

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

ГРНТИ 68.05.45

https://doi.org/10.51886/1999-740X_2022_3_60Ф.Д. Микаилсой^{1*}**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СУБСТРАТА НА КАТАЛАЗНУЮ РЕАКЦИЮ В СУГЛИНИСТОЙ ПОЧВЕ (ПРОВИНЦИЯ ЫГДЫР, ТУРЦИЯ)****I. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ В ПОЧВЕ**

¹*Сельскохозяйственный факультет университета «Ыгдыр», 76000, Ыгдыр, Кампус имени Шехит Бюлент Юртсевер, Турция, *e-mail: fariz.mikailsoy@igdir.edu.tr*

Аннотация. В работе изложены классические и современные представления моделирования ферментативных процессов и определения начальной скорости ферментативной реакции графическими и аналитическими методами. Приводятся методики определения начальной скорости ферментативной реакции в почвах. В отличие от аналитического метода Ньютона-Грегори предлагается новый метод определения начальных скоростей реакций, катализируемых ферментами. Для этой цели рекомендуются наиболее часто используемые моделирования: гиперболический, биномиальный, биномиально-параболические многочлены 5-й и 6-й степени, псевдополиномы 5-й и 6-й степени модели. Предложено использование пакетной программы на ЭВМ для вычисления кинетических параметров. Показана перспективность использования математического моделирования при изучении ферментативных реакций в почве.

Ключевые слова: почва, ферментативная реакция, начальная скорость, ингибирование субстратом, моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Кинетика ферментативных реакций – раздел энзимологии, изучающий зависимость скорости химических реакций, катализируемых ферментами, от химической природы реагирующих веществ, а также от факторов окружающей среды.

По вопросам кинетики действия почвенных ферментов проведены многочисленные исследования [1–16]. Кинетический подход к изучению почвенных ферментов сложился в прошлом столетии, и особенно начиная с 1950 годы в этом направлении наблюдается значительный прогресс.

Известно, что почвенные ферменты могут с полным основанием рассматриваться как ферменты организмов, иммобилизованные на поверхности почвенных частиц. Тогда более целесообразно исследовать кинетику почвенно-ферментативных реакций в стационарном режиме.

Стационарная кинетика находит широкое применение при исследовании ферментативных реакций. Она основана [3, 7, 10–13, 18–19] на измерении начальной скорости v_0 образования продуктов реакции при различных концентрациях субстрата, который, как правило, меняются в интервале $[S] = 10^{-2} - 10^{-3}$ М.

ПОНЯТИЕ О ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ

Ферментативная активность почвы. Все биологические процессы, связанные с превращением веществ и энергии в почве, осуществляются с помощью ферментов, играющих важную роль в мобилизации элементов питания растений, а так же, обуславливающих интенсивность и направленность наиболее важных биохимических процессов, связанных с синтезом и распадом гумуса, гидролизом органических соединений и окислительно-восстановительным режимом почвы [6, 20].

Формирование и функционирование ферментативной активности почвы - сложный и многофакторный процесс. Согласно системно-экологической концепции он представляет собой единство экологически обусловленных процессов поступления, стабилизации и проявления активности ферментов в почве. Эти три звена определены как блоки продуцирования, иммобилизации и действия ферментов [21–23].

Ферменты в почве - это продукты метаболизма почвенного биоценоза, но мнения о вкладе различных компонентов в их накоплении противоречивы.

Ряд исследователей [24, 25] считает, что основная роль в обогащении почвы ферментами принадлежит корневым выделениям растений, другие [26] – почвенным животным, большинство же [27–33] придерживаются мнения о том, что *ферментативный пул* в почве состоит из внутриклеточных и внеклеточных ферментов, преимущественно микробного происхождения.

Почвенные ферменты участвуют при распаде растительных, животных и микробных остатков, а также синтезе гумуса. В результате ферментативных процессов питательные вещества из трудно усвояемых соединений переходят в легкодоступные формы для растений и микроорганизмов. Ферменты отличаются исключительно высокой активностью, строгой специфичностью действия и большой зависимостью от различных условий внешней среды. Последняя особенность имеет большое значение в регулировании их активности в почве [22].

Для определения активности почвенных ферментов разработаны многочисленные методы.

Впервые Купревич В.Ф. (1949, 1951) разработал методы определения активности ферментов в растениях и почве [34, 35].

В последующие годы было проведено множество исследований по этому вопросу, и были разработаны методы, которые развивались и обновлялись [20, 32, 36–46].

Ферментативная активность почв по Д.Г. Звягинцеву [30] складывается из:

- а) внеклеточных иммобилизованных ферментов;
- б) внеклеточных свободных ферментов;
- в) внутриклеточных ферментов мертвых клеток;
- г) внутриклеточных и внеклеточных ферментов, образованных в искусственных условиях эксперимента и не характерных для данной почвы.

Установлено, что каждый фермент действует лишь на вполне определенное вещество или сходную группу веществ и вполне определенный тип химической связи. Это вызвано их строгой специфичностью.

Ферментативная активность находится в функциональной зависимости от таких характеристик почвы, как влажность, температура, численность и метаболическая активность микрофлоры. Все эти факторы обуславливают динамичность ферментативной активности [21].

Для активности ферментов большое значение имеют условия среды (субстрат, влажность, температура, pH и т.д.). Условия почвенной среды, оптимальные для микроорганизмов и высших растений, являются оптимальными и для ферментативной активности. Каждый отдельный экологический фактор при различных сочетаниях других экологических параметров будет иметь неодинаковое значение. Например, в почвах лесостепной зоны большая доля варьирования ферментативной активности обусловлена дефицитом тепла, а в почвах степной - дефицитом влаги.

Ферментативную активность почвы можно использовать в качестве диагностического показателя плодородия различных почв, потому что активность ферментов отражает не только биологические свойства почвы, но и их изменения под влиянием агроэкологических факторов [47].

Ферменты, попадая из различных источников в почву, не разрушаются, а сохраняются в активном состоянии. Нужно полагать, что ферменты, являясь наиболее активным компонентом почвы, сосредоточены там, где наиболее напряженно идет жизнедеятельность микроорганизмов, то есть на поверхности раздела между почвенными коллоидами и почвенным раствором.

Экспериментально доказано, что ферменты в почве находятся главным образом в твердой фазе [30].

Присутствие ферментов в почве и их важная роль для оценки почвенной биологической активности в настоящее время общепризнаны. Присутствие фермента каталазы в почве способствует распаду биохимически токсичной перекиси водорода, которая поступает в почву с выделениями корней и микроорганизмов [48].

Ферментативная активность почв [от лат. *fermentum*-закваска] – способность почвы проявлять каталитическое воздействие на процессы превращения экзогенных и собственных органических и минеральных соединений благодаря имеющимся в ней ферментам. Характеризуя ферментативную активность почв, имеют в виду суммарный показатель активности. Ферментативная активность различных почв неодинакова и связана с их генетическими особенностями и комплексом взаимодействующих экологических факторов. Уровень ферментативной активности почв определяется активностью различных ферментов (инвертазы, каталазы, фосфатаз, и др.)

выражаемой количеством разложенного субстрата за единицу времени на 1 г почвы.

Ферментативная активность почв – результат совокупности процессов поступления, стабилизации и действия ферментов в почве. Вследствие комплексного источника поступления ферментов (микроорганизмы, растения, животные) почва является самой богатой системой по ферментативному разнообразию. Она позволяет выявить особенности биологического фактора почвообразования, который играет важную роль в формировании и развитии почвы как естественно-исторического органоминерального тела. Она является одной из самых главных характеристик при проведении биомониторинга и биодиагностики. Ферментативная активность коррелирует с основными агрохимическими характеристиками

Вполне обоснован интерес к изучению вопроса о ферментативной активности, так как ферменты играют важную роль катализаторов сложных биохимических процессов, протекающих в живых клетках животных, растений и микроорганизмов. В почве энзимы определяют общий биохимический и питательный уровень той или иной исследуемой системы. Почвенные катализаторы имеют различное происхождение: биологическое (ферменты) и абиотическое (минералы).

Активность почвенных ферментов затрагивает превращения углерода, азота, фосфора, серы и окислительно-восстановительные процессы и, следовательно, отражает напряженность биохимических процессов в почве.

Роль ферментов заключается в том, что они осуществляют функциональные связи между компонентами экосистемы и, таким образом, ферментативная активность отражает

функциональное состояние почвенного населения.

Почвы по ферментативной активности различаются в соответствии с их эколого-генетическими особенностями. Так, в генетическом ряду от дерново-подзолистых почв к серым лесным и черноземам активность гидролитических ферментов возрастает в соответствии с увеличением общей микробиологической активности, содержанием гумуса и органических соединений азота и фосфора. В пределах подтипов и разновидностей значение имеют уже другие факторы. Например, в пределах разновидностей черноземов активность отдельных ферментов определяется не содержанием органических соединений, а значениями рН и содержанием карбонатов, оказывающих *ингибирующее (замедляющее) влияние* на активность гидролитических ферментов.

Почвы естественных ландшафтов имеют повышенную ферментативную активность. Сельскохозяйственное освоение снижает ее. Дальнейшая эволюция биологической активности почв зависит от характера ее использования.

Например, окультуривание почв способствует росту активности некоторых ферментов. Развитие эрозионных процессов ухудшает основные почвенно-экологические параметры, контролирующие ферментативный пул и приводит к снижению ферментативной активности почв. Степень эродированности адекватно отражается изменением, в частности, сахарозной и протеазной активности.

Таким образом, относительный уровень ферментативной активности почв диагностирует интенсивность и направленность почвообразовательных процессов как в естественных условиях, так и при различных антропогенных воздействиях на почву.

Одним из характерных проявлений жизни является удивительная способность живых организмов кинетически регулировать химические реакции, подавляя стремление к достижению термодинамического равновесия.

Ферментативная активность может регулироваться активаторами и ингибиторами, которые соответственно, увеличивают или уменьшают скорость реакции.

Кинетика ферментативных реакций. Общие принципы кинетики химических реакций применимы и к ферментативным реакциям. Кинетика ферментативных реакций изучает закономерности протекания во времени ферментативных реакций, а также их механизм.

Кинетика ферментативной реакции (т. е. зависимость скорости реакции от ее условий) определяется в первую очередь свойствами катализатора, вследствие чего она значительно сложнее, чем кинетика некаталитических реакций.

Главной целью изучения кинетики ферментативных реакций является получение информации, которая может способствовать выяснению молекулярного механизма действия фермента.

