

УДК 631.427

В. В. ВОДОПЬЯНОВ, Н. А. КИРЕЕВА

**КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОТЕАЗЫ  
ВЫЩЕЛОЧЕННОГО ЧЕРНОЗЕМА, ЗАГРЯЗНЕННОГО НЕФТЬЮ**

Изучено влияние загрязнения различными дозами нефти на начальную скорость, на константу Михаэлиса и максимальную скорость реакции почвенной протеазы в выщелоченном черноземе. Показано, что внесение нефти оказывает существенное влияние на кинетику реакции. *Нефтезагрязненная почва; протеаза; кинетика ферментативных реакций; константа Михаэлиса*

Ферментативные реакции играют важную роль в общем энергетическом балансе биологических процессов почв. Кинетические параметры ферментативных процессов в почве являются показателями, характеризующими состояние ферментов и влияние на них окружающей среды, в которую они поступают, стабилизируются и функционируют [6]. Тот факт, что почвенно-биохимические процессы не отличаются принципиально от чисто ферментативных реакций, дает возможность исследовать кинетику почвенно-ферментативных реакций в лабораторных условиях [2].

Вопросам изучения кинетики ферментативных процессов, происходящих в почве, посвящен ряд исследований [1–3, 7, 9–12]. Хотя загрязнение может менять направленность ферментативных реакций, работ, посвященных изучению кинетических параметров ферментов при загрязнении почвы различными токсикантами, в литературе очень мало.

В почве обнаруживаются гидролитические и окислительно-восстановительные ферментные системы, осуществляющие последовательное превращение азотсодержащих органических веществ. Круговорот азота в почве тесно связан с активностью протеолитических ферментов. Протеолиз служит пусковым механизмом, включающим все последующие этапы преобразования азотсодержащих веществ. Поэтому протеазную активность можно считать одним из важнейших свойств почв, способствующим круговороту иммобилизованного азота [8].

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Нами была исследована зависимость активности фермента протеазы от времени ин-

кубации с различной концентрацией субстрата в нефтезагрязненной почве.

В лабораторных опытах сухую почву (выщелоченный чернозем) из горизонта  $A_{\text{пах}}$  просеивали через сито с отверстиями 3 мм, увлажняли до уровня, соответствующего 60% от полной влагоемкости, вносили товарную нефть (обезвоженная, обессоленная) в концентрациях 0,5; 2, 10, 20% от массы почвы. Во всех случаях контролем служила незагрязненная почва. Активность ферментов определяли методами, описанными Ф. Х. Хазиевым [5]. Для определения кинетических характеристик ферментов измеряли накопление продуктов реакции через определенные промежутки времени с различной концентрацией субстрата.

Время подбиралось таким образом, чтобы побочные продукты реакции и другие внешние условия еще не могли оказать существенного влияния на скорость ферментативной реакции [5]. В этом случае график зависимости накопления продуктов реакции должен быть близок к прямой линии и угол наклона этой прямой дает представление о начальной скорости ферментативной реакции. Однако для протеазы было обнаружено достаточно сильное отклонение от линейного закона накопления продуктов реакции.

Определение зависимости накопления продукта ферментативной реакции для протеазы в нефтезагрязненной почве от времени инкубации с различной концентрацией субстрата (казеин) показало, что в первоначальный период инкубации (30 мин) накопление продуктов ферментативной активности происходит неравномерно. С увеличением времени инкубации в течение 24 часов происходит накопление продукта ферментативной реакции протеазы в выщелоченном черноземе

