第17卷第1期　　西北农业大学学报　　Vol.17.No.1
1989年3月　　Acta Univ.Septentrionali Occident.Agric.　　Mar.,1989

陕西几种土壤过氧化氢酶的[1)]动力学和热力学特征

朱铭莪　　白红英[2)]　　代　伟[3)]

（农化系）

摘　要

研究结果表明：供试六个土样的米氏常数，最大速度和最大速度/米氏常数，均有差异。各土壤过氧化氢酶的活化能也明显不同。活化焓差别较大，说明各土壤过氧化氢酶形成活化络合物时，底物与酶活性中心在应变和扭曲强度上的差异。活化熵皆为负值，表明活化络合物形成时体系的有序性增加。活化自由能为正值，各土样差异较小。黄棕壤过氧化氢酶的各参数较为特殊。

关键词：土壤；过氧化氢酶；活化能；焓；熵；自由能

热力学原理和方法由于不受体系的结构和过程机理的局限，因而对研究土壤酶促反应这个复杂体系是非常有利的。所以近年来国外已有一些运用动力学和热力学原理研究土壤酶促反应特征的报道[1-5]。本文旨在研究陕西几种土壤的过氧化氢酶酶促反应速度对底物浓度和温度的依赖关系，探讨该酶在不同土壤生态环境中的动力学和热力学特征。

1 材料与方法

供试土样：同期采样，深度0～20cm。新鲜样4～6℃保存五个月。分析前取出风干，过1mm筛，备用。

方法：过氧化氢酶活性用Галстян气量法[6]测定。样品于不同温度（10，20，30，40℃）和不同浓度的底物（0.44，0.88，1.76，3.53及5.29M）下进行反应，按反应时间10，20，30，40，50及60s读数。每个土样各处理均重复5次，灭活对照重复3次，以便消除土壤中非酶活性的影响。

测定前将盛有土样的反应瓶置恒温箱中，在选定温度下放置2小时，然后置于同一温度

本文于1987年11月5日收到。

1）系张君常教授主持的中科院自然科学基金资助课题的一部分。

2）现在中科院西北水保所工作。

3）现在北京林学院工作。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的恒温振荡器中，频率340-360r/min进行测定。

数据处理：所得数据按下述公式作图求Michaelis-Menten常数(K_m)与最大速度(V_{max})。

$$\frac{1}{V_0}=\frac{K_m}{V_{max}}\cdot\frac{1}{[S]}+\frac{1}{V_{max}}$$

式中V_0为速度；S为底物浓度。反应速度常数（k）根据化学动力学一级反应式计算[5,7]。

$$k=\frac{2.303}{t}\log\frac{a}{a-x}$$

式中：a——最大放氧量；x——时间t时的放氧量。

活化能（Ea）由Arrhenius直线方程[8]作图求得；活化焓（$\Delta H^{\neq}$），活化熵（$\Delta S^{\neq}$）和活化自由能（$\Delta G^{\neq}$）分别按下列方程[9]获得。

$$\Delta H^{\neq}=Ea-RT \qquad \Delta S^{\neq}=\left[\ln\frac{knh}{RT}+\frac{\Delta H^{\neq}}{RT}\right]R$$

$$\Delta G^{\neq}=\Delta H^{\neq}-T\Delta S$$

式中：T——绝对温度；N——阿伏伽德罗常数；h——布朗克常数；R——气体常数。

2　结果与讨论

2.1　不同土壤过氧化氢酶动力学特征

测定了六个土样于不同温度、不同底物浓度下过氧化氢酶反应的初速度，并绘出初速度与底物浓度的关系曲线（图1），以$\frac{1}{V_0}$对$\frac{1}{S}$求直线回归的斜率和截距算出动力学参数K_m，V_{max}和V_{max}/K_m，结果见表1。图1显示出各土壤过氧化氢酶在本研究测试条件下的初速度是底物浓度的函数。随着过氧化氢酶浓度的提高，放氧量相应增大，逐渐趋于一个最大值，这一结果与Апиев等[3]的资料基本一致。而且底物浓度对各土壤过氧化氢酶反应初速度的影响有明显的不同。红油土、垆土的过氧化氢酶反应初速度随过氧化氢浓度的提高而迅速增加；黄棕壤增加较慢；黄泥巴、长武粘黑垆土和永寿粘黑垆土在30～40℃，底物浓度3.53M时为极限值，过氧化氢浓度继续提高时，反应速度不再增加。

