный коэффициент  $Q_{10}$  для ферментативных реакций почвы в основном лежит в пределах 1—2, но для некоторых ферментов, в частности окислительно-восстановительных, бывает больше двух (табл. 1), а иногда даже выше, чем для химических реакций с неорганическими катализаторами, который лежит в пределах 2—4.

Температурный коэффициент ферментативных реакций почвы показывает ход активации и инактивации фермента при повышении температуры. По его значению можно судить об изменении структуры белковой молекулы фермента. В интервале температур, где молекула фермента претерпевает деструкцию, значение  $Q_{10}$  бывает меньше единицы. Такой интервал температуры можно называть порогом денатурации белковой молекулы фермента. Приведенные данные показывают, что тепловая инактивация ферментов происходит различно, она зависит от

природы фермента и физико-химических свойств почвы. Характер изменения  $Q_{10}$  почвенных карбогидраз почти одинаковый, их инактивация и активация происходят умеренно. Скорость реакции почвенных дегидроге-

Таблица 1

Изменение температурного коэффициента  $Q_{10}$  ферментов почвы

Температурный интервал	Инвертаза	Амилаза	$\beta$ -глюкозидаза	Фосфатаза	Дегидразы
20—30°	1,98	2,0	1,92	1,79	8,89
30—40°	1,78	1,63	1,65	1,28	1,78
40—50°	1,27	1,20	1,28	1,18	1,08
50—60°	1,13	1,11	1,16	1,03	0,49
60—70°	0,77	0,64	0,74	0,88	0,0
70—80°	0,30	0,50	0,47	0,79	0,0

наз как в сторону повышения, так и убывания меняется сравнительно резко. Уже при 50° отмечается деструкция их молекул. Дегидрогеназы почвы максимальной активностью действуют при 45° (фиг. 3). При этом скорость их реакции до 35° возрастает быстро, затем до 45° имеет место медленный подъем, после чего она падает. При 70° дегидрогеназы почвы полностью инактивируются (табл. 2). Опыты показали, что при 100° наблюдается регенерация молекул дегидрогеназ, которая с дальнейшим повышением температуры снова инактивируется. При различных температурах отмечается специфичность действия дегидрогеназ.

Таблица 2

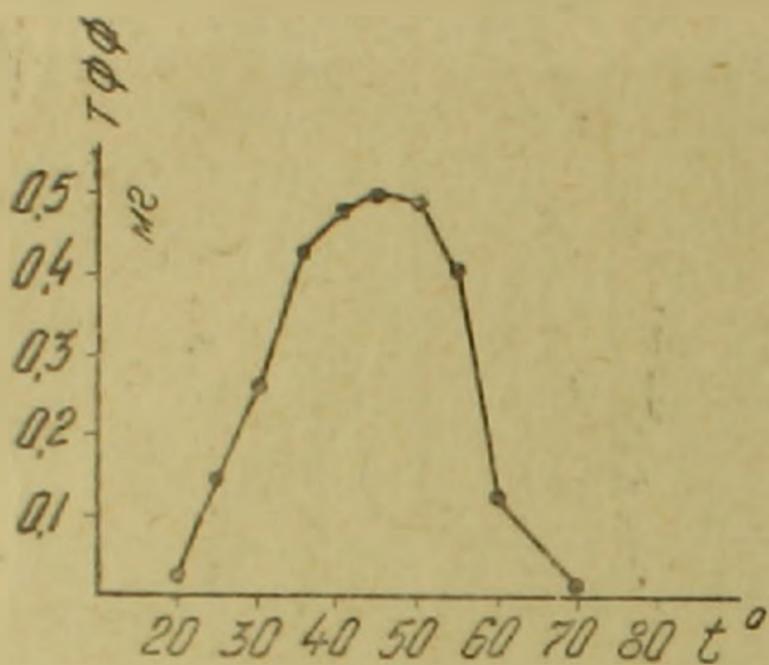
Влияние температуры на действие дегидрогеназ почвы (мг ТФФ на 10 г почвы)

Температура, С°	Без донаторов	Донаторы водорода				
		Глюкоза	Глицерофосфат	Лимонная к-та	Глютаминная к-та	Этиловый спирт
20°	0,1	0,2	0,2	0,1	1,4	0,1
30°	0,2	3,5	1,3	1,0	1,8	1,2
40°	0,4	4,9	3,2	2,8	3,8	2,7
60°	0,3	1,2	0,2	0,9	0,6	1,4
70°	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
80°	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
90°	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100°	0,1	1,9	0,5	0,0	0,1	0,0
110°	0,1	2,5	0,6	0,1	1,0	0,1