(контрольный вариант опыта). Однако количество продукта реакции увеличивается несущественно и можно считать, что протеазная активность резко падает на протяжении изученного времени либо, что более вероятно, субстрат и продукты ферментативной реакции вступают во взаимодействие с окружающей средой. Несколько другая зависимость прослеживается при загрязнении выщелоченного чернозема нефтью. В загрязненной нефтью почве (кроме 20% загрязнения в варианте с 1,5% казеином) количество выделенного продукта ферментативной реакции протеазы в почве снижается с увеличением времени инкубации. Однако это снижение также незначительное. Низкие значения  $R^2$ -погрешности (как в контрольном, так и в вариантах с загрязнением) свидетельствуют о том, что для протеазной активности фактор времени не является основным и изменения этой активности связаны с иными причинами, что также подтверждается другими изученными кинетическими параметрами.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами был проведен эксперимент по определению зависимости начальной скорости реакции протеазы от различных концентраций субстрата в нефтезагрязненной почве. Хорошо известно, что ферментативные реакции могут быть разбиты на два типа [4]. Первому типу реакции соответствует следующее уравнение скорости ферментативной реакции:

$$V = \frac{V_{\max} S^n}{K_m + S^n}, \quad (1)$$

где  $V$  — скорость ферментативной реакции,  $V_{\max}$  — максимальное значение скорости,  $K_m$  — константа Михаэлиса,  $S$  — концентрация субстрата. Число  $n$  соответствует числу каталитических центров фермента. При  $n = 1$  получаем стандартное уравнение Михаэлиса–Ментен.

Второму типу реакции, который отвечает случаю, когда субстрат при больших концентрациях выступает ингибитором ферментативной реакции, соответствует уравнение

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S + S^2/K_s}, \quad (2)$$

где  $K_s$  — коэффициент, характеризующий скорость образования неактивного комплекса  $ES^2$ , тормозящего ферментативную реакцию.

Рассмотрение приведенных математических моделей ферментативной реакции пока-

зало, что в выщелоченном черноземе для скорости протеазной активности в уравнении (1) можно принять  $n = 1$ , так как в этом случае мы получаем хорошее соответствие экспериментальных результатов математической модели. Увеличение же  $n$  не уменьшает погрешности математической модели (1) по сравнению с экспериментальными данными.

Аналогичное рассмотрение второй модели показало, что в ней можно полагать  $1/K_s = 0$ . Расчеты наилучшего значения  $K_s$  по методу наименьших квадратов показали, что хотя уравнение (2) в этом случае и дает более точное приближение экспериментальных данных (что и должно быть), улучшение это несущественно (погрешность улучшается менее чем на 1%). Отсюда можно сделать вывод о том, что большие концентрации субстрата (в пределах наших рассмотрений) не ингибируют ферментативную реакцию.

Таким образом, для описания скорости ферментативной реакции нами была принята стандартная модель Михаэлиса–Ментен:

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S}, \quad (3)$$

где  $V$  — скорость ферментативной реакции (в данном случае измеряемая в миллиграммах  $\text{NH}_3$ ),  $V_{\max}$  — максимальное значение скорости,  $K_m$  — константа Михаэлиса,  $S$  — концентрация субстрата (моль на 100 г почвы). Это уравнение графически изображается в виде функции, имеющей гиперболический вид.

Расчеты, проведенные по модели Михаэлиса–Ментен с целью изучения влияния концентрации казеина на скорость ферментативной реакции, показали, что загрязнение нефтью не оказывает существенного влияния на кинетику этого процесса. Изменение концентрации казеина одинаково влияет на протеазную активность в контрольном варианте и в вариантах с загрязнением нефтью. Максимальная скорость  $V_{\max}$  и константа Михаэлиса  $K_m$  практически мало меняются в зависимости от дозы загрязнителя (табл.). При этом необходимо обратить внимание на очень низкие значения константы Михаэлиса, которые показывают, что максимальную скорость ферментативная реакция достигает уже при очень малых концентрациях.

