

ЛИТЕРАТУРА

1. *Больш К.Г., Больш Б.К.* Основы патологической анатомии сельскохозяйственных животных. М., Сельхозгик, 1961.
2. *Вайл С.С.* Руководство по патолого-анатомической технике. Л., 1947.
3. *Вертинский К.И., Налетов Н.А., Шишков В.И.* Патологическая анатомия сельскохозяйственных животных. М., Колос, 1973.
4. *Гутира Ф., Марек И., Маннинггер Р.* Частная патология и терапия домашних животных. 1, М., Гос. изд. с.-х. литературы, 1961 (перевод с немецкого).
5. *Перчинский О., Струпулис А.* Патологическая гистология сельскохозяйственных животных. Елгава, Изд-во Латв. с/х академии, 1968.
6. *Graig C.K.* Laboratory diagnosis of protozoan diseases. 9 (Ed. lea, Fabiger) Filadelfia, 1942.
7. *Kubes V.El.* III Conferencia Interamericana de Agrecultura, Caracas, 1, 1-124, 1944.

Поступила 6.IV.1998

Биолог. журн. Армении, 2 (52), 1999

УДК 631.465:541.127

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА КИНЕТИКУ ФОСФАТАЗНОЙ РЕАКЦИИ В КАРБОНАТНОМ ЧЕРНОЗЕМЕ

М.Г. ГЕВОРКЯН, К.В. САРКИСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра физической и коллоидной химии,
375049

В широком интервале концентраций субстрата изучено влияние навески почвы, температуры, ЭДТА на скорость гидролитического расщепления фенолфталеинфосфата натрия в карбонатном черноземе. Показано, что действие щелочной фосфатазы почвы подчиняется механизму субстратного ингибирования. Рассчитаны кинетические параметры реакции.

Սուբստրատի լայն կոնցենտրացիոն տիրույթում ուսումնասիրված է հողի կշռվածքի, ջերմաստիճանի, էԴՏԱ-ի ազդեցությունը կարբոնատային սևահողում նատրիումի ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի հիդրոլիտիկ ճեղքման վրա: Ցույց է տրված, որ հողի հիմնային ֆոսֆատազի ակտիվությունը ենթարկվում է սուբստրատային արգելակման մեխանիզմին: Որոշված են ռեակցիայի կինետիկ պարամետրերը:

In wide concentration range of substrate the influence of soils samples, temperature, EDTA on hydrolytic decomposition rate of sodium phenolphthalein phosphate in carbonate chernozem has been studied. The mechanism of substrate inhibition for soil phosphatase activity has been revealed. The kinetic parameters of reaction have been determined.

Карбонатный чернозем - кинетика фосфатазной реакции - субстратное ингибирование

Ранее было показано, что механизм субстратного ингибирования при действии щелочной фосфатазы в гомогенных условиях [4] сохраняется также в почвах [6, 8]. В обеих системах происходит инактивация фермента избытком субстрата в результате присоединения дополнительных молекул его к кинетически активному комплексу Михаэлиса с образованием кинетически неактивного комплекса [3]. При переходе от гомогенных условий к гетерогенным меняются состав кинетически неактивного комплекса, оптимальная концентрация субстрата и другие параметры реакции.

Для выяснения влияния различных факторов (навеска почвы, тип буфера, температура, добавки ЭДТА) на закономерности фосфатазной реакции изучена кинетика гидролитического расщепления карбонатным черноземом фенолфталеинфосфата натрия, растворенного в аммиачном буфере.

Материал и методика. Кинетику действия фосфатазы почвы изучали, определяя во времени ее фосфатазную активность методом Галстяна [5]. Навеску воздушно-сухой почвы термостатировали при $t \pm 0,05^\circ$, приливали раствор субстрата определенной концентрации, доводили pH реакционной среды до 8,6 10%-ным раствором NH_4OH . В фиксированные моменты времени к реакционной смеси добавляли дистиллированную воду, проводили фильтрацию и в фильтрате колориметрически определяли концентрацию фенолфталеина (рН 10, $\lambda = 540$ нм). На основании кинетических кривых оптической плотности реакционных смесей (D), а также калибровочных кривых D -С фенолфталеина в воде и суспензиях почвы рассчитывали стационарные скорости ферментативной реакции без учета и с учетом адсорбции продуктов реакции почвой. Контролем служили почвы без субстрата и субстрат без почвы. Повторность измерений двукратная. Усреднены данные, отличающиеся друг от друга не более чем на 5%.