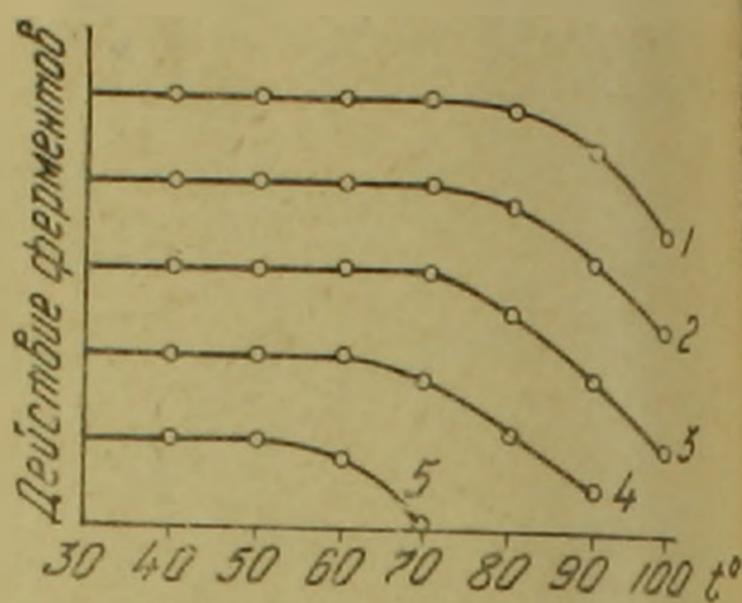
В почве наиболее активно действует глюкозодегидрогеназа. При высоких температурах ее молекула регенируется больше, чем молекулы остальных дегидрогеназ. Регенерация молекул гидролитических фер-

ментов почвы при высоких температурах в наших опытах не наблюдалась. Следовательно, денатурация почвенных гидролаз необратимый процесс.

Для изучения влияния нагревания почвы на активность ее ферментов к нагретой при различных температурах почве прибавляли субстраты и по принятой методике определяли действие ферментов. Выяснилось,



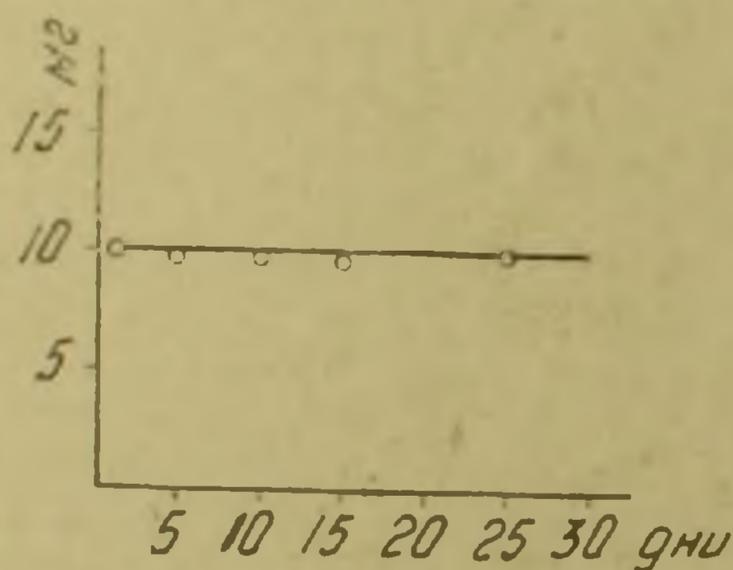
Фиг. 3. Влияние температуры на действие дегидрогеназ почвы.



Фиг. 4. Влияние нагревания почвы на активность ее ферментов. 1— фенолоксидазы; 2— каталаза; 3— инвертаза, 4— фатаза, 5— дегидрогеназы.

что для большинства ферментов почв тепловая инактивация наступает при температуре 60—70° (фиг. 4). Потеря активности дегидрогеназ начинается несколько раньше, чем этот температурный интервал, а у фенолоксидаз несколько позже. Одновременно установлено, что большинство почвенных ферментов полностью инактивируется при трехчасовом нагревании почвы при 180°С.