Расчет по моделям конкурентного и неконкурентного ингибирования протеазной активности нефтью (см. уравнения (1) и (2)) показал, что модель неконкурентного ингибирования имеет оценку экспериментальных данных, в два раза более точную, чем модель

Таблица  
**Константа Михаэлиса и максимальное значение начальной скорости ферментативной активности в загрязненной товарной нефтью почве, полученные по уравнению Михаэлиса–Ментен**

Фермент	Показатели	Концентрация нефти, %				
		0	0,5	2	10	20
Протеаза	$K_m$	0,011	0,005	0,006	0,009	0,076
	$V_{max}$	0,297	0,234	0,282	0,115	0,141

конкурентного ингибирования. Вместе с тем из рис. 1 видно, что при высоких концентрациях нефти (10% и 20%) происходит явное падение протеазной активности после того, как количество субстрата превысит некоторую величину. Да и уравнения Михаэлиса–Ментен дают в случае высоких концентраций нефти погрешность, в 15 раз большую, чем при низких концентрациях. Естественно, напрашивается предположение, что при высоких концентрациях нефти большие дозы субстрата выступают ингибитором протеазной активности, т.е. вместо уравнения Михаэлиса–Ментен необходимо брать уравнение (2). Однако расчеты показали, что экспериментальные данные плохо соответствуют и этому уравнению.

Причиной снижения протеазной активности, на наш взгляд, является связывание субстрата с нефтью, которое подавляет активность субстрата. Причем это подавление явно проявляется лишь при достаточно высоких концентрациях нефти и субстрата. Учитывая вышесказанное, можно предположить, что в присутствии нефти субстрат (казеин) вступает в реакцию (или идет процесс связывания субстрата с нефтью, приводящий к потере ак-

тивности субстрата), подчиняющуюся закону

$$\frac{dS(t)}{dt} = k(N)S_0S(t), \quad S(0) = S_0, \quad (4)$$

где  $S(t)$  — концентрация субстрата в момент времени  $t$ ,  $S_0$  — начальная концентрация субстрата,  $N$  — концентрация нефти,  $k(N)$  — коэффициент, определяющий скорость химической реакции (или связывания субстрата) и зависящий от концентрации нефти. Решая это дифференциальное уравнение, получим

$$S(t) = S_0 e^{kS_0 t}. \quad (5)$$

С учетом того, что скорость ферментативной реакции проверяют через фиксированное время инкубации субстрата ( $t = \text{const}$ ), мы подставили это выражение в уравнение Михаэлиса–Ментен вместо концентрации субстрата и получили следующее модифицированное уравнение Михаэлиса–Ментен (для удобства  $t = \text{const}$  внесено в коэффициент  $k$ ):

$$V = \frac{V_m S e^{kS}}{K_m + S e^{kS}}. \quad (6)$$

Проведенные расчеты показали хорошее согласование экспериментальных данных с уравнением (6) в случае высоких концентраций нефтяного загрязнения (10% и 20%): был получен тот же порядок приближения

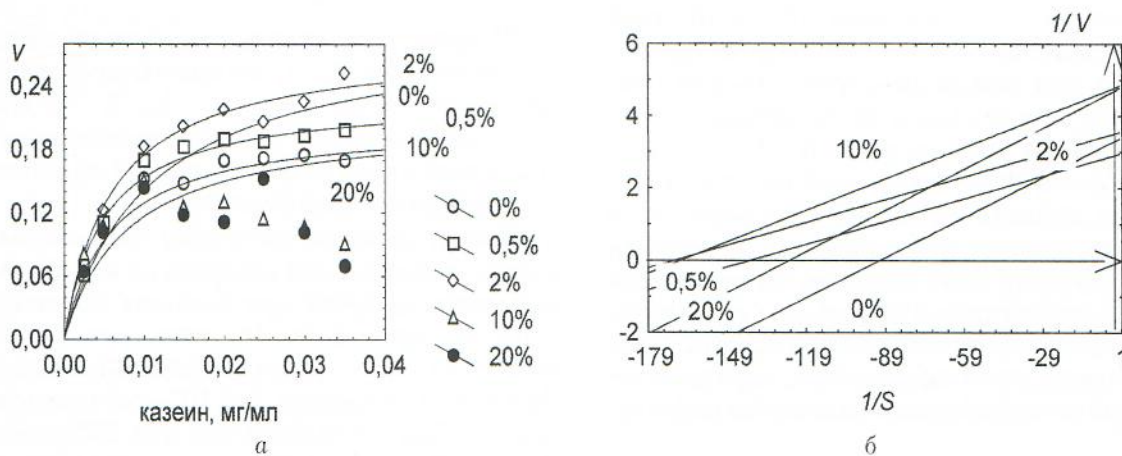


Рис. 1. Зависимость скорости протеолиза от концентрации субстрата в загрязненной товарной нефтью почве по уравнению Михаэлиса–Ментен (а) и по Лайнуиверу–Бэрку (б)