Результаты и обсуждение. Кинетические кривые изучаемого процесса S-образны, что объясняется последовательным дефосфорилированием субстрата, содержащего в молекуле две фосфатные группы [6].

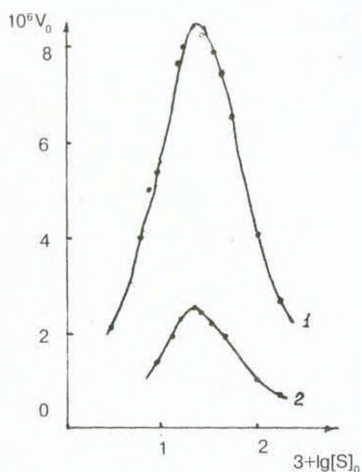
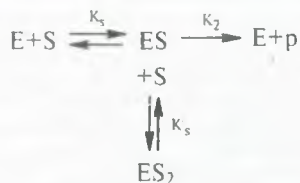


Рис. 1 Зависимость стационарной скорости дефосфорилирования карбонатным черноземом фенолфталеинфосфата натрия от $\lg [S]_0$: 1 при 0,5 г почвы + 1,5 мл водной фазы, $t = 30^\circ$, pH 8,6 (аммиачный буфер); 2 - 0,1 г почвы + 0,3 мл водной фазы.

Оказалось, что кинетические кривые фосфатазной реакции при одинаковом значении pH 8,6, созданном трисHCl и аммиачным буферами, при соотношении 0,5 г почвы и 3 мл жидкой фазы совпадают.

На рис. 1 представлены кинетические данные фосфатазной реакции карбонатного чернозема при навесках почвы 0,5 и 0,1 г и жидкой фазе 1,5 и 0,5 мл соответственно в полулогарифмических координатах. Как видно, кинетика фосфатазной реакции карбонатного чернозема и в условиях данного исследования подчиняется механизму субстратного ингибирования. Значение оптимальной концентрации субстрата, независимо от абсолютных количеств реагентов, равно $[S]_{\text{опт}} = 0,0245$ М.

Симметричность кривой относительно $S_{\text{опт}}$ свидетельствует о том, что реакция ингибируется за счет образования кинетически неактивного комплекса состава ES_2 , т.е. процесс осуществляется по схеме [3]:



Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата выразится уравнением [3]:

$$V = \frac{V_m S_0}{K_m + S_0 + \frac{S_0^2}{K_s}} \quad , \quad \text{а} \quad [S]_{\text{опт}}^2 = K_s^1 K_m$$

Для нахождения постоянных этого трехпараметрового уравнения оно линейаризуется при условиях $S_0 \geq S_{\text{опт}}$. При $[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$ строится график в координатах двойных обратных величин (рис. 2а), что позволяет рассчитать постоянные V_{max} и K_m . При $S_0 > S_{\text{опт}}$ это уравнение анализируется в координатах $1/V - S_0$ (рис. 2б), что позволяет найти K'_s и V_m . Аналогичные расчеты проведены и при навеске почвы 0,1 г (табл. 1).

