

УДК 541.127+517.215+631.4

Г. А. ПАРСАДАՅԱՆ, Մ. Գ. ԵՎՈՐԿՅԱՆ, Ն. Մ. ԲԵՅԼԵՐՅԱՆ, Կ. Վ. ԳՐԻԳՐՅԱՆ

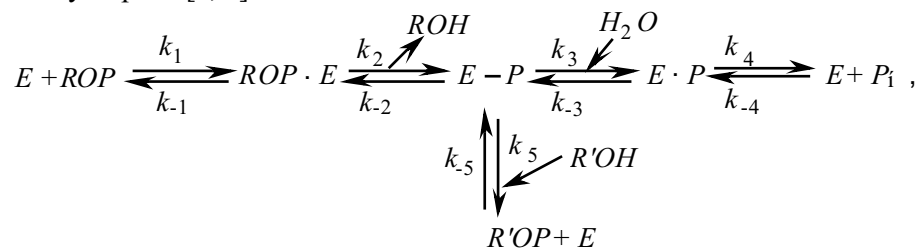
ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ И МЕХАНИЗМА ФОСФАТАЗНОЙ РЕАКЦИИ В ВЫЩЕЛОЧЕННОМ ЧЕРНОЗЕМЕ

В широком интервале концентраций Na-β-глицерофосфата ($1,7 \cdot 10^{-3}$ – $0,7 M$), а также при высоких концентрациях п-нитрофенилфосфата натрия ($0,31 \cdot 10^{-3}$ – $0,14 M$) изучены кинетика и механизм фосфатазной реакции в выщелоченном черноземе. Показано, что гидролиз этих субстратов, как и ранее изученного фенолфталеинфосфата натрия, подчиняется механизму субстратного ингибирования. На основании анализа кинетических и термодинамических параметров изучаемого процесса показано, что различия в указанных системах носят лишь количественный характер, обусловленный различной реакционной, а также сорбционной способностью использованных субстратов и продуктов их гидролиза.

Введение. Распад трудноусвояемых растениями фосфорорганических соединений до доступных им фосфат-ионов осуществляется посредством фосфогидролаз, из которых в почвах наиболее активны фосфомоноэстеразы, причем кислая фосфатаза превалирует в кислых почвах, а щелочная – в основных [1].

Щелочная фосфатаза весьма распространена в природе и характеризуется широкой субстратной специфичностью. Она достаточно хорошо изучена в водных растворах в связи с ее важными физиологическими функциями.

Большое число ферментативных реакций (особенно гидролитических) протекает по трехстадийному механизму, в котором образуются комплекс Михаэлиса, ацилферментное промежуточное соединение и два конечных продукта. Под действием щелочной фосфатазы перенос фосфата протекает через фосфорилфермент. Это ковалентное промежуточное соединение, образующееся в результате фосфорилирования активного центра фермента молекулой субстрата [2, 3]:



где E – фермент, ROP – субстрат, $E-P$ – ковалентное промежуточное соединение фосфорилфермент ($E-PO_3$), $E \cdot P$ – нековалентный комплекс Михаэлиса с неорганическим фосфатом, ROH – спирт и P_i – неорганический фосфат – продукты реакции, образуемые на стадиях фосфорилирования и дефосфорилирования активного центра фермента, $R'OH$ – спирт-акцептор, $R'OP$ – фосфорилированный спирт.

Установлено, что в случае щелочной фосфатазы фосфат присоединяется к реакционноспособному остатку серина в активном центре фермента [4], а в случае кислой фосфатазы – к остатку гистидина [5].

Предполагается, что для Zn^{2+} -фермента стадией, лимитирующей скорость процесса в кислой среде, является дефосфорилирование фермента (k_3), а в щелочной среде – диссоциация нековалентного комплекса $E \cdot P$ с образованием фосфата и фермента (k_4). Существует также предположение, что такой стадией является медленное изменение конформации $E-P$ [2].

Щелочная фосфатаза может служить индикатором в нормальных физиологических процессах. Ее широко используют в тест-системах для диагностирования различных заболеваний, приготовления различных терапевтических препаратов [4].