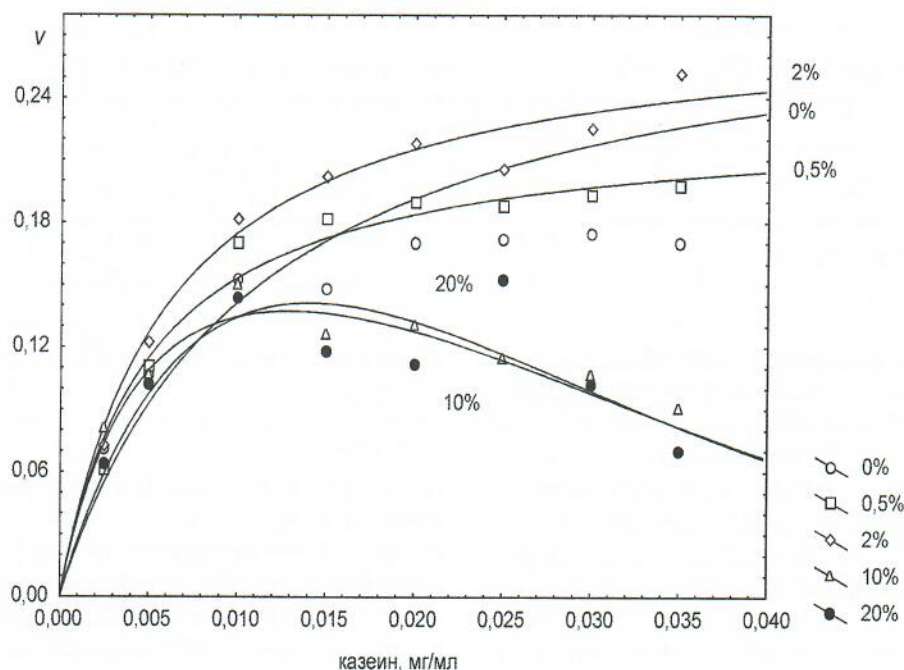


Рис. 2. Зависимость скорости протеолиза от концентрации субстрата в загрязненной товарной нефтью почве, рассчитанная по уравнению Михаэлиса–Ментен для низких концентраций нефти и модифицированному уравнению Михаэлиса–Ментен (4) для высоких концентраций нефти

экспериментальных данных, что и уравнением Михаэлиса–Ментен для низких концентраций загрязнителя (относительная погрешность порядка  $10^{-2}$ ). На рис. 2 приведены кривые, полученные по уравнению Михаэлиса–Ментен для низких концентраций нефтяного загрязнения и уравнения (4) — при высоких дозах загрязнения. Заметим, что расчет по экспериментальным данным модели (6) для низких доз нефти дал положительные значения константы  $k$ . Это говорит о том, что в этом случае уравнение (6), по существу, переходит в уравнение Михаэлиса–Ментен. При этом были получены практически те же самые значения для константы Михаэлиса и максимальной скорости.

Отметим, что уравнение (6), в отличие от уравнения Михаэлиса–Ментен, не приспособлено для описания ферментативной активности при большом росте концентрации субстрата, так как при росте  $S$  к бесконечности скорость ферментативной реакции стремится к нулю ( $k < 0$ ). По-видимому, надо полагать, что при очень высоких концентрациях субстрата (при которых эксперименты нами не проводились) происходит стабилизация скорости ферментативной реакции. Причем уровень этой стабилизации, вероятно, зависит от степени загрязнения почвы нефтью.