Ферментативная кинетика занимается исследованием закономерностей влияния химической природы реагирующих веществ (ферментов, субстратов) и условий их взаимодействия (концентрация, рН среды, температуры, присутствие активаторов или ингибиторов) на скорость ферментативной реакции.

Ферментативный катализ начинается с образования активного промежуточного соединения - фермент-субстратного комплекса. Комплекс - результат присоединения молекулы субстрата к каталитически активному

центру фермента. При этом пространственные конфигурации молекул субстрата несколько видоизменяются. Новое ориентированное размещение на ферменте реагирующих молекул обеспечивает высокую эффективность ферментативных реакций, способствующих снижению энергии активации.

За каталитическую активность фермента ответственны не только активный центр фермента, но и вся структура молекулы в целом. Скорость ферментативной реакции регулируется множеством факторов: температурой, рН, концентрацией фермента и субстрата, наличием активаторов и ингибиторов. В роли активаторов могут выступать органические соединения, но чаще различные микроэлементы [40].

Скорость ферментативной реакции. Прежде чем перейти к рассмотрению кинетики ферментативных реакций, нужно установить, что мы принимаем за скорость ферментативной реакции, как ее охарактеризовать и как ее определить экспериментально [41].

Для ферментативной реакции скорость зависит существенно от количества добавленного фермента, т.е. скорость реакции будет являться мерой каталитической активности фермента. Эта мера часто называется «активностью фермента» и выражается в стандартных единицах.

Е - «единица количества фермента» - это его количество, которое превращает один моль субстрата (S) в 1 минуту в стандартных условиях (насыщающие концентрации субстрата, оптимум рН, температура 25 °С, избыток кофактора);

«удельная активность» - активность единицы веса фермента в стандартных условиях; она выражается в мкмольх превращенного субстрата в мин. на мг белка;

«молекулярная активность» - число молекул субстрата, претерпевающих превращение в стандартных условиях под действием одной молекулы фермента за 1 минуту;

«активность каталитического центра» - число молекул субстрата, претерпевающих превращение в стандартных условиях в одном каталитическом центре за 1 минуту.

Удельная активность и скорость ферментативной реакции выражаются в мкмольх, однако это не одно и то же, т.к. удельная активность - это величина, полученная в определенных стандартных условиях.

Практическое определение скорости ферментативной реакции осуществляется на основании определения начальной скорости ферментативной реакции.

Начальная скорость - это скорость в первые моменты инкубации, пока еще сохраняется пропорциональная зависимость между нарастанием продукта и временем инкубации, пока превращению подверглось не более 10-15 % субстрата.

Итак, основное правило работы с ферментами - *определять начальную скорость ферментативной реакции*, иначе любое кинетическое исследование или ингибиторный анализ теряют всякий смысл.

Стационарная кинетика ферментативных реакций с одним субстратом. Уравнение Кинетика Михаэлиса-Ментена. Самая ранняя попытка математически описать ферментативные реакции была предпринята французским биохимиком Дюкло в 1898 г. [41].

В 1903 году французский физико-химик русского происхождения Виктор Анри [49] и независимо от него Браун [50] открыли, что ферментативные реакции начинаются с образования связи между ферментом и субстратом

[51], выдвинули гипотезу об образовании фермент-субстратного комплекса в ходе реакции.

Главный вклад Анри заключался в том, что он разделил ферментативные реакции на две стадии. На первом этапе фермент-субстрат обратимо связывается с образованием комплекса фермент-субстрат. Это иногда называют комплексом Михаэлиса.

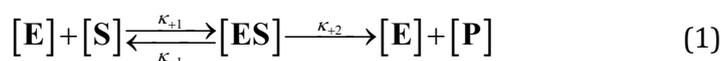
Затем фермент катализирует химическую стадию реакции и высвобождает продукт.

Его работу продолжили американский биохимик Леонор Михаэлис и

канадский врач Мод Ментен [1], изучавшие кинетику одного из простейших механизмов ферментативной реакции.

В 1913 году Михаэлис и Ментен [1] опубликовали свою теорию общего механизма ферментативных реакций. Их уравнение стало фундаментальным принципом всех кинетических исследований ферментов вот уже целый век.

Михаэлис и Ментен предположили, что механизм ферментативных реакций с участием одного субстрата и образованием одного продукта, описывается моделью:



где E – фермент; S – субстрат; ES – фермент-субстратный комплекс (так называемый комплекс Михаэлиса); P – продукт; k_{+1} , k_{+2} и k_{-1} – константы скорости двух прямых и одной обратной реакций соответственно. При этом вторая стадия предполагается

необратимой, и определяет скорость ферментативной реакции.

В реакции (1), на основе закона действующих масс, скорости двух прямых и одной обратной реакций соответственно определяются следующими равенствами:

$$v_{+1} = k_{+1} [E] \cdot [S] \quad , \quad v_{+2} = k_{+2} [ES] \quad \text{и} \quad v_{-1} = k_{-1} [ES] \quad (2)$$

Для данного механизма скорость реакции определяется скоростью образования конечного продукта. Михаэлис и Ментен предположили, что

скорость реакции определяется распадом комплекса (ES) и образования продукта (P) т.е. константой k_{+2} .

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[ES]}{dt} = +k_{+2} [ES] \quad (3)$$

Константу скорости k_{+2} иногда называют *числом оборотов* фермента. Она может изменяться в пределах от 10 до 10^8 мин⁻¹.

Отметим, что процесс образования фермент-субстратного комплекса ES есть реакция второго порядка, а процесс распада его – реакция первого порядка. Эту реакцию можно считать необратимой, что в большинстве

случаев соответствует действительности. Применение закона массового действия, который гласит, что скорость реакции пропорциональна произведению концентраций реагентов (т.е. $[E][S]$), дает систему из четырех нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений, которые определяют скорость изменения реагентов со временем t^{21} :

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[\mathbf{E}]}{dt} &= -k_{+1}[\mathbf{S}][\mathbf{E}] + k_{-1}[\mathbf{ES}] + k_{+2}[\mathbf{ES}] \\ \frac{d[\mathbf{S}]}{dt} &= -k_{+1}[\mathbf{S}][\mathbf{E}] + k_{-1}[\mathbf{ES}] \\ \frac{d[\mathbf{ES}]}{dt} &= k_{+1}[\mathbf{S}][\mathbf{E}] - k_{-1}[\mathbf{ES}] - k_{+2}[\mathbf{ES}] \\ \frac{d[\mathbf{P}]}{dt} &= -\frac{d[\mathbf{ES}]}{dt} = +k_{+2}[\mathbf{ES}] \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

В этом уравнении и далее квадратные скобки обозначают концентрацию соответствующего вещества в моль/л или ммоль/л.

Во всех четырех уравнениях положительные члены описывают

прибыль соответствующих концентраций, а отрицательных – убыль.

Если учитывать условия сохранения молекул фермента в процессе рекации (1), то система (4) намного упрощается и получим:

$$\begin{aligned} \frac{d[\mathbf{E}]}{dt} + \frac{d[\mathbf{ES}]}{dt} &= \frac{d}{dt} \langle [\mathbf{E}] + [\mathbf{ES}] \rangle = \\ &= \langle -k_{+1}[\mathbf{E}][\mathbf{S}] + k_{+1}[\mathbf{E}][\mathbf{S}] \rangle + \langle k_{-1}[\mathbf{ES}] - k_{-1}[\mathbf{ES}] \rangle + \langle k_{+2}[\mathbf{ES}] - k_{+2}[\mathbf{ES}] \rangle = 0 \end{aligned}$$

Другими словами, получим уравнения материального баланса для

фермента в момент времени t после начала реакции в следующем виде:

$$\frac{d}{dt} \langle [\mathbf{E}] + [\mathbf{ES}] \rangle = 0 \Leftrightarrow [\mathbf{E}] + [\mathbf{ES}] = \text{const} = [\mathbf{E}]_0$$

Здесь, $[\mathbf{E}]_0$ – начальная концентрация фермента; $[\mathbf{E}]$ – концентрация свободного фермента, а $[\mathbf{ES}]$ – связанного фермента; индекс "0" обозначает начальную концентрацию.

Следовательно, уравнения материального баланса для фермента и субстрата в момент времени t после начала реакции имеют вид:

$$[\mathbf{E}]_0 = [\mathbf{E}] + [\mathbf{ES}] \quad (5)$$

Равенство (5) означает, что фермент, изначально существовавший только в свободной форме, в процессе реакции находится как в виде фермент-субстратного комплекса, так и в виде молекул свободного фермента [52].

Квазиравновесное приближение (метод квазиравновесных концентраций) применяется, если в сложных реакциях есть обратимая стадия (или

несколько стадий) с быстро устанавливающимся равновесием, а все остальные реакции участников этого равновесия медленные. Предполагается, что равновесие в обратимой стадии достигается мгновенно.

Система кинетических уравнений (4) и уравнение материального баланса (5) полностью описывают кинетическое поведение системы (1).

Система не имеет точного аналитического решения, но решается методами *квазиравновесных* и *стационарных* концентраций [53].

Первый метод был использован для получения кинетического уравнения Анри [49, 51] Л. Михаэлисом и М. Ментен [1], второй метод, предложенный Г. Бриггсом и Дж. Холдейном [2] в 1925 г, стал общепринятым в кинетике ферментативных реакций [54].

Многие из нас понимают кинетику ферментов с точки зрения моделей, разработанных почти столетие назад Михаэлисом и Ментеном [1].

Эти исследования были уточнены Бриггсом и Холдейном [2] десятилетие спустя, а затем расширены в последующие годы многими другими [55, 56].

В зависимости от численных значений константы скорости элементарных стадий κ_{+1} , κ_{-1} и κ_{+2} , реакция (1) называется *квазиравновесный* или *квазистационарный режим протекания реакции*.

Так например, если $\kappa_{-1} \gg \kappa_{+2}$, то на первой стадии (образование комплекса ES) ферментативной реакции с течением времени очень быстро по сравнению со скоростью следующей стадии устанавливается равновесие (*квазиравновесный режим протекания реакции*).

Сначала исследуем случай когда имеет место $\kappa_{-1} \gg \kappa_{+2}$. В своем первоначальном анализе Михаэлис и Ментен предположили, что субстрат [S] находится в мгновенном химическом равновесии с ферментно-субстратным комплексом [ES].