В работе [6] для определения разных загрязнителей окружающей среды, в частности пестицидов, предлагается использовать каталитическую активность щелочной фосфатазы, определяемую двумя разными аналитическими методами: 1) амперометрически, когда фермент присоединяется к электроду, амперометрически чувствительному к H_2O_2 . В качестве субстрата используется β -индоксифосфат, при окислении продукта ферментативного гидролиза которого образующийся H_2O_2 измеряется амперометрически; 2) вольтамперометрическим определением электроактивных фенола и аскорбиновой кислоты – продуктов гидролиза фенилфосфата, катализируемого щелочной фосфатазой.

Во многих работах кинетика действия почвенных ферментов характеризуется с помощью постоянных уравнения Михаэлиса–Ментен [1], определяемых по активности почвы за определенный промежуток времени ее взаимодействия с субстратом. Такой подход не позволяет выявить применимость уравнения Михаэлиса–Ментен к изучаемой реакции, выяснить ее механизм и определить влияние продуктов на скорость процесса. При этом практически отсутствуют работы по механизму действия почвенных ферментов, несмотря на несомненную важность этой проблемы для познания закономерностей биологического превращения органических веществ в почве [7], а также для управления почвенным плодородием. В результате некоторые из используемых в почвенной энзимологии методов определения ферментативной активности не могут считаться научно обоснованными. В частности, отмечается несоответствие данных о фосфатазной активности почв, определяемой разными принятыми в почвенной энзимологии методами [8]. В [9] отмечается, что методы определения подвижного фосфора, а также критерии обеспеченности почв фосфором для различных почв не однозначны, т.е. не позволяют объективно и надежно оценивать фосфорное состояние почв и прогнозировать эффект от внесения удобрений.

Для выявления причин этого несоответствия нами изучены кинетика и механизм фосфатазной реакции горного выщелоченного чернозема Армении с использованием принятых в почвенной энзимологии трех субстратов (*S*): п-нитрофенилфосфата натрия (п-НФФNa), фенолфталеинфосфата натрия (ФФФNa) и Na-β-глицерофосфата [10].

Из [11] известно, что гидролиз фенилфосфата под действием щелочной фосфатазы в водных растворах подчиняется механизму субстратного ингибирования. В [12] показано, что фосфогидролазы рибонуклеотидов в дерново-подзолистой почве ингибируются под действием субстрата и неорганического фосфата.

Ранее [13] в выщелоченном черноземе были изучены кинетика и механизм гидролиза щелочной фосфатазы п-НФФNa в интервале концентраций $3,15 \cdot 10^{-3} \leq [S]_0 \leq 1,9 \cdot 10^{-2} M$, и в этих условиях механизм субстратного ингибирования обнаружен не был. Учитывая, что гидролиз разных субстратов в различных почвах [14–17], в том числе и гидролиз п-НФФNa в обыкновенном преимущественно карбонатном черноземе [15], подчиняется механизму субстратного ингибирования, нами было предположено, что для уточнения механизма гидролиза п-НФФNa в выщелоченном черноземе необходимо изучить кинетику гидролиза этого субстрата при его более высоких концентрациях.

В данной работе изучены кинетика и механизм гидролиза п-НФФNa при его высоких концентрациях ($0,025 M \leq [S]_0 \leq 0,14 M$), а также гидролиз Na-β-глицерофосфата при $30^{\circ}C$ в широком интервале ($1,7 \cdot 10^{-3} - 0,7 M$) концентраций. Обобщены данные по действию щелочной фосфатазы в выщелоченном черноземе.

Экспериментальная часть. Для проведения ферментативной реакции применяли верхний слой (0–20 см) воздушно-сухого, просеянного через сито с диаметром отверстий 0,25 мм выщелоченного чернозема Арагацотнской области: гумус 9,2 %, рН водной вытяжки 6,6, сумма обменных катионов 52,7 мгэкв на 100 г почвы.

При изучении кинетики фосфатазной реакции использовали принятые методы определения фосфатазной активности почв [10] в зависимости от времени их взаимодействия с субстратами. Использованные субстраты п-НФФNa (IS) и Na-β-глицерофосфат (IIS) под действием фосфатазы расщепляются с образованием гидрофосфата натрия, а также п-нитрофенола и глицерина соответственно. Кинетику фосфатазной реакции в случае IS определяли по изменению концентрации п-нитрофенола, а в случае IIS – фосфат-иона.