已有资料指出，K_m是酶—基质复合体牢固性的量度，当K_m值小时酶与基质结合强，K_m值大时结合弱；V_{max}是总酶量的量度，又可表征酶—基质复合物分解为酶和产物的速度。因此一些学者认为，对土壤来讲，V_{max}是实现某种酶过程的土壤潜在能力的容量指标[4]。由本资料（表1）可知，各温度下黄棕壤的K_m最低，黄泥巴、红油土较高。说明黄棕壤的过氧化氢酶与基质结合较强，黄泥巴、红油土则差一些。但是红油土的V_{max}最高，即从酶的总量来讲红油土最多，黄棕壤显然最少。

有些学者认为[3]，在较大范围内V_{max}/K_m是酶反应速度最重要的指标。六个供试土样的V_{max}/K_{max}值也是红油土最大，黄棕壤最小。

表1还表明：供试土壤过氧化氢酶的V_0，V_{max}和V_{max}/K_m值随温度的升高而增大；在不同底物浓度下，温度与V_0的相关系数分别是0.768，0.781，0.751，0.740及0.697($n=24$)达极显著相关；温度与V_{max}，V_{max}/K_m的相关系数是0.656，0.772($n=24$)也达极显著水

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

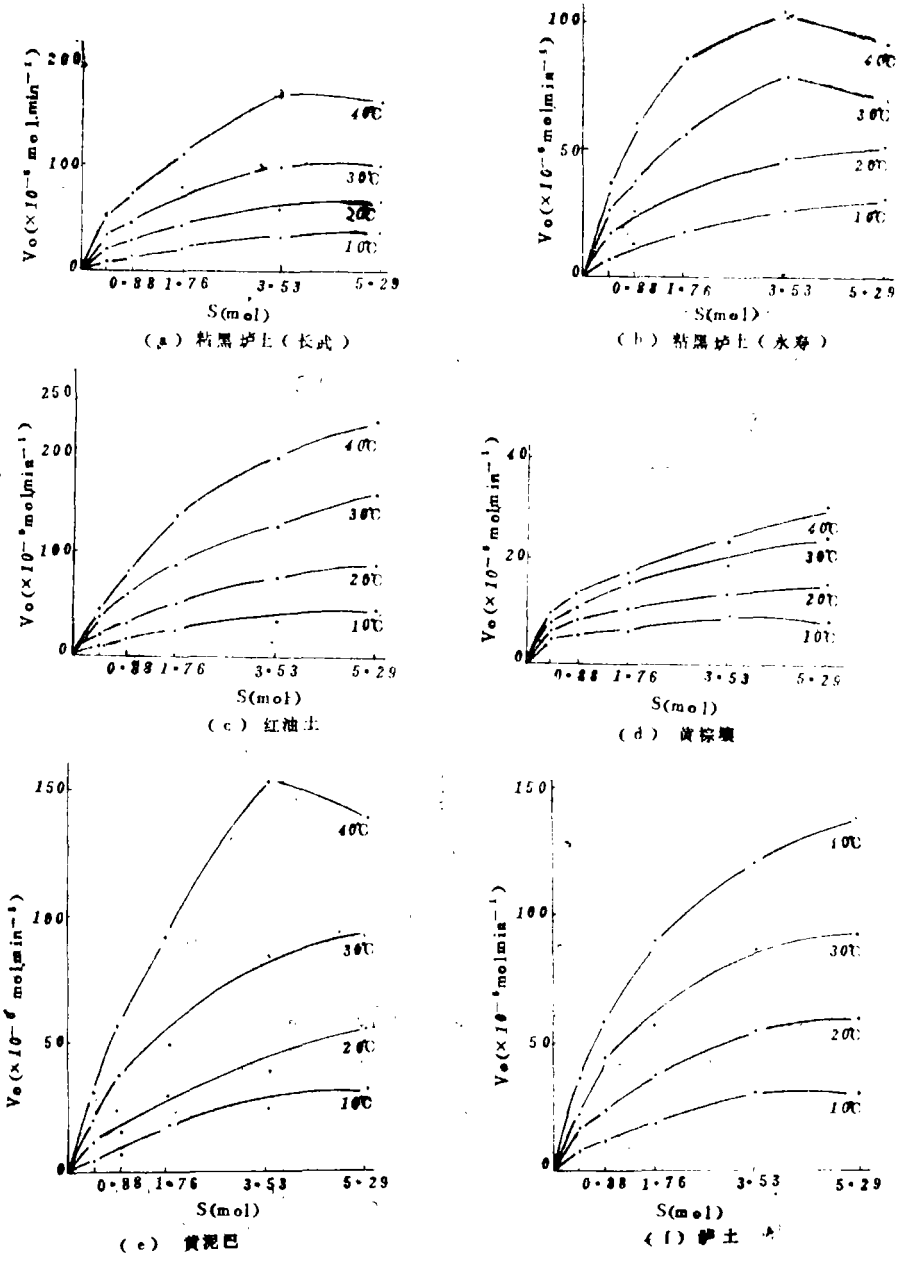

图1 初速度与底物浓度的关系曲线

准。V_0，V_{max}和V_{max}/K_m随温度变化的幅度因土壤而异。黄棕壤的V_{max}，V_{max}/K_m值在温度由10℃增加到40℃时其变化较少，分别仅有3.3和1.34倍，其他土样相对高些。