На основе закона действующих масс, скорости прямых и обратной реакции в модели (1) определяются следующими равенствами: $v_{+1} = \kappa_{+1}[E] \cdot [S]$ и $v_{-1} = \kappa_{-1}[ES]$. Поскольку в квазиравновесном состоянии скорости прямой и обратной реакций равны ($v_{+1} = v_{-1}$), то получаем следующее равенство:

$$\kappa_{+1} \cdot [E][S] = \kappa_{-1} [ES] \quad (6)$$

Учитывая уравнения материального баланса для фермента в уравнение (6), получаем следующее

выражение для концентрации [ES] ферментно-субстратного комплекса:

$$\begin{aligned} \kappa_{+1} \cdot ([E]_0 - [ES]) \cdot [S] &= \kappa_{-1} [ES] \Rightarrow (\kappa_{-1} + \kappa_{+1} [S])[ES] = \kappa_{+1} \cdot [E]_0 [S] \\ [ES] &= \frac{\kappa_{+1} \cdot [E]_0 [S]}{\kappa_{-1} + \kappa_{+1} \cdot [S]} = \frac{[E]_0 [S]}{\kappa_{-1} / \kappa_{+1} + [S]} = \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_s + [S]}, \left(K_s = \frac{\kappa_{-1}}{\kappa_{+1}} = \frac{[E][S]}{[ES]} \right) \end{aligned} \quad (7)$$

Здесь K_s называется константой диссоциации (разложения) ферментно-субстратного комплекса или константой субстрата и характеризующая

взаимодействие фермента с субстратом в равновесных условиях определяется следующим образом:

$$K_s = 1 / K_p = \kappa_{-1} / \kappa_{+1}, K_p = \kappa_{+1} / \kappa_{-1} \quad (8)$$

По значению K_s можно судить о ферменту. Константа K_s имеет химическом сродстве субстрата к ферменту. Константа K_s имеет размерность концентрации (моль/л).

Равновесное состояние характеризуется соответствующей константой равновесия K_p . Эта константа равна отношению констант прямой и

обратной реакций. Итак, скорость v реакции, т. е. скорость образования продукта P, равна:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \kappa_{+2} \cdot [ES] = \kappa_{+2} \cdot \frac{[E]_0 \cdot [S]}{K_s + [S]} = \frac{\kappa_{+2} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_s + [S]} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (9)$$

Это и есть уравнение Михаэлиса-Ментен, выражающее количественное соотношение между скоростью ферментативной реакции и концентрацией субстрата [S] при условии, что обе константы V_{\max} и K_s известны.

Для того чтобы обойти трудности, связанные с решением громоздких систем кинетических уравнений (4), применяется весьма эффективный приближенный метод – *метод квазистационарных концентраций*.

Допущение о стационарности, точнее — о квазистационарности, сводит процесс отыскания решения для скорости ферментативной реакции к чисто алгебраической задаче [57].

$$\bar{v}_{+1} = \bar{v}_{-1} + \bar{v}_{+2} \Leftrightarrow \kappa_{+1} [S][E] = \kappa_{-1} [ES] + \kappa_{+2} [ES] \quad (10)$$

Так что концентрация [ES] должна оставаться постоянной (стационарной) в ходе ферментативной реакции, во всяком случае в начальный период реакции (при $[S] \approx [S]_0$). Это предположение является логичным, если принять во внимание высокую реакционную способность фермент-субстратных промежуточных соединений (что уже доказано в ряде случаев экспериментально) [58].

Квазистационарное состояние (т.е. примерно стационарный, почти не зависящий от времени) — состояние, не являющееся стационарным, но проявляющее свойства стационарного состояния в течение достаточно малых промежутков времени [59].

Далее исследуем случай когда имеет место $\kappa_{+2} \gg \kappa_{+1}$. Если $\kappa_{+2} \gg \kappa_{+1}$, то для фермент-субстратного комплекса применим метод *квазистационарности*, так как в подавляющем большинстве реакций константа скорости (κ_{+2}) превращения фермент-субстратного комплекса (ES) в фермент и продукт много больше, чем константа скорости образования фермент-субстратного комплекса (κ_{+1}) из фермента и субстрата.

В этом случае скорость образования v_{+1} фермент-субстратного комплекса (ES) должна быть практически равна скорости его расходу, ($v_{-1} + v_{+2}$) т.е.

В 1925 г. Бриггс и Холдейн доказали, что уравнение Михаэлиса-Ментен справедливо, если $\kappa_2 \ll \kappa_{-1}$ т.е. когда равновесие элементарной стадии устанавливается очень быстро по сравнению со скоростью следующей стадии.

Обычно ферментативные реакции проводят в избытке субстрата по сравнению с ферментом. Поэтому фермент практически полностью входит в состав фермент-субстратного комплекса ES [52].

Благодаря этому концентрация [ES] практически постоянна в ходе реакции, т.е. не зависит от времени (квазистационарна): $[ES] = \text{const}$.

В этом случае должно выполняться соотношение:

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = \bar{v}_{+1} - (\bar{v}_{-1} + \bar{v}_{+2}) = \kappa_{+1} [\text{S}][\text{E}] - (\kappa_{-1} + \kappa_{+2}) [\text{ES}] = 0 \quad (11)$$

Учитывая уравнения материального баланса для фермента (5) и выражение для ферментно-субстратного комплекса [ES]:
уравнение (11), получаем следующее

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = \kappa_{+1} [\text{S}][\text{E}] - (\kappa_{-1} + \kappa_{+2}) [\text{ES}] = \kappa_{+1} [\text{S}]([\text{E}]_0 - [\text{ES}]) - (\kappa_{-1} + \kappa_{+2}) [\text{ES}] = 0 \quad (12)$$

Решая уравнение (12) относительно [ES], получим:

$$\begin{aligned} \kappa_{+1} [\text{S}][\text{E}]_0 - \kappa_{+1} [\text{S}][\text{ES}] - (\kappa_{-1} + \kappa_{+2}) [\text{ES}] &= 0 \\ [\text{ES}] \{ \kappa_{+1} [\text{S}] + (\kappa_{-1} + \kappa_{+2}) \} &= \kappa_{+1} [\text{S}][\text{E}]_0 \\ [\text{ES}] &= \frac{\kappa_{+1} \cdot [\text{E}]_0 [\text{S}]}{\kappa_{+1} \cdot [\text{S}] + \kappa_{-1} + \kappa_{+2}} = \frac{[\text{E}]_0 [\text{S}]}{[\text{S}] + (\kappa_{-1} + \kappa_{+2}) / \kappa_{+1}} \end{aligned} \quad (13)$$

Комбинируя выражения (3) и (13), найдем уравнение скорости двухстадийной односубстратно ферментативной реакции (1), протекающей в стационарном режиме:

$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = \kappa_{+2} \cdot [\text{ES}] = \kappa_{+2} \cdot \frac{[\text{E}]_0 [\text{S}]}{[\text{S}] + (\kappa_{-1} + \kappa_{+2}) / \kappa_{+1}} = \frac{V_{\max} \cdot [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \quad (14)$$

где $V_{\max} = \kappa_{+2} [\text{E}]_0$ — максимальная скорость реакции при полном насыщении фермента субстратом и $K_M = (\kappa_{-1} + \kappa_{+2}) / \kappa_{+1}$ — называется константой Михаэлиса теории Бриггса – Холдейна. Это кинетическая константа (с размерностью концентрации), которая равняется такой концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции

составляет половину от максимального значения.

Численное значение K_M зависит от многих факторов (рН, температуры, присутствия ингибиторов или активаторов) и изменяется в довольно широких пределах – примерно от 1 до 10^{-8} моль·л⁻¹. Оба константы Михаэлиса связаны между собой:

$$K_M = \frac{\kappa_{-1} + \kappa_{+2}}{\kappa_{+1}} = \frac{\kappa_{-1}}{\kappa_{+1}} + \frac{\kappa_{+2}}{\kappa_{+1}} = K_s + \frac{\kappa_{+2}}{\kappa_{+1}} = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]}, \quad \left(K_s = \frac{\kappa_{-1}}{\kappa_{+1}} = \frac{[\text{ES}]}{[\text{E}][\text{S}]} \right)$$

Уравнение (14) было получено Бриггсом и Холдейном в 1925 г., но названо ими уравнением Михаэлиса-Ментен в честь классических исследований этих учёных, предложивших воз-

можную схему ферментативной реакции и заложивших основы современной энзимологии.

При изучении начальных скоростей реакции можно полагать $[\text{S}] = [\text{S}]_0$

и для начальной стадии реакции можно пренебречь уменьшением концентрации субстрата [60]. Это предположение является логичным, если принять во внимание высокую реакционную способность фермент-субстратных промежуточных соединений.

В экспериментальном отношении гораздо проще исследовать зависимость скорости ферментативной реакции не от текущей $[S]$, а от начальной концентрации субстрата $[S]_0$; в этом случае уравнение (14) записывают в виде [61].

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (15)$$

где v_0 — начальная скорость ферментативной реакции, измеренная для заданной начальной концентрации субстрата $[S]_0$.

Уравнение (15) является фундаментальным уравнением ферментативной кинетики и обычно называется уравнением Михаэлиса – Ментен или Бриггса–Холдейна. Он служит полезной отправной точкой для анализа кинетики ферментативных процессов.

На рисунке 1 представлена зависимость начальной скорости ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата.

График зависимости начальной скорости v_0 ферментативной реакции от начальной концентрации субстрата $[S]_0$ представляет собой гиперболу (рисунок 2), похожую на кривую, изображенную на рисунке 1.

Однако построение такого графика не используется для экспериментального определения максимальной скорости реакции и константы Михаэлиса, т. к. в эксперименте нередко сложно достичь субстратного насыщения (и даже если оно достигнуто, то определить параметры из кривой с насыщением бывает довольно трудно).

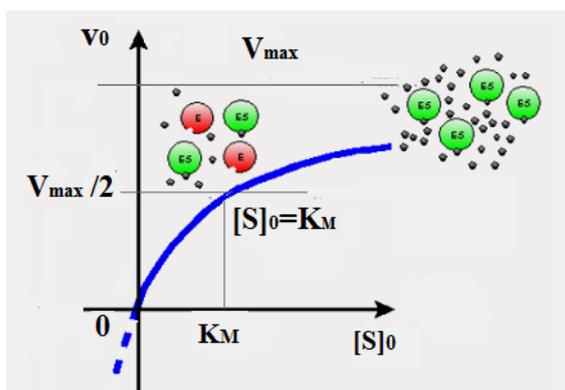


Рисунок 1 - График зависимости начальной скорости v_0 от концентрации $[S]_0$

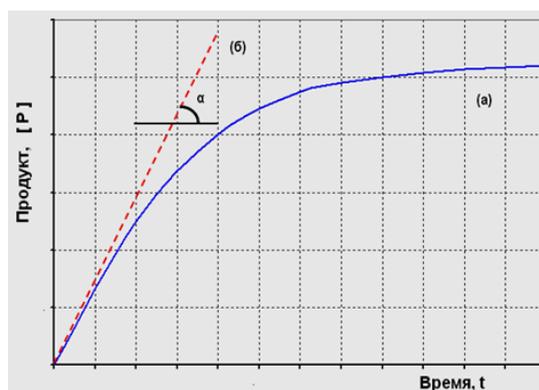


Рисунок 2 - График накопления продукта во времени и определение начальной скорости v_0 реакции графическим методом.