Навеску почвы 1 г смачивали 1 мл дистиллированной воды (в случае IS) или 0,5 г почвы смачивали 1 мл моноэтаноламино-уксуснокислого (МЭА-УК) буфера с рН 8,6 (в случае IIS), термостатировали при температуре $\pm 0,05^{\circ}C$, затем приливали раствор субстрата соответствующей концентрации, считая этот момент началом реакции. Соотношение твердой и жидкой фаз в каждой серии опытов сохраняли постоянным: в случае IS – 1 г:3 мл, а в случае IIS – 0,5 г: 1,5 мл. Чтобы остановить реакцию, в фиксированные моменты времени к реакционной смеси приливали 22 мл дистиллированной воды (IS) или 25 мл буферной смеси Труога (IIS). В случае IS полученную суспензию взбалтывали и фильтровали, а в случае IIS для экстрагирования ферментативно отщепленного фосфата суспензию перемешивали на магнитной мешалке при

500 об/мин в течение 5 минут и фильтровали. Для просветления растворов к ним по каплям добавляли насыщенный раствор алмокалиевых квасцов. В случае IS продукт ферментативной реакции – п-нитрофенол – окрашивали 1 N раствором NaOH, доводя pH раствора до 8,6. В случае IIS фосфор в фильтрате определяли по Труогу–Мейеру [10]. Окрашенные фильтраты I и II субстратов колориметрировали соответственно при $\lambda=450$ и 650 нм. Для контроля брали почвы без субстратов и субстраты без почвы. Измерения повторяли несколько раз. Данные, отличающиеся не более, чем на 5%, усредняли.

Из кинетических кривых зависимости оптической плотности реакционных смесей от времени ($D=f(t)$) рассчитывали начальные скорости процесса в относительных единицах. Затем с помощью калибровочных кривых оптической плотности водных растворов п-нитрофенола (IS) или Na_2HPO_4 (IIS) скорости выражались в моль/л·мин на 1 г почвы для п-НФФNa и на 0,5 г почвы для Na- β -глицерофосфата. Калибровочные кривые продуктов реакций (п-нитрофенола и Na_2HPO_4) строили по тем же методикам [10], по которым определялись скорости соответствующих реакций.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 в полулогарифмических координатах представлены зависимости начальных скоростей фосфатазной реакции двух модельных фосфатов – п-НФФNa (а) и Na- β -глицерофосфата (б) – от их исходных концентраций. Кинетические данные, полученные при низких концентрациях IS ($[S]_0 \leq 0,019$ М), взяты из ранее опубликованной работы [13].

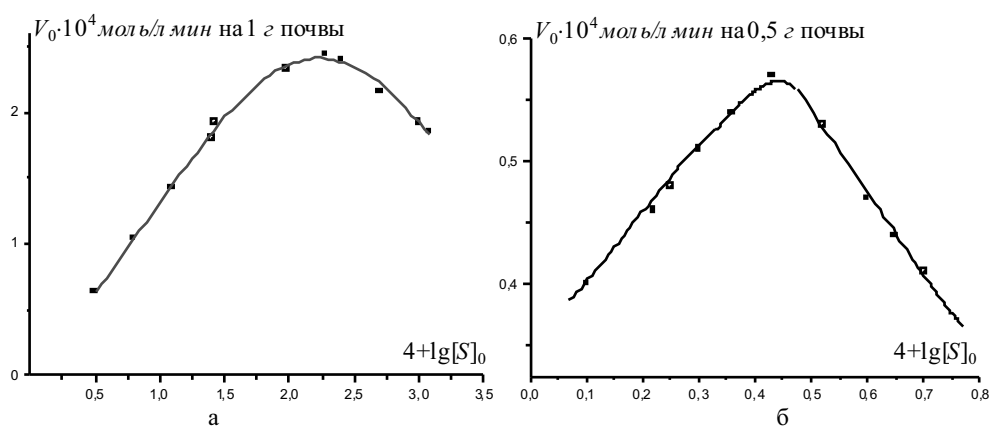
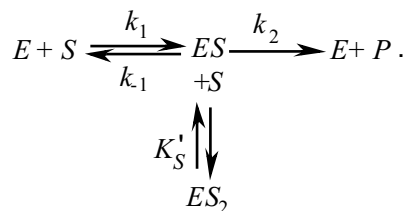


Рис. 1. Зависимость начальных скоростей фосфатазной реакции п-нитрофенилфосфата натрия (а) при $24,7^\circ\text{C}$ и Na- β -глицерофосфата (б) при 30°C от логарифма их исходных концентраций.