Максимальная скорость ферментативной реакции может быть найдена из уравнения (6) и равняется

$$V_{\max} = -\frac{V_m}{K_m e k - 1}. \quad (7)$$

Константа  $V_m$  характеризует максимальную скорость, которую могла бы достичь ферментативная реакция, если бы субстрат не участвовал в химической реакции с нефтью в почве. Константа  $K_m$  связана с этим коэффициентом: если  $S_m$  — концентрация субстрата, при которой скорость ферментативной реакции достигает  $V_m/2$ , то

$$K_m = S_m e^{k S_m}. \quad (8)$$

Однако полученные экспериментальные результаты показали, что практически выполняется неравенство  $V_{\max} < V_m/2$ . Это означает, что нефть при высоких концентрациях оказывает существенное влияние на кинетику ферментативной реакции.

Таким образом, расчетная максимальная скорость протеазной активности в загрязненной нефтью почве при высоких концентрациях по уравнению (4) оказалась меньше, чем полученная из уравнений Михаэлиса–Ментен, и составила: для 10%-ного загрязнения —  $V_{\max} = 0,115$  м/мл, для 20%-ного —  $V_{\max} = 0,141$  м/мл. Отметим также, что константы  $K_m$  незначительно выросли.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для кинетики ферментативной реакции протеазы в нефтезагрязненной почве построена математическая модель, являющаяся аналогом модели Михаэлиса–Ментен и учитывающая падение активности субстрата. Показано, что значение максимальной скорости ферментативной реакции протеазы в нефтезагрязненной почве уменьшается по сравнению с контролем, что указывает на изменение кинетики реакции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев С. А., Гаджиев Д. А., Микайлов 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., Микайлов Ф. Д. Кинетические и термодинамические характеристики ферментов инвертазы и уреазы в почвах Азербайджанской ССР // Почвоведение. 1984. № 11. С. 55–69.
3. Галстян А. Ш. Ферментативная активность почв Армении. Ереван: Айастан, 1974. 260 с.
4. Рубин А. Б. Биофизика. Т. 1: Теоретическая биофизика: Учебник для вузов. М.: Книжный дом Университет, 1999. 448 с.
5. Хазиев Ф. Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 1990. 189 с.
6. Хазиев Ф. Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. М.: Наука, 1982. 204 с.
7. Хазиев Ф. Х., Агафарова Я. М. Константы Михаэлиса почвенных ферментов // Почвоведение. 1976. № 8. С. 150–156.
8. Щербакова Т. А. Ферментативная активность почв и трансформация органического

го вещества. Минск: Наука и техника, 1983. 222 с.

9. Beri Y., Goswami K. P., Brar S. S. Urease activity and its Michaelis Constant for soil systems // Plant and Soil. 1978. No 1. P. 105–115.
10. Frankenberger W. T., Tabatabai M. A. Amidase activity in soils. 2. Kinetic parameters // Soil Soc. Amer. J. 1980. No 3. P. 532–536.
11. Paulson K. N., Kurtz L. T. Michaelis Constant of soil urease // Soil. Sci. Amer. Proc. 1970. No 1. P. 70–71.
12. Tabatabai M. A., Bremner J. M. Michaelis Constants of soil enzymes // Soil. Biol. Biochem. 1971. No 1. P. 317–323.

## ОБ АВТОРАХ



**Водопьянов Владимир Васильевич**, декан естеств.-науч. фак-та, проф. каф. математики УГАТУ. Дипл. математик (Казанск. гос. ун-т, 1972). Канд. физ.-мат. наук по функциональному анализу (КГУ, 1980). Исследования в обл. функц. анализа и математич. моделирования биологических процессов.



**Киреева Наиля Ахняфовна**, проф. каф. биохимии и биотехнологии БГУ. Дипл. биолог-биохимик (БГУ, 1971). Д-р биол. наук в обл. биотехнологии (СПбТУ, 1996). Исследования в обл. экологической биотехнологии и микробиологической рекультивации антропогенно нарушенных почв.