Если $\kappa_{+1} \gg \kappa_{+2}$, то на первой стадии ферментативной реакции с течением времени устанавливается квазиравновесие, и в выражение для скорости ферментативной реакции входит уже

$$v = \frac{\kappa_{+2} \cdot [E]_0 [S]}{K_M + [S]} = \frac{\kappa_{+2} \cdot [E]_0 [S]}{K_s + (\kappa_{+2} / \kappa_{+1})_{\kappa_{+1} \gg \kappa_{+2}} + [S]} \approx \frac{\kappa_{+2} \cdot [E]_0 [S]}{K_s + [S]} \quad (9)$$

Очевидно, что стационарная теория Бриггса-Холдейна переходит в равновесную теорию Михаэлиса при $\kappa_{+1} \gg \kappa_{+2}$, так как в этом случае $K_M = K_s$.

В силу идентичности уравнений (9) и (14) смысл константы Михаэлиса остается прежним: она численно равна такой концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной.

В большинстве случаев кинетика ферментативных реакций весьма удовлетворительно описывается простым уравнением Михаэлиса — Ментен, что подтверждает правильность основных представлений о механизме рассматриваемого процесса и справедливость допущения о квазистационарности его течения [57].

Уравнение (15) является основным уравнением начальной скорости стационарной кинетики с участием одного субстрата и образованием одного продукта. Оно носит название Михаэлиса — Ментен авторов, которые развивая представления Брауна и Анри в области ферментативной кинетики, экспериментально показали приложи-

мость этого уравнения ко многим ферментативным процессам.

Влияние константы скорости κ_{+2} на $[ES]$ было учтено Бриггсом и Холдейном. В 1925 г. они доказали, что уравнение Михаэлиса-Ментен справедливо, если $\kappa_{+2} \ll \kappa_{-1}$ т.е. когда равновесие элементарной стадии устанавливается очень быстро по сравнению со скоростью следующей стадии.

Однако в уравнении (15) сохранили название первых авторов. Точно так же константа K_M представляющая соотношение трех констант (κ_{+1} , κ_{+2} и κ_{-1}), носит название константы Михаэлиса, хотя и имеет иной, более точный смысл [3].

Анализ Уравнения Михаэлиса-Ментена

Проанализируем уравнение (15) для начальной скорости реакции при различных начальных концентрациях субстрата.

1) В случае, когда начальная концентрация субстрата мала по сравнению с константой Михаэлиса, $[S]_0 \ll K_M$, то

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0} \approx \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + 0} = \frac{V_{\max}}{K_M} \cdot [S]_0 \quad (16)$$

и ферментативная реакция имеет первый порядок как по ферменту, так и по субстрату.

2) При больших концентрациях субстрата, $[S]_0 \gg K_M$, начальная ско-

рость реакции не зависит от концентрации субстрата и называется максимальной скоростью ферментативной реакции v_{\max} . Другими словами, при увеличении концентрации субстрата

скорость реакции стремится к предельному значению. Тогда уравнение для начальной скорости реакции можно записать в виде:

$$\lim_{[S]_0 \rightarrow \infty} v_0 = \frac{d[P]}{dt} = \lim_{[S]_0 \rightarrow \infty} \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0} = \lim_{[S]_0 \rightarrow \infty} \frac{V_{\max}}{1 + K_M/[S]_0} = \frac{V_{\max}}{1+0} = V_{\max} \quad (17)$$

Этот эффект так называемого субстратного насыщения обусловлен практически полным связыванием всего имеющегося в системе фермента в фермент-субстратный комплекс, поэтому его концентрация, а, следовательно, и наблюдаемая скорость реакции перестает зависеть от концентрации субстрата.

Ингибирование ферментативной реакции субстратом. Субстратное ингибирование представляет собой частный случай неконкурентного ингибирования, при котором две молекулы субстрата связываются с ферментом и препятствуют образованию продукта.

Исследование кинетики торможения ферментов высокими концентрациями субстрата имеет большое значение для понимания механизмов ферментативного катализа.

Наличие большого количества субстрата в среде затрудняет связывание молекул субстрата с ферментом. Это называется чрезмерным субстратным ингибированием.

Это следует учитывать при определении концентрации субстрата в ферментном анализе. Одновременное связывание 2 молекул субстрата с активным центром фермента схематически показано на рисунке 3.

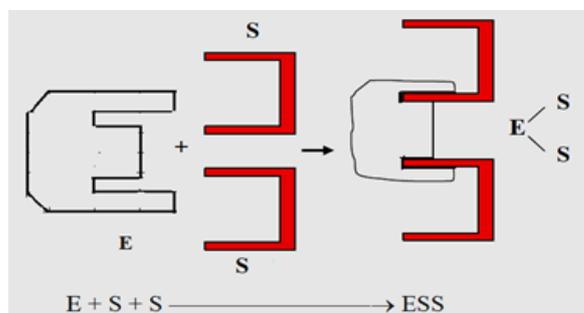


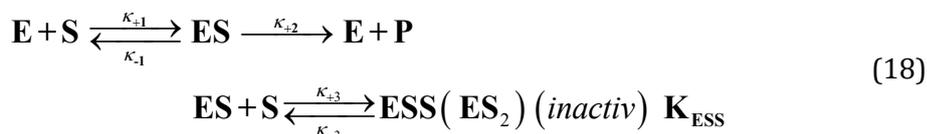
Рисунок 3 - Одновременное связывание 2 молекул субстрата с активным центром фермента

Классическая модель Михаэлиса недостаточна, если большое количество субстрата ингибирует образование продукта в ферментативных реакциях. В этом случае избыток субстрата ингибирует фермент, так как к активному центру фермента присоединяются одновременно больше двух молекул субстрата. Ингибирование снимается только снижением концентрации субстрата.

Кинетика неактивного (ES+S или) формирования ESS.

Если к активному центру фермента присоединяются одновременно 2 молекулы субстрата, в этом случае одно субстратная модель используется для описания эффекта ингибирующего элемента субстрата, представленного Haldane (и обобщенного Lineweaver и Burk, как описано ниже [57, 62-66])

Рассмотрим стационарную кинетику ингибирования субстратом простейшей ферментативной реакции, в которой, помимо активного комплекса ES, образуется неактивный комплекс ES₂ [57]:



Путем несложных преобразований можно получить выражение для начальной скорости (v_0) стационарной

Схема стационарной кинетики субстратного ингибирования простейшей ферментативной реакции, в которой помимо активного комплекса ES образуется неактивный комплекс ESS, выглядит следующим образом:

реакции, тормозимой избытком субстрата [62–63]:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [\text{S}]_0}{\mathbf{K}_M + [\text{S}]_0 + \frac{1}{\mathbf{K}_{\text{ESS}}} [\text{S}]_0^2} = \frac{V_{\max} \cdot [\text{S}]_0}{\mathbf{K}_M + \left(1 + \frac{[\text{S}]_0}{\mathbf{K}_{\text{ESS}}}\right) \cdot [\text{S}]_0} \quad (19)$$

Здесь \mathbf{K}_M – константа Михаэлиса, \mathbf{K}_{ESS} – это коэффициент разложения, характеризующий скорость образо-

вания неактивного комплекса [ESS], который ингибирует (блокирует) ферментативную реакцию:

$$V_{\max} = \kappa_{+2} [\text{E}]_0, \quad \mathbf{K}_M = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = \frac{\kappa_{-1} + \kappa_{+2}}{\kappa_{+1}}, \quad \mathbf{K}_{\text{ESS}} = \frac{[\text{ES}][\text{S}]}{[\text{ESS}]} = \frac{\kappa_{-3}}{\kappa_{+3}} \quad (20)$$

Уравнение (19) графически выражается характерной «колоколообразной» кривой с максимумом. В практике реализуются и более сложные механизмы субстратного ингибирования.

Определение начальной скорости ферментативной реакции. Следует отметить, что многие исследователи при изучении кинетики ферментативных реакций (в частности в почве), в качестве скорости ошибочно используют результаты измерения активности ферментов (скажем для каталазной реакции за 3 минуты образования продукта, O₂) или в крайнем случае скорости образования продуктов реакции в зависимости от времени t в условиях линейности.

Тут допускаются 2 существенные ошибки: первая, как было выше отмечено, при изучении и определении кинетических параметров необходимо определить начальную скорость v_0 реакции (15); вторая, образования [P] никогда не происходит в условиях линейности в ходе реакции в зависимости от времени t (рисунок 4).

Кинетические исследования проводят при малых степенях превращения, т.е. измеряют начальную скорость реакции v_0 – это позволяет не учитывать обратимость второй стадии реакции (1) и влияния продукта [P] на ход реакции, а также не учитывать концентрацию [P] во втором уравнении (5) [67, 68].

Кинетические механизмы реакций, катализируемых ферментами, обычно предлагаются для объяснения данных о начальной скорости. Именно такая попытка корреляции привела Брауна в 1902 г. [49] к предположению,

Кинетические механизмы реакций, катализируемых ферментами, обычно предлагаются для объяснения данных о начальной скорости. Именно такая попытка корреляции привела Брауна в 1902 г. [49] к предположению,

что фермент и его субстрат должны объединяться в течение ограниченного периода времени, прежде чем может произойти катализ [69].

Как правильно отмечено [10-12, 18, 19], точность определения начальной скорости имеет решающее влияние на точность всех вычислений, использующих этот параметр. Чем лучше (по накоплению продукта или расходу субстрата) выбран временно интервал, при котором $d[ES]/dt=0$, тем точнее будет оценка начальной скорости.

Для определения начальной скорости реакции, сначала по результатам

измерений следует построить кинетические кривые $y=f([P])$.

Для этого, следует определить количество продукта $[P_i]$, выделившегося в ходе реакции в конце времени измерения t_1, t_2, \dots, t_n (секунды, минуты, часы). Далее, измеренные пара значений $(t_i, [P_i])$, $(i=1,2,\dots,n)$ записываются в формате таблицы 1.

Концентрацию образующего продукта реакции y_i в момент времени t_i следует определить в возможно более широком интервале времени. Другими словами, время реакции продолжается до тех пор, пока выделяемый продукт не станет стабильным.