Представленные на рис. 1 данные свидетельствуют о том, что гидролиз обоих изученных субстратов под действием фосфатазы выщелоченного чернозема подчиняется механизму субстратного ингибирования, ранее выявленному при действии щелочной фосфатазы в водных растворах [11], в выщелоченном черноземе при использовании в качестве субстрата ФФФNa [14], а также в обыкновенном [15, 16] и карбонатном [17] черноземах.

Из рис. 1 определены значения оптимальных концентраций изученных субстратов: для п-НФФNa $[S]_{\text{опт}}=0,017$ М, а для Na- β -глицерофосфата $[S]_{\text{опт}}=0,27$ М.

Симметричность кривых относительно $[S]_{\text{опт}}$ свидетельствует о том что в условиях данного исследования, как и в ранее изученных нами случаях, реакция ингибируется за счет присоединения к кинетически активному комплексу ES (см. схему) второй молекулы субстрата с образованием кинетически неактивного комплекса состава ES_2 , т.е. число дополнительных молекул субстрата равно единице ($n=1$). Процесс при $[S]_0 \gg [E]_0$ можно представить схемой [18]:



Начальная скорость реакции, константа Михаэлиса (K_m), а также $[S]_{\text{опт}}^2$ выражаются уравнениями:

$$V_0 = \frac{V_m \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0 + \frac{[S]_0^2}{K'_S}}, \quad (1)$$

где

$$V_m = k_2 [E]_0, \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_1}{k_1}; \quad (2)$$

$$[S]_{\text{опт}}^2 = K'_S K_m. \quad (3)$$

Для расчета постоянных трехпараметров уравнения (1) кинетические данные анализируются в двух концентрационных областях субстрата: при $[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$ и $[S]_0 > [S]_{\text{опт}}$.

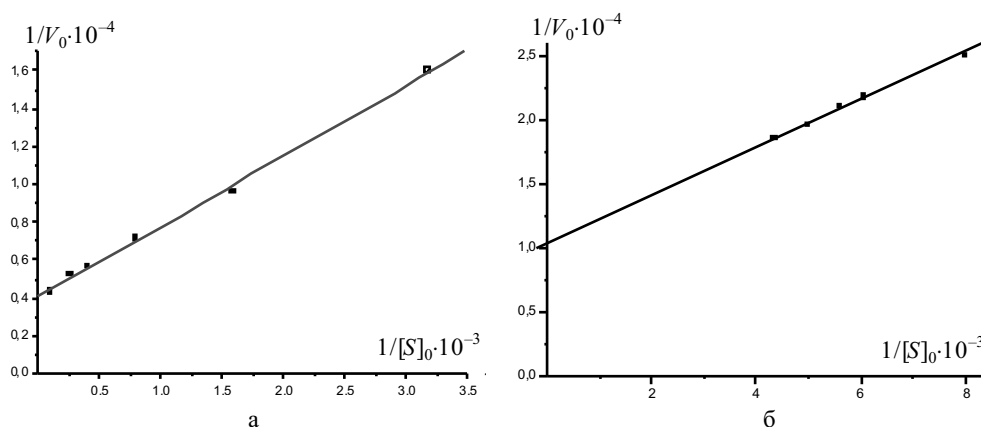


Рис. 2. Линейаризация кинетических данных фосфатазной реакции п-нитрофенилфосфата натрия (а) при $24,7^\circ\text{C}$ и Na- β -глицерофосфата (б) при 30°C в условиях неингибированного избытком субстрата процесса ($[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$).