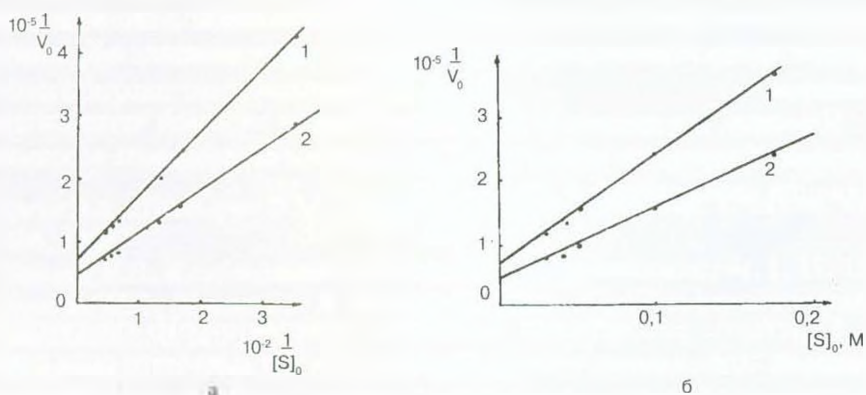


Рис. 2. Линейаризация кинетических данных при $[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$ (а) и $[S]_0 > [S]_{\text{опт}}$ (б) - без учета адсорбции (кр. 1) и с учетом адсорбции (кр.2) для 0,5 г почвы+ 1,5 мл водной фазы.

Реакции, протекающие в почвах, осложняются адсорбцией компонентов реагирующей системы частицами почвы, что, естественно, приводит к изменению параметров почвенных ферментативных реакций [2, 9]. Роль адсорбции мы учитывали использованием калибровочных кривых D-C фенолфталеина, построенных в присутствии почвы (0,5 г почвы+1,5 мл раствора или 0,1 г почвы+0,3 мл раствора соответствующей концентрации, термостатирование при 30° в течение 2 ч и затем колориметрирование по методике эксперимента [5]). На основании данных, полученных при наличии почвы и в условиях ее отсутствия, построены изотермы адсорбции продукта

исследуемой реакции (фенолфталеина) 0,5 и 0,1 г карбонатного чернозема. В условиях данного исследования до концентрации фенолфталеина $\in 1,6 \cdot 10^{-5}$

Таблица 1. Кинетико-термодинамические параметры фосфатазной реакции карбонатного чернозема в аммиачном буфере

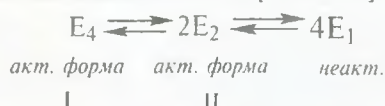
Условия	Параметры	0,5 г почвы+1,5 мл водн. фазы		0,1 г почвы+0,3 мл водн. фазы	
		без учета адс.	с учетом адс.	без учета адс.	с учетом адс.
$[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$	$10^6 V_m$, моль/л мин	15,4	22,4	5	6,4
	K_m , М	0,016	0,016	0,024	0,028
$[S]_0 > [S]_{\text{опт}}$	$10^6 V_m$, моль/л мин	14,3	22	4,8	6,2
	K_m , М	0,015	0,015	0,023	0,026
	K_s , М	0,04	0,041	0,026	0,3

¹М изотермы адсорбции для обеих навесок почвы (0,5 и 0,1 г) были линейными.

Вышеописанным способом рассчитаны кинетико-термодинамические параметры изучаемого процесса с учетом и без учета адсорбции. Полученные данные представлены в табл. 1.

Из приведенных данных видно, что значения постоянных V_m и K_m , независимо от концентраций субстрата, т.е. в условиях выполнения и невыполнения уравнения Михаэлиса-Ментен, совпадают. Это подтверждает справедливость принятой схемы реакции. Видно также, что при учете адсорбции продукта реакции почвой значение V_m увеличивается, а K_m - почти не меняется.

Известно, что щелочная фосфатаза обладает сложной четвертичной структурой. Идентичные субъединицы ее способны образовывать ассоциаты с различной каталитической активностью [1, 11, 12]:



Константы диссоциации олигомеров зависят от pH, присутствия активаторов - ионов двухвалентных металлов [13]. Для выявления роли ионов двухвалентных металлов в фосфатазной реакции карбонатного чернозема изучали влияние добавок ЭДТА на ее скорость.