K_m未发现随温度有规律性的变化。其相关系数亦不显著（$n=24$，$r=-0.15$）。

上述分析结果表明：黄棕壤的过氧化氢酶比较特殊，它的酶总量比其他土壤低，并与底

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表1　不同温度下各土壤过氧化氢酶的动力学参数

土壤	Km (m mol)				Vmax(m mol/min)				Vmax/Km			
	10℃	20℃	30℃	40℃	10℃	20℃	30℃	40℃	10℃	20℃	30℃	40℃
粘黑垆土(长武)	3.31	1.28	1.70	1.49	0.64	0.79	1.49	2.22	0.19	0.62	0.88	1.49
粘黑垆土(永寿)	2.56	0.97	1.17	1.09	0.48	0.56	0.95	1.32	0.19	0.58	0.81	1.21
垆　土	1.82	1.50	2.13	1.65	0.42	0.75	1.41	1.75	0.23	0.50	0.66	1.06
红油土	2.80	2.00	1.72	3.48	0.72	1.18	1.89	4.00	0.26	0.59	1.10	1.15
黄棕壤	0.40	0.64	1.21	0.96	0.09	0.16	0.28	0.30	0.23	0.25	0.23	0.31
黄泥巴	5.34	1.79	2.30	3.88	0.65	0.62	1.35	3.05	0.12	0.35	0.59	0.78

物结合紧密，较为稳定。

2.2　不同土壤过氧化氢酶反应的活化能

表2　过氧化氢酶的反应速度常数及活化能

土　壤	反应速度常数 (K) $\times 10^{-2}$				活化能 (Ea) $J \cdot mol^{-1}$
	283K	293K	303K	313K	
粘黑垆土（长武）	1.79	1.88	1.93	2.02	3.2×10^3
粘黑垆土（永寿）	1.83	1.86	1.87	2.03	2.8×10^3
垆　土	1.87	1.88	1.89	2.00	1.7×10^3
红油土	1.84	1.77	1.88	1.97	1.6×10^3
黄棕壤	1.59	1.93	1.81	1.75	$1.3\times10^4/-3.6\times10^3$
黄泥巴	1.71	1.76	1.81	1.89	2.7×10^3

表2资料表明：各土壤的速度常数随温度升高而增大，符合温度影响速度常数的一般规律[9]。当温度由283-293K时，黄棕壤的K值有个较大变化，增加了0.34×10^{-2}；温度继续上升，K值又呈现下降趋势。

土壤过氧化氢酶的活化能，可以表征酶反应速度[5]；活化能愈低催化速度愈快。各土壤的过氧化氢酶的活化能有明显差异，并依红油土、垆土、黄泥巴、永寿粘黑垆土，长武粘黑垆土的顺序递增。黄棕壤以Arrhenius图求得293～313K的活化能是负值，但在283～293K时用Arrhenius方程：

$$Ea=4.57\log k_{10}\frac{T_1T_2}{T_2-T_1}$$

求得活化能值为1.3×10^4，与同温度下其他土壤相比高出近一个数量级。这表明在283～393K时黄棕壤的过氧化氢酶比其他土壤需要更高的能量才能使反应进行。

2.3　各土壤过氧化氢酶反应的热力学参数

活化自由能$\Delta G^{\neq}$是使反应物达到过渡态所需要的自由能[10]。表3指出，各土壤的$\Delta G^{\neq}$均为正值，且差异较小，并随温度提高有所增加。高的活化焓显示过渡态形成必须具有强的应