При $[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$ уравнение (1) превращается в уравнение Михаэлиса–Ментен, постоянные которого рассчитываются из графика в координатах двойных обратных величин. Из рис. 2, а и б рассчитаны:

- в случае п-НФФНа $V_m = 2,38 \cdot 10^{-4}$ моль/л·мин на 1 г почвы, а $K_m = 0,83$ мМ;
- в случае Na-β-глицерофосфата $V_m = 9,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л·мин на 0,5 г почвы, а $K_m = 0,17$ М.

При $[S]_0 > [S]_{\text{опт}}$ уравнение (1) превращается в уравнение

$$V_0 = \frac{V_m \cdot K'_S}{K'_S + S_0} \quad \text{или} \quad \frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{S_0}{V_m \cdot K'_S}, \quad (4)$$

т.е. при высоких концентрациях субстрата кинетические данные удовлетворяют уравнению (4) (см. рис. 3, а и б). На основании рис. 3 рассчитаны значения V_m , K'_S и K_m при избытке субстрата:

- в случае п-НФФНа $V_m = 2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л·мин на 1 г почвы и $K'_S = 0,37$ М. Пользуясь уравнением (3) и значением K'_S , рассчитали значение $K_m = 0,78$ мМ;
- в случае Na-β-глицерофосфата $V_m = 9,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л·мин на 0,5 г почвы, $K'_S = 0,43$ М и $K_m = 0,17$ М.

Полученные результаты фосфатазной реакции обоих изученных субстратов представлены в таблице, в которой для сравнения приведены также данные фосфатазной реакции выщелоченного чернозема при использовании

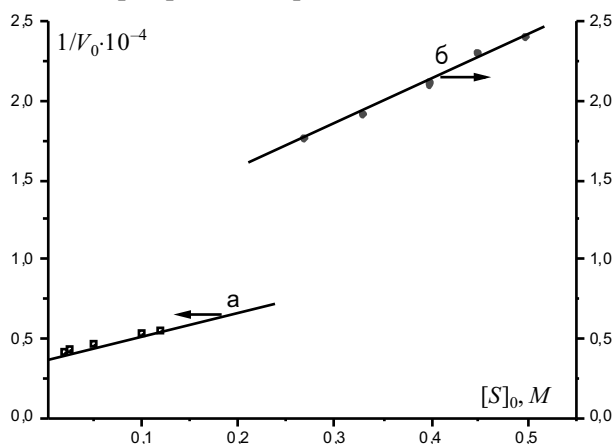


Рис. 3. Линейзация кинетических данных фосфатазной реакции п-нитрофенилфосфата натрия (а) при $24,7^{\circ}\text{C}$ и Na-β-глицерофосфата (б) при 30°C в условиях ингибированного избытком субстрата процесса ($[S]_0 > [S]_{\text{опт}}$).

в качестве субстрата ФФФНа [14], содержащего в молекуле две фосфатные группы, гидролизующиеся последовательно. Кинетические кривые фосфатазной реакции ФФФНа S-образны, поэтому в расчетах вместо начальной использовалась стационарная скорость процесса [18].

Представленные в таблице параметры фосфатазной реакции выщелоченного чернозема трех субстратов получены при различных рН среды. В [13]

показано, что зависимость начальных скоростей гидролиза п-НФФНа от рН имеет обычный для ферментативных реакций колоколообразный вид с максимумом активности соответственно при рН 7 и 7,5 с учетом и без учета сдвигов рН буферной смеси в присутствии почвы. Показано, что при изменении рН от 6,6 до 8 начальная скорость гидролиза п-НФФНа меняется всего в 1,05 раз, что, по-видимому, позволяет считать, что различия в кинетических параметрах гидролиза этих субстратов не обусловлены изменением рН среды.

Совпадение постоянных уравнения Михаэлиса–Ментен в условиях неингибированного ($[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$) и ингибированного избытком субстрата ($[S]_0 > [S]_{\text{опт}}$) процесса (см. таблицу) подтверждает справедливость принятого механизма субстратного ингибирования. Эти результаты свидетельствуют о том, что в почвах, как и в водных растворах [11], происходит регуляция активности щелочной фосфатазы по одному и тому же механизму. Поскольку регуляторный механизм свойственен только живой природе, то полученные данные являются еще одним веским аргументом в пользу ферментативной природы почвенных химических процессов [12]. Результаты кинетических исследований, проведенных нами ранее [14–17], а также полученные в данной работе, свидетельствуют о том, что в почвах, в частности в выщелоченном черноземе, независимо от структуры субстрата механизм субстратного ингибирования фосфатазной реакции, а также состав кинетически неактивного комплекса сохраняются. Однако значения кинетических (V_m, K_m), термодинамического (K'_S) параметров, величина $[S]_{\text{опт}}$ для различных субстратов в одной и той же почве разные. Это может быть обусловлено различной реакционной, а также адсорбционной способностью использованных субстратов и продуктов их гидролиза.