Таблица 1 - Экспериментальные данные

| № | i | 1 | 2 | 3 | 4 | ... | n |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|---------|
| Время | t_i | t_1 | t_2 | t_3 | t_4 | ... | t_n |
| Продукт | $[P_i]$ | $[P_1]$ | $[P_2]$ | $[P_3]$ | $[P_4]$ | ... | $[P_n]$ |
| | y_i | y_1 | y_2 | y_3 | y_4 | ... | y_n |

Затем создается кинетическая кривая с использованием значений измерений в таблице 1 для

определения изменения продукта во времени: $y=f(t)$, $[P]=f(t)$ (рисунок 3).

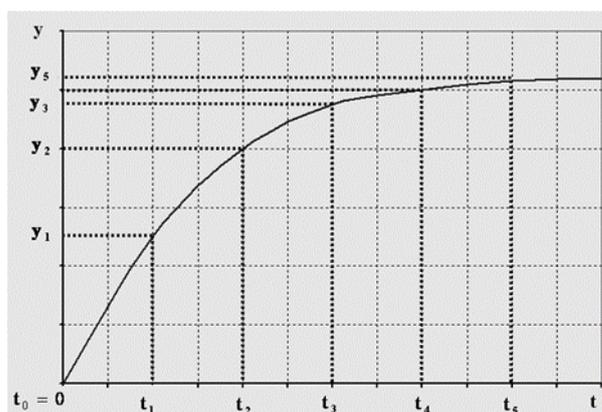


Рисунок 4 - Кинетическая кривая $y=[P]=f(t)$ накопления продукта во времени
Расчет начальной скорости реакции аналитическим методом

Следовательно, одной из основных задач ферментативной кинетики является нахождение значения начальной скорости v_0 от времени. Эта задача решается двумя методами: методом эмпирического дифференцирования (*гра-*

фический, или *дифференциальный метод*) и *аналитическим методом*. На рисунке 2 представлен один из возможных графиков зависимости количества образовавшегося продукта $[P]$ ферментативной реакции от времени t [18].

Из этого графика следует, что со временем скорость реакции $v=d[P]/dt$ уменьшается, так как постепенно 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 реакции равновесие 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 своего действия [11].

Скорость реакции в начальный момент времени, как правило, максимальна.

Графический метод. Наиболее простой метод определения начальной скорости реакции, если имеется некоторая кинетическая кривая (рисунок 2,а), – построение касательной к этой кривой в точке $t=0$ (рисунок 2) и вычисление тангенса ее наклона к оси абсцисс. Тогда $v_0=d[P]/dt=\tan\alpha$.

Однако в этом методе точность определения v_0 весьма существенно зависит от точности построения касательной и обычно невелика. Проведение прямой линии (т.е. касательной) по экспериментально полученным точкам, если оно делается на глаз, зависит в значительной мере от опыта и личного предубеждения исследователя [3, 18].

Аналитический метод.

Более точные результаты дают аналитические методы, хотя технически они немного сложнее [3, 11, 18]. Относительно точнее определение начальной скорости обеспечивается *интерполяционным методом Грегори – Ньютона*.

Один из наиболее простых аналитических методов, основанный на экстраполяции (т.е. получение значений y_i вне таблицы данных) по Ньютону – Грегори, состоит в следующем:

1. Экспериментальные результаты измерения концентрации продукта реакции (обозначаем ее $y=[P]$) выражают в виде кинетической кривой (рисунок 3).

2. Время наблюдения за ходом процесса разбивают на равные интервалы (обычно 5-6 от начала координат) Δt . Желательно, чтобы число интервалов соответствовало процессу реакции, когда образование продукта становиться незначительным.

3. Используя величины y_i , соответствующие значениям времени t_i , конечные разности Δy_i , $\Delta^2 y_i$ и т.д. вычисляют по следующей формуле: $\Delta^n y_i = \Delta^{n-1} y_{i+1} - \Delta^{n-1} y_i$ ($n=1,2,\dots$) и выражают в следующей форме (таблица 2).

4. Далее, по следующей формуле находят начальную скорость реакции:

$$v_0 = \sum_{i=1}^n (-1)^{i+1} \frac{\Delta^i y_0}{i \cdot \Delta t} = \frac{\Delta y_0}{\Delta t} - \frac{\Delta^2 y_0}{2 \cdot \Delta t} + \frac{\Delta^3 y_0}{3 \cdot \Delta t} - \frac{\Delta^4 y_0}{4 \cdot \Delta t} + \frac{\Delta^5 y_0}{5 \cdot \Delta t} + \dots \quad (21)$$

Таблица 2 - Вычисление конечных разностей $\Delta^n y_i = \Delta^{n-1} y_{i+1} - \Delta^{n-1} y_i$ ($n=1,2,\dots$) для расчета начальной скорости v_0

| <i>i</i> | t_i | y_i | Конечные разности 1, 2, 3,.. порядки | | | |
|----------|-----------|-----------|--------------------------------------|--|--|--|
| | | | Δy_i | $\Delta^2 y_i$ | $\Delta^3 y_i$ | $\Delta^4 y_i$ |
| 0 | $t_0 = 0$ | $y_0 = 0$ | | | | |
| 1 | t_1 | y_1 | $\Delta y_0 = y_1 - y_0$ | | | |
| 2 | t_2 | y_2 | $\Delta y_1 = y_2 - y_1$ | $\Delta^2 y_0 = \Delta y_1 - \Delta y_0$ | | |
| 3 | t_3 | y_3 | $\Delta y_2 = y_3 - y_2$ | $\Delta^2 y_1 = \Delta y_2 - \Delta y_1$ | $\Delta^3 y_0 = \Delta^2 y_1 - \Delta^2 y_0$ | |
| 4 | t_4 | y_4 | $\Delta y_3 = y_4 - y_3$ | $\Delta^2 y_2 = \Delta y_3 - \Delta y_2$ | $\Delta^3 y_1 = \Delta^2 y_2 - \Delta^2 y_1$ | $\Delta^4 y_0 = \Delta^3 y_1 - \Delta^3 y_0$ |

Этот метод дает вполне удовлетворительные результаты, если имеется достаточное число экспериментальных точек и правильно проведена кинетическая кривая по экспериментальным точкам. Другой аналитический метод определения начальной ско-

рости ферментативных реакций основан на использовании различных математических моделей. Различные модели использовались для определения начальной скорости каталитической реакции (таблица 3).

Таблица 3 - Модели, выражающие изменение продукта с течением времени

| № | Название Моделей | Аналитические Выражение Моделей |
|---|----------------------------|---|
| 1 | Гиперболическая | $[P(t)] = \frac{a_1 t}{a_2 + t}$ |
| 2 | Биномиальная | $[P(t)] = a_1 t^{a_2} e^{-a_3 t}$ |
| 3 | Биномиально-параболическая | $[P(t)] = a_1 t^{a_2} e^{-a_3 t \pm a_4 t^2}$ |
| 4 | Многочлен 5-й степени | $[P(t)] = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_5 t^5 = \sum_{k=0}^5 a_k t^k$ |
| 5 | Многочлен 6-й степени | $[P(t)] = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_6 t^6 = \sum_{k=0}^6 a_k t^k$ |
| 6 | Псевдополином 5-й степени | $[P(t)] = a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_n t^n = \sum_{k=0}^5 a_k t^k$ |
| 7 | Псевдополином 6-й степени | $[P(t)] = a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_n t^6 = \sum_{k=0}^6 a_k t^k$ |

Параметры a_i определяются по методу наименьших квадратов. Далее начальная скорость находится из уравнения $v_0 = d[P]/dt|_{t=0}$. В соответствии с моделями №1-7 легко находятся фор-

мулы начальной скорости. В частности для (гиперболической) модели №1 и для остальных моделей соответственно имеем:

$$v_0 = \left. \frac{d[\mathbf{P}]}{dt} \right|_{t=0} = \frac{a_1}{a_2} \quad v_0 = \left. \frac{d[\mathbf{P}]}{dt} \right|_{t=0} = a_1 \quad (23)$$

Наиболее адекватная модель определяется в соответствии с критериями [70] выбора модели (коэффициент корреляции Пирсона — R^2 , скорректированный R-квадрат — R^2_{adj} , среднеквадратическая ошибка — σ , средняя абсолютная ошибка в процен-

тах — A, индекс согласия — D, U-статистика Тейла — UИ), Информационный критерий Акаике — AICс).

Наиболее адекватная модель определялась в соответствии с критериями выбора модели (таблица 4).

Таблица 4 - Основные критерии для выбора моделей

| № | Критерии | № | Критерии |
|---|--|---|--|
| 1 | Коэффициент Корреляции Пирсона | 5 | Индекс Согласия |
| | $R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \tilde{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$ | | $D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \tilde{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n \{ y_i - \bar{y} + \tilde{y}_i - \bar{y} \}^2}$ |
| 2 | Скорректированный R-Квадрат | 6 | U-Статистика Тейла |
| | $R^2_{adj} = 1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-p}$ | | $UИ = \sqrt{\frac{ESS}{\sum_{i=1}^n y_i^2}}$ |
| 3 | Среднеквадратическая Ошибка | 7 | Информационный Критерий Акаике |
| | $\sigma_{y/x} = \begin{cases} \sqrt{\frac{ESS}{n-p-1}}, & n \leq 30 \\ \sqrt{\frac{ESS}{n-p}}, & n > 30 \end{cases}$ | | $AIC = \begin{cases} \ln\left(\frac{ESS}{n}\right) + \frac{2p}{n}, & \frac{n}{p} \geq 40 \\ \ln\left(\frac{ESS}{n}\right) + \frac{2p(p+1)}{n-(p+1)}, & \frac{n}{p} < 40 \end{cases}$ |
| 4 | Информационный Критерий Акаике | | |
| | $A = \% 100 \cdot \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left \frac{y_i - \tilde{y}_i}{y_i} \right $ | | |

Большинство этих критериев основано на минимизации остаточной суммы квадратов, то есть:

$$ESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \tilde{y}_i)^2$$

Таким образом, определение начальной скорости ферментативных реакций есть общая задача, с которой приходится часто встречаться на практике [3]

Значение параметров V_{max} , K_M и K_{ESS}

Каков смысл V_{max} , K_M и K_{ESS} ? Смысл максимальной скорости очевиден как теоретически, так и практически. Она представляет собой максимально достижимую скорость, т.е. ту скорость, с которой идет реакция, если весь фермент находится в составе фермент – субстратного комплекса.

Кинетическая постоянная (константа скорости) k_2 в уравнении $V_{max} = k_2[E]_0$ называется *числом оборотов фермента*. Число оборотов – это количество молекул субстрата, превращаемых в продукт в реакции в условиях, когда весь фермент находится в составе фермент – субстратного комплекса.