Как видно из рис. 3, в присутствии ЭДТА скорость процесса уменьшается, причем по мере увеличения концентрации добавки она уменьшается все в большей мере. Замечено, что при добавлении ЭДТА к суспензии карбонатного чернозема происходит интенсивное выделение CO_2 (из 1 г почвы+10 мл 0,2М ЭДТА при комнатной температуре в течение 10 мин выделяется 12 мл CO_2). По-видимому, ЭДТА связывает в хелатные комплексы ионы двухвалентных металлов, которые в исследуемой почве находятся в виде карбонатов, с разрушением последних (в аналогичных условиях в суспензиях выщелоченного чернозема выделение газа не наблюдается). Замедляющее реакцию влияние ЭДТА свидетельствует об активирующем щелочную фосфатазу почвы влиянии ионов двухвалентных

металлов.

В широкой области концентраций субстрата (от $3 \cdot 10^{-3}$ до 0,165 М) при соотношении 0,5 г почвы на 1,5 мл водной фазы изучено влияние температуры на скорость гидролиза фенолфталейн-фосфата натрия в карбонатном черноземе. Оказалось, что при указанных концентрациях субстрата в интервале температур от 20° до 35° скорость процесса практически не зависит от температуры. Таким образом, в данном случае, как и в случае с фосфатазной реакцией выщелоченного чернозема [8], лимитирующей стадией процесса является диффузия субстрата к активному центру иммобилизованного почвой фермента. В водных растворах щелочной фосфатазы скорость гидролиза п-нитрофенил-фосфата натрия при $[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$ с повышением температуры в интервале pH от 8,5 до 9,5 растет, причем эффективная энергия активации реакции больше теплоты диссоциации фермент-субстратного комплекса [10].

Можно полагать, что обнаруженный в гомогенных условиях диссоциативный механизм регуляции активности щелочной фосфатазы сохраняется в почвах, причем в гетерогенных условиях диффузионные процессы играют значительную роль.

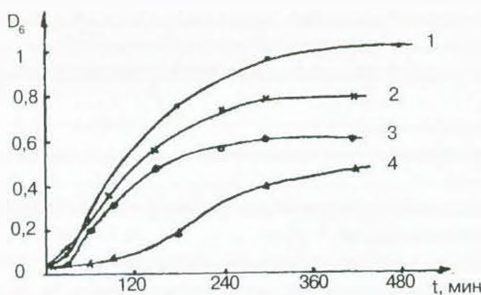


Рис. 3. Влияние добавок ЭДТА на скорость фосфатазной реакции карбонатного чернозема. $[S]_0 = 8,8 \cdot 10^{-3}$ М, $t = 30^\circ$, ЭДТА, М: 1-0; 2-0,001; 3-0,01; 4-0,1; навеска почвы 0,5 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аренс Э.А., Полтораки О.М., Прякин А.Н. Вестн. МГУ, сер. 2, химия, 24, 5, 458, 1983.
2. Березин И.В., Клибанов А.М., Мартинек К. Успехи химии, 44, 1, 17, 1975.
3. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. 280, М., 1977.
4. Бресткин А.П., Новиков Н.В., Прокофьева Е.Г., Ржехина Н.И. Биохимия, 26, 226, 1961.
5. Галстян А.Ш. Почвоведение, 2, 107, 1978.
6. Геворкян М.Г., Вартамян В.Т., Галстян А.Ш., Бейлерян Н.М. Почвоведение, 5, 85, 1987.
7. Геворкян М.Г., Вартамян В.Т., Галстян А.Ш., Бейлерян Н.М. Биолог. журн. Армении, 38, 9, 757, 1985.
8. Паников Н.С., Кзесенко С.М. Почвоведение, 11, 43, 1983.
9. Полтораки О.М., Чухрай Е.С., Прякин А.Н. В кн.: Успехи биоорганического катализа. 286, М., 1979.
10. Путилин Ф.Н., Веселова М.Н. Вестн. МГУ, сер. 2, химия, 24, 3, 259, 1983.
11. Applebury M., Coleman F.J., Biol. Chem., 244, 308, 1969.
12. Linden G., Alais C. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys., 18, 749, 1978.
13. Reynolds J.A., Schlesinger M.J. Biochemistry, 8, 4278, 1969.

Поступила 22.X.1996