Кинетические и термодинамические параметры фосфатазной реакции трех модельных фосфатов в выщелоченном черноземе (точность определения V_m и $K_m \pm 5\%$)

| Условия линеариза- ции урав- нения (1) | Параме тр | Субстраты, отношение твердой и водной фаз | | |
|---|------------------------|---|--|--|
| | | п-НФФ Na, 1 г почвы: 3 мл S, рН 6,6 | Na-β-глицеро- фосфат, 0,5 г почвы: 1,5 мл S, буфер МЭА–уксус. к-та, рН 8 | ФФФ Na, 0,5 г почвы: 1,5 мл S, аммиачн. буфер, рН 8,6 |
| $[S]_0 < [S]_{\text{опт}}$ | V_m , моль/л·мин | $2,38 \cdot 10^{-4}$ | $9,1 \cdot 10^{-5}$ | $3,1 \cdot 10^{-6}$ |
| | K_m , мМ | 0,83 | 170 | 2 |
| $[S]_0 > [S]_{\text{опт}}$ | V_m , моль/л·мин | $2,5 \cdot 10^{-4}$ | $9,1 \cdot 10^{-5}$ | $3,0 \cdot 10^{-6}$ |
| | K_m , мМ | 0,78 | 170 | 1,9 |
| | n | 1 | 1 | 1 |
| | $[S]_{\text{опт}}$, M | 0,017 | 0,27 | 0,0095 |
| | K'_S , M | 0,37 | 0,43 | 0,046 |
| $t \pm 0,05^\circ \text{C}$ | | 24,7 | 30 | 30 |
| Литературные ссылки | | [13 и данная работа] | [данная работа] | [14] |

Из представленных данных видно, что при гидролизе Na-β-глицерофосфата в выщелоченном черноземе значения $[S]_{\text{опт}}$, а также K_m оказались значительно выше, чем при гидролизе других изученных субстратов. Возможно, это обусловлено тем, что скорость гидролиза Na-β-глицерофосфата определялась по концентрации PO_4^{3-} -ионов, которые в выщелоченном черноземе адсорбируются значительно сильнее, чем органические продукты гидролиза двух других субстратов, причем п-нитрофенол адсорбируется больше, чем фенолфталеин [19].