Например, число оборотов карбоангидразы очень велико, около $6 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$. Число оборотов большинства ферментов находится в интервале между $0,5$ и 10^4 с^{-1} .

К сожалению, на практике константу k_{+2} не всегда удается оценить. Причина состоит в том, что очень трудно получить фермент высокой чистоты, так что $[E]_0$ обычно величина неизвестная.

Значения K_M обычно приводят наряду с V_{max} и k_{+2} как количественный параметр ферментативной реакции. Причина состоит в том, что K_M зависит от pH, температуры, природы субстрата и других факторов (свойств и состава почвы и т.д.). Поэтому ее значение может служить для того, чтобы охарактеризовать конкретную фермент-субстратную систему в определенных условиях.

K_{ESS} – это коэффициент разложения, характеризующий скорость образования неактивного комплекса [ESS], который ингибирует (блокирует) ферментативную реакцию:

Эта константа равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной скорости. Типичные значения K_M – от 10^{-6} до 10^{-1} моль/л.

Определение кинетических параметров Уравнения Михаэлиса-Ментена

Величины V_{max} и K_M обычно находят одним из трёх способов, основанных на преобразовании уравнения Михаэлиса-Ментен к линейному виду, удобному для обработки экспериментальных данных.

Определение величины V_{max} и K_M имеет важное значение при выяснении механизма действия ферментов, также эффекторов (ингибиторов и активаторов) на активность ферментов.

Определение кинетических параметров V_{max} и K_M возможно двумя методами: *графическим* и *статистическим*.

Графический метод. Для определения кинетических параметров V_{max} и K_M уравнение (15) существуют много графических методов. Наиболее распространенные описаны ниже.

В принципе V_{max} и K_M можно определить по графику зависимости v_0 от $[S]_0$ (рис. 2). Так как v_0 асимптотически достигает V_{max} с возрастанием концентрации субстрата $[S]_0$, то затруднительно получить надежную величину V_{max} и K_M (рисунок 4) путем экстраполяции. Другими словами, на практике график зависимости v_0 от $[S]_0$, построенный в прямых координатах по уравнению (15), не очень удобен для определения V_{max} и K_M , так как трудно находить асимптотическое значение V_{max} (рис 2.) при очень высокой концентрации субстрата.

Для удобства расчетов кинетических параметров уравнение (15) можно преобразовать так, чтобы экспериментальные точки лежали на прямой.

Поэтому используются различные, более удобные линеаризации уравнения (15):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0}, \quad \frac{[S]_0}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \cdot [S]_0, \quad v_0 = V_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{[S]_0} \quad (24)$$

Одной из самых удобных среди них оказалась первое уравнение (24). Это уравнение представляет собой прямую линию на графике, по осям которого откладываются не сами числа v_0 и $[S]_0$, а их обратные значения $1/v_0$ и $1/[S]_0$ (координаты Лайнуивера-Берка).

Более точные результаты получают из графиков зависимости $1/v_0$ от $1/[S]_0$. Поэтому данный графический метод нашел широкое применение в современной энзимологии и обычно называется графиком Лайнуивера – Берка или *график двойных обратных координат* ($1/v_0$; $1/[S]_0$).

Статистический метод. Использование ЭВМ. В настоящее время данные ферментативной кинетики обрабатывают быстрее и более объективно с помощью вычислительной техники.

Для определения параметров V_{\max} и K_M , строго говоря, вообще нецелесообразно использовать графический метод. Для этой цели следует на ЭВМ использовать пакет прикладных программ, например, «СТАТИСТИКА», кото-

рая с помощью МНК (метода наименьших квадратов) позволяют найти искомые параметры.

ВЫВОДЫ

1 Изложены классические, современные представления моделирования ферментативных процессов и определения начальной скорости ферментативной реакции графическими и аналитическими методами.

2 Предложен новый метод определения начальных скоростей реакций, катализируемых ферментами;

3 Рекомендованы в моделировании наиболее часто используемые: гиперболический, биномиальный, биномиально-параболический многочлены 5-й и 6-й степени, псевдополиномы 5-й и 6-й степени модели.

4 В отличие от графических методов, предложено использование пакетной программы на ЭВМ для вычисления кинетических параметров.

5 Показана перспективность использования математического моделирования при изучении ферментативных реакций в почве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Michaelis, L. and Menten, M.L. Die Kinetik der Invertinwirkung// Biochem. – 1913. – № 49. – PP. 333-369.
- 2 Briggs G.E., and Haldane J.B.S. A note on the kinetics of enzyme action// Biochem J. – 1925. – PP. 338-339.
- 3 Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа. – Москва: Наука, 1965. – 248 с.
- 4 Tabatabai M. A., Bremner J. M. Michaelis constants of soil enzymes// Soil Biol. Biochem. – 1971. – V 3. - № 4. – PP. 317-323.
- 5 Хазиев Ф.Х., Агафарова Я.М., Константы Михаэлиса почвенных ферментов// Почвоведение. – 1976. – № 8. – С. 150-157.
- 6 Асеева И.В., Паников Н. С. Кинетика ферментативных процессов распада нуклеиновых кислот в почве/ В кн.: Экологические условия и ферментативная активность почв. – Уфа, 1979. – С. 112-125.

- 7 Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1979. – 280 с.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 Келети Т. Основы ферментативной кинетики. – Москва: Мир, 1990. – 352 с.
- 11 Курский М.Д., Костерин С.А., Рыбальченко В.К. Биохимическая кинетика. – Киев: Вища школа, 1977. – 261 с.
- 12 Kussainova, M., Er, F., Mikailsoy, F. Assessment of the basic kinetic of catalase in the soil (Province of Konya, Turkey)// The 10th Int Soil Science Congress on “Environment and Soil Resources Conservation”. – Almaty, 2018. – PP. 110–117.
- 13 Микайылов Ф. Оценка основных кинетических параметров каталазы в почве// Живые и биокосные системы. – 2018. 25(3). – С. 1–7.
- 14 Хазиев Ф.Х. О кинетике ферментативных процессов в почвах// Известия Уфимского Научного Центра РАН. – 2018. – № 3. – С. 45–51.
- 15 Yun K.I., Han T.S. Relationship between enzyme concentration and Michaelis constant in enzyme assays// Biochimie. – 2020. – P. 12–20.
- 16 Yano D., Suzuki T. Kinetic analyses of the substrate inhibition of paramecium arginine kinase// Protein J. – 2018. – 37. P. 581–588.
- 17 Cornish-Bowden, A. The origins of enzyme kinetics// FEBS Letters. – 2013. – P. 2725–2730.
- 18 Микайылов Ф.Д., Хабилов И.К. Некоторые вопросы моделирования ферментативных процессов в почве// Почва как связующее звено функционирования природных и антропогенно-преобразованных экосистем: матер. III Междунар. науч. – прак. конф. – Иркутск, 2011. – С. 166–171.
- 19 Kizilkaya R, Samofalova I, Mudrykh N, Mikailsoy F, Akça I, 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. P. 976 – 983.
- 20 Хазиев Ф.Х. Ферментативная активность почв. – М.: Наука, 1976. – 180 с.
- 21 Хазиев Ф.Х. Особенности динамики ферментативной активности черноземов в Предуралье// Почвоведение. – 1977. – № 10. – С. 114–125.
- 22 Хазиев Ф.Х. Системно-экологический анализ ферментативной активности почв. – М.: Наука, 1982. – 204 с.
- 23 Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. – 254 с.
- 24 Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. – М.: Изд-во АН СССР, 1958. – 464 с.
- 25 Козлов К.А. Биологическая активность почвы// Известия АН СССР. Сер. биол. наук. – 1966. – № 5. – С. 719–733.
- 26 Кацнельсон Р.С., Ершов В.В. Исследование микрофлоры целинных и окультуренных почв Карельской АССР// Биологическая активность почв КАСР/ (Микробиология. – 1958. – Т. 27. – Вып. 1. – С. 82–88.
- 27 Галстян А.Ш. Ферментативная активность почв Армении. – Ереван: Айастан, 1974. – Вып. 8. – 275 с.
- 28 Пейве Я.В. Биохимия почв. – М.: Сельхозгиз, 1961, – 422 с.
- 29 Галстян А.Ш. Об инактивации ферментов почв// Докл. АН АрмССР. – 1965а. – Т.40, – № 1. – С. 39–42.

- 30 Звягинцев Д.Г. Имобилизованные ферменты в почвах// В кн.: Микробные метаболиты. – М.: Изд-во МГУ, 1979. – С. 31–46.
- 31 Дробник Я. Расщепление крахмала энзиматическим комплексом почв// *Folia biologica*. – 1955. – Т. 1. – № 6. – С. 24–40.
- 32 Hoffmann E., und Seegerer A. Über das Enzymsystem unserer Kulturböden. I: Saccharase// *Biochem. Ztschr.* –1951. – Bd. 322. – Nr. 1. – S. 174–179.
- 33 Kiss St. Ujabb adatok a talajszaharaz es a talaj- α -glukozidaz (β -maltaz) azonossagiaval szemben// *Stud. Univ. Babcs-Bolyai. Scr. bot.* - 1958. - Vol. 3. - № 7. P. 51–55.
- 34 Купревич В.Ф. Внеклеточные ферменты корней высших автотрофных растений // *ДАН СССР*. – 1949. – Т. 68. – № 5. – С. 953–956.
- 35 Купревич В.Ф. Биологическая активность почвы и методы ее определения// *Доклады АН СССР*. – 1951. – Т. 79. – № 5. – С. 863–866.
- 36 Галстян А.Ш. Изучение сравнительной активности каталазы в некоторых типах почв Армении// *Доклады АН АрмССР*. – 1956. – Т.23. - №2. – С. 62–65.
- 37 Runov, E.V., and Terekhov, O.S. The question of the catalase activity of several forest soils// *Soviet Soil Sci.* – 1960. – № 9. – P. 974–978.
- 38 Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. – М.: Мир, 1982. – Т. 1-3. – 1120 с.
- 39 Johnson, J. L. and Temple. K.L. Some variables affecting measurement of 'catalase activity' in soil// *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* – 1964. – № 28. – P. 207–209.
- 40 Купревич В. Ф., Щербакова Т.А. Почвенная энзимология. – Минск: Наука и техника, 1966. – 275 с.
- 41 Beck T.H. The determination of catalase activity in soils// *J. Plant Nutr. Soil Sci.* – 1971. –№ 130. – P. 68–81.
- 42 Burns R.G. Enzyme activity in soils: some theoretical and practical considerations// In: *Soil Enzymes* (Eds: R.G. Burns). – London, Academic Press, 1978. – P. 295–326.
- 43 Alef K. and Nannipieri P. Catalase activity// *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. – London: Academic Press. – 1995. – P. 362–363.
- 44 Галстян А.Ш. Унификация методов определения активности ферментов почв// *Почвоведение*. – 1978. –№ 2. – С. 107–114.
- 45 Инишева Л.И., Ивлева С.Н., Щербакова Т.А. Руководство по определению ферментативной активности торфяных почв и торфов. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2002. – 119 с.
- 46 Галстян А.Ш. Роль ферментов в процессах образования соды в почве// *Почвоведение*. – 1967. – № 5. – С. 89–96.
- 47 Сингх И., Саха С.К., Де С.К. Активность каталазы α -гумуса аллювиальной почвы в присутствии солей Ca, N, P, K.//*Почвоведение*. – 1982. – № 11. – С. 101–103.
- 48 Henri V. Theorie generale de l'action de quelques diastases// *CR Hebd. Seances Acad. Sci.* – 1902. – P. 916–919.
- 49 Brown A.J. Enzyme action// *J. Chem. Soc.* –1902. –81. – PP. 373–388.
- 50 Henri V. Lois générales de l'action des diastases, Librairie Scientifique A. Hermann. – Paris, 1903. – 129 p.
- 51 Жирякова М.В., Тифлова Л.А., Белова В.М., Скокан Е.В. Исследование кинетики ферментативной реакции. – М.: Изд-во, Хим фак. МГУ, 2020. – 30 с.
- 52 Огурцов А. Н. Физико-химические основы биотехнологии. Биокинетика. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2017. – 368 с.