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表3 过氧化氢酶反应的热力学参数

土壤	温度 (K)	$\Delta H^{\neq}$ ($J \cdot mol^{-1}$)	$\Delta S^{\neq}$ ($J \cdot mol^{-1} deg^{-1}$)	$\Delta G^{\neq}$ ($J \cdot mol^{-1}$)
粘黑垆土(长武)	283	891.0	-274.5	78574.5
	293	808.0	-274.8	81324.4
	303	724.0	-275.2	84109.6
	313	640.0	-275.4	86840.2
粘黑垆土(永寿)	283	477.0	-275.8	78528.4
	293	393.0	-276.3	81348.9
	303	310.0	-276.8	84180.4
	313	226.0	-276.7	86833.1
垆 土	283	-607.0	-279.4	78463.2
	293	-690.0	-279.9	81320.7
	303	-774.0	-280.3	84156.9
	313	-858.0	-280.3	86875.9
红 油 土	283	-770.0	-280.1	78498.3
	293	-854.0	-280.8	81449.7
	303	-937.0	-280.9	84175.7
	313	-1021.0	-280.9	86900.7
黄 棕 壤	283	10647.0	-241.0	78850.0
	293	10564.0	-241.2	81235.6
	303	—	—	—
	313	—	—	—
黄 泥 巴	283	310.0	-276.9	78672.7
	293	226.0	-277.3	81474.9
	303	142.0	-277.6	84254.8
	313	59.0	-277.8	87010.4

变，扭曲，甚至键的断裂，从而导致酶促反应速度缓慢。垆土与红油土的过氧化氢酶促反应的$\Delta H^{\neq}$是负值，说明酶的活性部位与反应物能较好的互补。其余土壤可能要发生较大的应变，才能使反应物很好地结合于酶活性部位上，尤其是黄棕壤过氧化氢需要更多能量，才能使反应物的键扭曲和变形。所有供试土样的过氧化氢酶的$\Delta H^{\neq}$随温度升高而降低，表明是由于温度升高减弱了张力所致，从而易转变为过渡态，形成最终产物的过程加快[4]。

Апиев等指出，活化熵表示实现过渡态可能性的量度。表3中所列各土壤的活化熵($\Delta s^{\neq}$)均为负值，显示了酶与反应物在形成活化络合物时，反应体系的有序性增加。活化络合物形成时的有序性越高，熵值减少的程度越大，活化熵也越小。比较五个供试土样$\Delta S^{\neq}$差异不大，且随温度升高变化甚小。黄棕壤在283～293K时$\Delta S^{\neq}$相对较大，说明反应物与酶的定向结合较差，这与其$\Delta H^{\neq}$大形成活化络合物时发生较大应变与扭曲相一致。

综上所述，运用动力学和热力学方法研究土壤过氧化氢酶能得到许多有关这个酶的信息。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分析动力学特征表明黄棕壤的过氧化氢酶量少，与基质结合紧密，较为稳定；红油土、黄泥巴、垆土、粘黑垆土等的过氧化氢酶量相对多，酶与基质复合物分解快。热力学参数说明红油土、垆土过氧化氢酶的活性部位与反应物能较好互补，其余土壤可能要发生较大应变。特别是黄棕壤过氧化氢酶与反应物定向结合差，反应物的键发生较大曲扭和变形方能进行反应。

参 考 文 献

1 Perucci P, Giuquiani P L, Scarponi L.Plant and soil 1982; 69：457-463

2 Frankenberger Jr W T, Johanson J B.Plant and soil 1983; 74：313-323

3 Алиев С А, Гаджиев Д А, Микаилов ф Д.Почвоведение 1981; 9：107—112

4 Алиев С А, Гаджиев Д А, Микаилов ф Д.Почвоведение 1984; 11：55-66

5 Алиев С А, ИЗД《ЭЛМ》, 1978

6 哈兹耶夫ф Х著，周礼恺等译.土壤酶活性.科学出版社，1980：14-17

7 复旦大学等编. 物理化学实验（上册）. 人民教育出版社，1979：117-119

8 莫里斯J G著，王崇等译. 生物工作者的物理化学. 科学出版社，1981

9 普赖斯N C，德韦克R A著. 陈竹生等译，生物化学中的物理化学原理和问题. 科学出版社，1985

10 费迪南德W著，王志美等译. 酶分子. 科学出版社，1980

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

THE KINETIC AND THERMODYNAMIC PROPERTIES OF CATALASES IN SEVERAL SOILS SAMPLED FROM SHAANXI PROVINCE

Zhu Ming'e Bai Hongying Dai Wei

(Department of Soil and Agrochemistry)

Abstract

Six soils from Shaanxi province were sampled to study the kinetic and thermodynamic properties of catalases. The results showed that there existed certain differences in Michaell's constants, maximum velocity and Vmax/Km ratios among soils, and that the catalases activation energy in soils was distinctly different. The great discrepeney in activation enthalpies might indiccate that the differences were in the response to change and tension strength of the substrates and active center of catalases when active complexes were formed through soil catalases. The activation entropies being all negative might show that when the active complexes were formed, the orderliness the system increased. The results also showed that when free energy of activation was positive, the differences in various soils were small. The parameters of catalases in yellow-brown earth were more special than in other soils studied.

Key words: soil; catalases; activation energy; enthalpies; entropies; free energy

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net