Кафедра экологии,
кафедра физической и коллоидной химии

Поступила 21.04.2006

ЛИТЕРАТУРА

1. Eivazi F., Tabatabai M.A. – Soil Biol. and Biochem, 1977, v. 9, p. 167–172.
2. Roig M.G., Burguillo F.J., Del Arco A., Usero J.L., Jzguierdo C., Herraez M.A. – Int. J. Biochem, 1982, v. 14, p. 655–666.
3. Holtz K.M., Kantrowitz E.R. – FEBS Letters, 1999, v. 462, p. 4–11.
4. Зуева Н.Н., Далев П.Г., Лазарова Д.Л. – Биохимия, 1993, т. 58, с. 1009–1023.
5. Waymeck P.P., Van Etten R.L. – Arch. Biochem Biophys., 1991, v. 288, p. 621–633.
6. Mazzei F., Botre F., Montilla S., Pilloton R., Podesta E., Botre C. – J. Electroanal. Chem., 2004, v. 574, p. 95–100.
7. Ростовщикова И.Н., Корнеева Г.А., Степанов А.А. – Вестн. Моск. ун-та. Сер. 17. Почвоведение, 1998, № 4, с. 22–27.
8. Геллер И.Г., Гинзбург К.Е. Методы определения фосфатазной активности почв и их критическая оценка: Тез. докладов V делегатского съезда ВОП. Минск, 1977, с. 250.
9. Чумаченко И.Н., Янишевский Ф.В. – Материалы симпозиума «Совершенствование методологии исследований фосфорного режима почв, оптимизация фосфорного питания растений и баланса фосфора в агроэкосистемах». Агрехимия, 1999, № 1, с. 94–96.
10. Галстян А.Ш. – Почвоведение, 1978, № 2, с. 107–114.
11. Ржехина Н.И. О кинетике гидролиза фенолфосфата и фенолфталеинфосфата под действием щелочной фосфатазы. В кн.: Механизм и кинетика ферментативного катализа. М.: Наука, 1964, с. 77–82.
12. Паников Н.С., Ксезенко С.М. – Почвоведение, 1982, № 11, с. 43–50.
13. Геворкян М.Г., Варганян В.Т., Галстян А.Ш., Бейлерян Н.М. – Биолог. ж. Армении, 1985, т. 38, № 9, с. 757–762.
14. Gevorgyan M.G., Parsadanyan G.A., Beylerian N.M. – J. Surf. Sci. Tech., 2004, v. 20, № 3–4, p. 151–158.
15. Геворкян М.Г., Варганян В.Т., Галстян А.Ш., Бейлерян Н.М. – Почвоведение, 1987, № 5, с. 85–89.
16. Геворкян М.Г., Варганян В.Т., Симонян Б.Н. – Биолог. ж. Армении, 1996, т. 49, № 3–4, с. 138–142.
17. Геворкян М.Г., Саркисян К.В. – Биолог. ж. Армении, 1999, т. 52, № 2, с. 133–137.
18. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М., 1990, 398 с.
19. Геворкян М.Г. – Ученые записки ЕГУ, 1994, № 2, с. 80–87.

Գ. Ա. ՓԱՐՍԱԴԱՆՅԱՆ, Մ. Գ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ն. Մ. ԲԵՅԼԵՐՅԱՆ, Կ. Վ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ

ՖՈՍՖԱՏԱԶԱՅԻՆ ՌԵԱԿՑԻԱՅԻ ԿԻՆԵՏԻԿԱՅԻ ԵՎ ՄԵԽԱՆԻԶՄԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԻՄՆԱՅՆԱՑՎԱԾ ՄԵՎԱՀՈՂՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո մ

Na-β-գլիցերոֆոսֆատի կոնցենտրացիայի լայն տիրույթում, ինչպես նաև նատրիումի պ-նիտրոֆենիլֆոսֆատի բարձր կոնցենտրացիաների դեպքում ուսումնասիրված են ֆոսֆատազային ռեակցիայի կինետիկան և մեխանիզմը հիմնայնացված սևահողում: Տույց է տրված, որ այդ սուբստրատների, ինչպես և ավելի վաղ ուսումնասիրված նատրիումի ֆենոլֆտալեինֆոսֆատի հիդրոլիզը ենթարկվում է սուբստրատային ճնշման մեխանիզմին: Ուսումնասիրված գործընթացի կինետիկ և թերմոդինամիկ պարամետրերի վերլուծության հիման վրա ցույց է տրված, որ այդ համակարգերում տարբե-

րությունները կրում են միայն քանակական բնույթ, ինչը պայմանավորված է օգտագործված սուբստրատների և դրանց հիդրոլիզի արդյունքների տարբեր ռեակցիոն, ինչպես նաև սորբցիոն ունակություններով:

G. A. PARSADANYAN, M. G. GEVORGYAN, N. M. BEYLERIAN, K. V. GRIGORYAN,

STUDY OF KINETICS AND MECHANISM OF PHOSPHATASE
REACTION IN LEACHED CHERNOZEM (BLACK SOIL)

Summary

In a wide interval of Na- β -glicerophosphate concentration, as well as at high concentrations of sodium p-nitrophenylphosphate the kinetics and mechanism of phosphatase reaction in leached chernozem has been investigated. It is shown, that the hydrolysis of these substrates, as well as of the earlier studied sodium phenolphthalein obeys the mechanism of substrate inhibition. On the basis of the analysis of kinetics and thermodynamic parameters of the investigated process it is shown, that the differences in these systems have only quantitative character, conditioned by various reactivity, as well as sorption ability of investigated substrates and products of hydrolysis.