- 53 Байрамов В.М. Основы химической кинетики и катализа. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 256 с.
- 54 Koshland DE Jr, Nemethy G, Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits// *Biochemistry*. – 1966. – №5. – P. 365–385.
- 55 Goldbeter A., Koshland DE Jr. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems// *Proc Natl Acad Sci*. – 1981. – № 78. – P. 6840–6844.
- 56 Рубин А. Б., Пытьева Н. Ф., Ризниченко Г. Ю. Кинетика биологических процессов: Учеб. пособие. – 2-е изд. – М.: Изд-во МГУ, 1977. – 328 с.
- 57 Березин И. В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 320 с.
- 58 Колинко П.А., Козлов Д. В. Химическая кинетика в курсе физической химии. –Новосибирск: Нов Гос. Унив., 2013. – 99 с.
- 59 Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. – М. : Высшая школа, 1977. – 280 с.
- 60 Романовский, Ю.М., Степанова, Н.В., Чернавский, Д.С. Математическая биофизика. – М.: Наука, Главная редакция физико-математической литературы, 1984. – 304 с.
- 61 Haldane J.B.S. *Enzymes*– London, Longmans Green, 1930. – PP. 28–53, 74–92.
- 62 Lineweaver, H., Burk, D. The determination of enzyme dissociation constants// *J Am Chem Soc*. – 1930. – № 56(3). – PP. 658–666.
- 63 Yano T., Nakahara T., Kamiyama S., Yamada K. Kinetic studies on microbial activities in concentrated solutions. I. Effect of excess sugars on oxygen uptake rate of a cell-free respiratory system//*Agricultural and Biological Chemistry*. – 1966. – №30. – PP. 43-48.
- 64 Wang J.L., Wan W. The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models// *Science in China Series B: Chemistry*. – 2008. –№ 51(11). – PP. 1110–1117.
- 65 Tazdait D., Abdi N., Grib H., Lounici H., Pauss A., Mameri N. Comparison of different models of substrate inhibition in aerobic batch biodegradation of malathion// *Turk. J. Eng. Environ. Sci*. – 2013. –№ 37. – PP. 221–230.
- 66 Карахим С. А. Об истинных и кажущихся константах Михаэлиса в энзимологии. I. Отличительные признаки// *Укр. біохімі. журн*. – 2011. – Т. 83. - № 5. – С. 94–109.
- 67 Reed M.C., Lieb A, Nijhout H.F. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions// *Bioessays*. – 2010. - PP. 422–429.
- 68 Fromm H.J. Summary of kinetic reaction mechanisms// *Methods in Enzymology*. – 1979. – V. 63. – PP. 42 – 53.
- 69 Tuşat E., Mikailsoy F. An investigation of the criteria used to select the polynomial model employed in local GNSS/ leveling geoid determination studies// *Arabian J. Geosciences*. – 2019. –№ 8(24). – PP. 801.

REFERENCES

- 1 Michaelis, L. and Menten, M.L. Die Kinetik der Invertinwirkung// *Biochem*. – 1913. – № 49. – RR. 333-369.
- 2 Briggs G.E., and Haldane J.B.S. A note on the kinetics of enzyme action// *Biochem J*. – 1925. – RR. 338–339.

- 3 Yakovlev V.A. Kinetika fermentativnogo kataliza. – Moskva: Nauka, 1965. – 248 s.
- 4 Tabatabai M. A., Bremner J. M. Michaelis constants of soil enzymes// Soil Biol. Biochem. – 1971. – V 3. - № 4. – PP. 317–323.
- 5 Khaziyev F.Kh., Agafarova Ya.M., Konstanty Mikhaelisa pochvennykh fermentov// Pochvovedeniye. – 1976. – № 8. – S. 150–157.
- 6 Aseyeva I.V., Panikov N. S. Kinetika fermentativnykh protsesov raspada nukleinykh kislot v pochve/ V kn.: Ekologicheskiye usloviya i fermentativnaya aktivnost pochv. – Ufa, 1979. – S. 112–125.
- 7 Kornish-Bouden E. Osnovy fermentativnoy kinetiki. – M.: Mir, 1979. – 280 s.
- 8 Aliyev S. A., Gadzhiyev D. A., Mikayylov F. D. Kineticheskiye pokazateli aktivnosti katalazy v osnovnykh tipakh pochv Azerbaydzhanskoj SSR// Pochvovedeniye. – 1981. – № 9. – S. 107–112.
- 9 Aliyev S. A., Gadzhiyev D. A., Mikayylov F. D. Kineticheskiye i termodinamicheskiye kharakteristiki fermentov invertazy i ureazy v pochvakh Azerbaydzhanskoj SSR// Pochvovedeniye.– 1984. – № 11. – S. 55–66.
- 10 Keleti T. Osnovy fermentativnoy kinetiki. – Moskva: Mir, 1990. – 352 s.
- 11 Kursky M.D., Kosterin S.A., Rybalchenko V.K. Biokhimicheskaya kinetika. – Kiyev: Vishcha shkola, 1977. – 261 s.
- 12 Kussainova, M., Er, F., Mikailsoy, F. Assessment of the basic kinetic of catalase in the soil (Province of Konya, Turkey)// The 10th Int Soil Science Congress on “Environment and Soil Resources Conservation”. – Almaty, 2018. – PP. 110–117.
- 13 Mikayylov F. Otsenka osnovnykh kineticheskikh parametrov katalazy v pochve// Zhivye i biokosnye sistemy. – 2018. 25(3). – C. 1–7.
- 14 Khaziyev F.Kh. O kinetike fermentativnykh protsessov v pochvakh// Izvestiya Ufimskogo Nauchnogo Tsentra RAN. – 2018. – № 3. – S. 45–51.
- 15 Yun K.I., Han T.S. Relationship between enzyme concentration and Michaelis constant in enzyme assays// Biochimie. – 2020. – P. 12–20.
- 16 Yano D., Suzuki T. Kinetic analyses of the substrate inhibition of paramecium arginine kinase// Protein J. – 2018. – 37. P. 581–588.
- 17 Cornish-Bowden, A. The origins of enzyme kinetics// FEBS Letters. – 2013. – P. 2725–2730.
- 18 Mikayylov F.D., Khabirov I.K. Nekotorye voprosy modelirovaniya fermentativnykh protsessov v pochve// Pochva kak svyazuyushcheye zveno funktsionirovaniya prirodnykh i antropogenno-preobrazovannykh ekosistem: mater. III Mezhdunar.nauch. – prak. konf. – Irkutsk, 2011. – S. 166–171.
- 19 Kizilkaya R, Samofalova I, Mudrykh N, Mikailsoy F, Akça I, 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. P. 976 – 983.
- 20 Khaziyev F.Kh. Fermentativnaya aktivnost pochv. – M.: Nauka, 1976. – 180 s.
- 21 Khaziyev F.Kh. Osobennosti dinamiki fermentativnoy aktivnosti chernozemov v Preduralye// Pochvovedeniye. – 1977. – № 10. – S. 114–125.
- 22 Khaziyev F.Kh. Sistemno-ekologichesky analiz fermentativnoy aktivnosti pochv. – M.: Nauka, 1982. – 204 s.
- 23 Khaziyev F.Kh. Metody pochvennoy enzimologii. – M.: Nauka, 2005. – 254 s.
- 24 Krasilnikov N.A. Mikroorganizmy pochvy i vysshiye rasteniya. – M.: Izd-vo AN SSSR, 1958. – 464 s.
- 25 Kozlov K.A. Biologicheskaya aktivnost pochvy// Izvestiya AN SSSR. Ser. biol. nauk. – 1966. – № 5. – S. 719–733.