В практике биохимических исследований почв часто приходится иметь дело с нагреванием. В таком случае во избежание тепловой инак-



Фиг. 5. Влияние длительного нагревания почвы на активность инвертазы

тивации ферментов почвы температура нагревания не должна превышать 50°. Было установлено, что в течение одного месяца нагревания почвы при 50° активность ее ферментов почти не изменилась (фиг. 5).

Опыты показали, что пороги инактивации при нагревании почвы бывает несколько выше (примерно на 10°), чем при определении скорости соответствующих ферментативных реакций. Значит, в присутствии буферов и субстратов ферменты менее устойчивы к нагреванию. Здесь вода проникает в промежутки пептидных цепей и способствует разворачиванию пептидов, кроме того

анионы и катионы прибавленных буферов и субстраты действуют на функциональные группы белковой молекулы фермента и разрывают пептидную цепь. Следует отметить, что по сравнению с ферментами растений и животных, а также с чистыми ферментными препаратами (<sup>2,9</sup>) почвенные ферменты более устойчивы к нагреванию. Это обусловлено тем, что почвенные ферменты в основном адсорбированы органо-минеральными коллоидами, которые имеют некоторое защитное свойство к их денатурации.

Итак, влияние температуры на активность ферментов почвы—сложный и многогранный процесс. Температура действует на белковую структуру фермента, изменяет скорость образования и расщепления ферментно-субстратного комплекса и другие процессы. Учитывая сложность влияния температуры на скорость ферментативных реакций почвы, определение их активности производится при таких температурах, которые дают возможность получить достоверные данные.

Институт почвоведения и агрохимии  
МСХ Армянской ССР

Ա. Շ. ԳԱԼՍՅԱՆ

### Ջերմաստիճանի ազդեցությունը հողի ֆերմենտների ակտիվության վրա

Հողի ֆերմենտների ակտիվության վրա ջերմաստիճանի ազդեցության ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ հիդրոլազների մաքսիմում գործունեությունը հայտնաբերվում է 60°-ում, որից հետո տեղի է ունենում ջերմային ինակտիվացում: Ինհիդրազների գործունեության օպտիմալ ջերմաստիճանը՝ 45°, սրանից բարձր ֆերմենտի ակտիվությունը ընկնում է և 70° հավասարվում է զերոյի: 100° սահմաններում նկատվել է ղեհիդրազների մոլեկուլների ռեզիներացիա, որը բացակայում է հիդրոլիտիկ ֆերմենտների մոտ: Ջերմությունը երկակի ազդեցություն է ունենում հողի ֆերմենտների վրա՝ մի կողմից բարձրացնում է ռեակցիայի արագությունը, մյուս կողմից նեխարկում ջերմային ինակտիվացման:

Հողի ֆերմենտների ջերմային գործակիցը հիդրոլազների համար գտնվում է 1—2 սահմաններում, օքսիդազների համար այն հաճախ բարձր է, քան քիմիական ռեակցիաներում օգտագործվող անօրգանական կատալիզատորներինը: Հողի ֆերմենտների ջերմային ինակտիվացումը նրանց սպիրտալուցային մոլեկուլի ղեկավարացիայի արդյունք է:

Ուսումնասիրությունների ընթացքում ֆերմենտների ջերմային ինակտիվացումից խուսափելու համար տարացման ղեկավարում ջերմաստիճանը չպետք է 50° բարձրացնել:

### Л И Т Е Р А Т У Р А — Գ Ր Ա Կ Ա Ն Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

<sup>1</sup> Дж. Б. Самнер и Г. Ф. Сомерс, Химия ферментов и методы их исследования, ИЛ, 1948. <sup>2</sup> М. Диксон и Э. Уэбб, Ферменты, ИЛ, 1961. <sup>3</sup> Г. Е. Владимиров, С. Н. Лызлова, Энзимология, Л., 1963. <sup>4</sup> Дж. Нейландс П. Штумпф, Очерки по химии ферментов, ИЛ, 1958. <sup>5</sup> Н. Киш, Talajenzimiek, Adendum in Talajtan. Bukarest, (1958); <sup>6</sup> Е. Гофман, Г. Гоффман Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenkunde, 70, № 2, 1955. <sup>7</sup> Я. Дробник, Ceskoslov. Mikrobiol., 47, № 1, 1956. <sup>8</sup> А. Ш. Галстян, Г. С. Татевосян, Физика, химия, биология и минералогия почв СССР, М., 1964. <sup>9</sup> В. Л. Кретович, Основы биохимии растений, М., 1961.