- 26 Katsnelson R.S., Yershov V.V. Issledovaniye mikroflory tselinnykh i okulturennykh pochv Karelskoy ASSR// Biologicheskaya aktivnost pochv KASSR/ (Mikrobiologiya. - 1958. - T. 27. - Vyp. 1. - S. 82-88.
- 27 Galstyan A.Sh. Fermentativnaya aktivnost pochv Armenii. - Yerevan: Ayastan, 1974. - Vyp. 8. - 275 s.
- 28 Peyve Ya.V. Biokhimiya pochv. - M.: Selkhozgiz, 1961, - 422 s.
- 29 Galstyan A.Sh. Ob inaktivatsii fermentov pochv//Dokl. AN ArmSSR. - 1965a. - T.40, -№ 1. - S. 39-42.
- 30 Zvyagintsev D.G. Immobilizovannyye fermenty v pochvakh// V kn.: Mikrobnyye metabolity. - M.: Izd-vo MGU, 1979. - S. 31 -46.
- 31 Drobnik Ya. Rasshchepleniye krakhmala enzimaticheskim kompleksom pochv// Folia biologica. - 1955. - T. 1. - № 6. - S. 24-40.
- 32 Hoffmann Ye., und Seegerer A. Über das Enzymsystem unserer Kulturböden. I: Saccharase// Biochem. Ztschr. -1951. - Bd. 322. - Nr. 1. - S. 174-179.
- 33 Kiss St. Ujabb adatok a talajszaharaz es a talaj- α -glukozidaz (β -maltaz) azonosagiaval szemben// Stud. Univ. Babcs-Bolyai. Scr. bot. - 1958. - Vol. 3. - № 7. P. 51-55.
- 34 Kuprevich V.F. Vnekletochnye fermenty korney vysshikh avtotrofnykh rasteny // DAN SSSR. - 1949. - T. 68. - № 5. - S. 953-956.
- 35 Kuprevich V.F. Biologicheskaya aktivnost pochvy i metody eye opredeleniya// Doklady AN SSSR. - 1951. - T. 79. - № 5. - S. 863-866.
- 36 Galstyan A.Sh. Izucheniye sravnitelnoy aktivnosti katalazy v nekotorykh tipakh pochv Armenii// Doklady AN ArmSSR. - 1956. - T.23. - №2. - S. 62-65.
- 37 Runov, E.V., and Terekhov, O.S. The question of the catalase activity of several forest soils// Soviet Soil Sci. - 1960. - № 9. - P. 974-978.
- 38 Dikson M., Uebb E. Fermenty. - M.: Mir, 1982. - T. 1-3. - 1120 s.
- 39 Johnson, J. L. and Temple. K.L. Some variables affecting measurement of 'catalase activity' in soil// Soil Sci. Soc. Am. Proc. - 1964. - № 28. - P. 207-209.
- 40 Kuprevich V. F., Shcherbakova T.A. Pochvennaya enzimologiya. - Minsk: Nauka i tekhnika, 1966. - 275 s.
- 41 Beck T.H. The determination of catalase activity in soils// J. Plant Nutr. Soil Sci. - 1971. -№ 130. - P. 68-81.
- 42 Burns R.G. Enzyme activity in soils: some theoretical and practical considerations// In: Soil Enzymes (Eds: R.G. Burns). - London, Academic Press, 1978. - P. 295-326.
- 43 Alef K. and Nannipieri P. Catalase activity// Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. - London: Academic Press. - 1995. - R. 362-363.
- 44 Galstyan A.Sh. Unifikatsiya metodov opredeleniya aktivnosti fermentov pochv// Pochvovedeniye. - 1978. -№ 2. - C. 107-114.
- 45 Inisheva L.I., Ivleva S.N., Shcherbakova T.A. Rukovodstvo po opredeleniyu fermentativnoy aktivnosti torfyanykh pochv i torfov. - Tomsk: Izd-vo Tom. un-ta, 2002. - 119 s.
- 46 Galstyan A.Sh. Rol fermentov v protsessakh obrazovaniya sody v pochve// Pochvovedeniye. - 1967. - № 5. - S. 89-96.
- 47 Singkh I., Sakha S.K., De S.K. Aaktivnost katalazy α -gumusa allyuvialnoy pochvy v prisutstvii soley Ca, N, R, K.//Pochvovedeniye. - 1982. - № 11. - C. 101-103.
- 48 Henri V. Theorie generale de l'action de quelques diastases// CR Hebd. Seances Acad. Sci. - 1902. - P. 916-919.

- 49 Brown A.J. Enzyme action// J. Chem. Soc. –1902. –81. – PP. 373–388.
- 50 Henri V. Lois générales de l'action des diastases, Librairie Scientifique A. Hermann. – Paris, 1903. – 129 p.
- 51 Zhiryakova M.V., Tiflova L.A., Belova V.M., Skokan Ye.V. Issledovaniye kinetiki fermentativnoy reaktsii. – M.: Izd-vo, Khim fak. MGU, 2020. – 30 s.
- 52 Ogurtsov A. N. Fiziko-khimicheskiye osnovy biotekhnologii. Biokinetika . – Kharkov: NTU «KhPI», 2017. – 368 s.
- 53 Bayramov V.M. Osnovy khimicheskoy kinetiki i kataliza. – M.: Izdatelsky tsentr «Akademiya», 2003. – 256 s.
- 54 Koshland DE Jr, Nemethy G, Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits// Biochemistry. – 1966. – №5. – R. 365–385.
- 55 Goldbeter A., Koshland DE Jr. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems// Proc Natl Acad Sci. – 1981. – № 78. – R. 6840–6844.
- 56 Rubin A. B., Pytyeva N. F., Riznichenko G. Yu. Kinetika biologicheskikh protsessov: Ucheb. posobiye. – 2-e izd. – M.: Izd-vo MGU, 1977. – 328 s.
- 57 Berezin I. V., Klesov A.A. Praktichesky kurs khimicheskoy i fermentativnoy kinetiki. – M.: Izd-vo MGU, 1976. – 320 s.
- 58 Kolinko P.A., Kozlov D. V. Khimicheskaya kinetika v kurse fizicheskoy khimii. – Novosibirsk: Nov Gos. Univ., 2013. – 99 s.
- 59 Berezin I.V., Martinek K. Osnovy fizicheskoy khimii fermentativnogo kataliza. – M. : Vysshaya shkola, 1977. – 280 s.
- 60 Romanovsky, Yu.M., Stepanova, N.V., Chernavsky, D.S. Matematicheskaya biofizika. – M.: Nauka, Glavnaya redaktsiya fiziko-matematicheskoy literatury, 1984. – 304 s.
- 61 Haldane J.B.S. Enzymes– London, Longmans Green, 1930. – PP. 28–53, 74–92.
- 62 Lineweaver, H., Burk, D. The determination of enzyme disso-ciation constants// J Am Chem Soc. – 1930. – № 56(3). – PP. 658–666.
- 63 Yano T, Nakahara T, Kamiyama S., Yamada K. Kinetic studies on microbial activities in concentrated solutions. I. Effect of excess sugars on oxygen uptake rate of a cell-free respiratory system//Agricultural and Biological Chemistry. – 1966. – №30. – PP. 43-48.
- 64 Wang J.L., Wan W. The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models// Science in China Series B: Chemistry. – 2008. –№ 51 (11). – PP. 1110–1117.
- 65 Tazdaït D., Abdi N., Grib H., Lounici H., Pauss A., Mameri N. Comparison of different models of substrate inhibition in aerobic batch biodegradation of malathion// Turk. J. Eng. Environ. Sci. – 2013. –№ 37. – PP. 221–230.
- 66 Karakhim S. A. Ob istinnykh i kazhushchikhsya konstantakh Mikhaelisa v enzimo logii. I. Otlichitelnye priznaki// Ukr. biokhim. zhurn. – 2011. – T. 83. - № 5. – S. 94–109.
- 67 Reed M.C., Lieb A, Nijhout H.F. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions// Bioessays. – 2010. - PP. 422–429.
- 68 Fromm H.J. Summary of kinetic reaction mechanisms// Methods in Enzymology. – 1979. – V. 63. – PP. 42 – 53.
- 69 Tuşat E., Mikailsoy F. An investigation of the criteria used to select the polynomial modelsemployed in local GNSS/ leveling geoid determination studies// Arabian J. Geosciences. – 2019. –№ 8(24). – PP. 801.

ТҮЙІН

Ф.Д. Микаилсой¹

САЗДЫ ТОПЫРАҚТАҒЫ КАТАЛАЗА РЕАКЦИЯСЫНА СУБСТРАТТЫҢ ЖОҒАРЫ КОНЦЕНТРАЦИЯСЫНЫҢ ӘСЕРІ (ИГДЫР ПРОВИНЦИЯСЫ, ТҮРКИЯ)

I. ТОПЫРАҚТАҒЫ ФЕРМЕНТАТИВТІ РЕАКЦИЯЛАР КИНЕТИКАСЫНЫҢ ТЕОРИЯЛЫҚ НЕГІЗДЕРІ

¹"Игдыр" университетінің ауылшаруашылық факультеті, 76000, Игдыр, Шехит Бүлент Юртсевен кампусы, Түркия, e-mail: fariz.mikailsoy@igdir.edu.tr

Жұмыста ферментативті процестерді модельдеудің классикалық және заманауи көріністері және графикалық және аналитикалық әдістермен ферментативті реакцияның бастапқы жылдамдығын анықтау сипатталған. Топырақтағы ферментативті реакцияның бастапқы жылдамдығын анықтау әдістері келтірілген. Ньютон-Грегоридің аналитикалық әдісінен айырмашылығы бар ферменттермен катализделген реакциялардың бастапқы жылдамдығын анықтаудың жаңа әдісі ұсынылады. Осы мақсатта модельдеудің ең көп қолданылатындары: гиперболалық, биномдық, биномдық-параболалық көпмүшелер 5-ші және 6-шы дәрежелі, псевдополиномалар 5-ші және 6-шы дәрежелі модельдер ұсынылады. Кинетикалық параметрлерді есептеу үшін компьютерде пакеттік бағдарламаны пайдалану ұсынылады. Топырақтағы ферментативті реакцияларды зерттеуде математикалық модельдеуді қолданудың болашағы көрсетілген.

Түйінді сөздер: топырақ, ферментативті реакция, бастапқы жылдамдық, субстраттың тежелуі, модельдеу.

SUMMARY

F.D. Mikailsoy¹

INFLUENCE OF HIGH SUBSTRATE CONCENTRATIONS ON CATALASE REACTION IN LOAM SOIL (YGDİR PROVINCE, TURKEY)

I. THEORETICAL FOUNDATIONS OF THE KINETICS OF ENZYMATIC SOIL REACTIONS

Faculty of Agriculture of the University "Iğdır", Department of Soil Science and Plant Nutrition, 76000, Şehit Bulent Yurtseven Campus, Iğdır, Turkey, e-mail: fariz.mikailsoy@igdir.edu.tr

The paper presents classical and modern concepts of modeling enzymatic processes and determining the initial rate of an enzymatic reaction by graphical and analytical methods. Methods for determining the initial rate of the enzymatic reaction in soils are given. In contrast to the Newton-Gregory analytical method, a new method is proposed for determining the initial rates of reactions catalyzed by enzymes. For this purpose, the most commonly used in modeling are recommended: hyperbolic, binomial, binomial-parabolic polynomials of the 5th and 6th degree, pseudopolynomials of the 5th and 6th degree of the model. It is proposed to use a batch program on a computer to calculate the kinetic parameters. The prospects of using mathematical modeling in the study of enzymatic reactions in soil are shown.

Key words: soil, enzymatic reaction, initial rate, substrate inhibition, modeling.

СВЕДЕНИЕ ОБ АВТОРЕ

Микаилсой Фариз Дуниялыюглу - доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры почвоведения и питания растений, e-mail: fariz.mikailsoy@igdir.edu.tr