

УДК 577.1:576.8(26)

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА РАСТВОРЕННЫХ В МОРСКОЙ ВОДЕ МАКРОМОЛЕКУЛ В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИЙ

Т. А. АЙЗАТУЛЛИН, К. М. ХАЙЛОВ

(Государственный океанографический институт, Москва, Институт биологии южных морей
АН УССР, Севастополь)

Гидролиз растворенных в морской воде полисахаридов, выделяемых одноклеточными водорослями, и высокомолекулярных ПАВ, выделяемых макрофитами, описывается кинетической схемой и уравнением Михаэлиса—Ментена с константой Михаэлиса порядка $1 \cdot 10^{-7}$ (М).

Определены псевдоконстанты скорости гидролиза легкогидролизирующихся и стойких гидрофильных макромолекул.

В прибрежной зоне моря, богатой макрофитами, и в открытых его районах, где происходит массовое развитие одноклеточных водорослей, в морскую воду прижизненно и посмертно поступает значительное количество высокомолекулярных веществ, в первую очередь полисахаридов и белков.

Концентрации растворенных в морской воде белков, как известно, никем не установлены (мы не имеем в виду определений так называемого «альбуминоидного азота», которые не отражают концентрацию растворенного белка). Общее содержание растворенных углеводов в прибрежных водах относительно велико: $0,5-3,9$ мг/л, в среднем около $1,5$ мг/л [8, 10]. Иногда оно бывает значительно выше — около 8 мг/л [7]. Общая концентрация гидрофильных макромолекул ($MV \geq 50\,000$) в прибрежной зоне Баренцева моря составляет, по нашими данным, почти $0,7$ мг/л. На долю углеводов в этой фракции приходится всего $10-23\%$. Сказанное позволяет предположить, что основная масса растворенных углеводов представлена средне- и низкомолекулярными сахарами, или, возможно, их производными. Низкая концентрация полисахаридов при условии их постоянного поступления в воду возможна лишь в случае быстрого гидролиза, который происходит, по-видимому, при участии внеклеточных бактериальных ферментов. Действительно, было показано, что гидролиз полисахаридов одноклеточных водорослей в экспериментальных условиях в морской воде происходит весьма быстро [3]. Отмечено также, что в отсутствие водорослей, когда рост бактерий активизируется, скорость гидролиза на порядок выше, чем в плотных популяциях водорослей, где бактериальный рост подавлен. Таким образом, гидролиз поступающих в воду полисахаридов — один из существенных процессов, протекающих при участии бактерий.

В настоящей работе рассматривается кинетика ферментативного гидролиза растворенных в морской воде полисахаридов одноклеточных водорослей. Одновременно представляет интерес сопоставить кинетические характеристики гидролиза полисахаридов одноклеточных водорослей с таковыми других высокомолекулярных субстратов, растворенных

в морской воде — макромолекул, выделяемых макрофитами, а также гидрофильных макромолекул, длительно пребывающих в морской воде и, следовательно, значительно более стойких к гидролизу. Стойкие к химическому гидролизу макромолекулы в основном неуглеводной и небелковой природы и близкие по своим инфракрасным спектрам к таковым фульвокислот пресных вод недавно были обнаружены в морской воде и пене прибрежной зоны моря [5].

Материал и методы исследования. Кинетика гидролиза полисахаридов одноклеточных водорослей рассматривается на основе экспериментов, результаты и методика которых описаны ранее [3]. Отметим лишь, что проводились они с полисахаридами, меченными по C^{14} , с молекулярным весом $\geq 50\,000$, при их исходной концентрации в воде 10 мг/л .

Опыты по гидролизу высокомолекулярных метаболитов макрофитов (*Cystoseira barbata*) и стойких к разложению гидрофильных макромолекул ранее проводились одним из авторов данной статьи по другой методике. В качестве модели стойких к разложению веществ использовали соединения, экстрагируемые с поверхности частиц морского песка, взятого со дна прибрежной части Черного моря. Свежесобранный песок обрабатывали при нагревании с $0,5\text{ н. NaOH}$, после чего раствор нейтрализовали и экстрагировали методом эмульсионной экстракции с хлороформом [4]. С помощью этого метода из воды извлекают гидрофильные высокомолекулярные поверхностно-активные вещества (ПАВ) типа полисахаридов, белков и гуминовых кислот. Вместе с макромолекулами частично экстрагируются и низкомолекулярные ПАВ. Следует отметить, что последние не извлекаются на эмульсии хлороформа, если макромолекулы отсутствуют в растворе, поэтому общая сумма выделенных этим методом ПАВ пропорциональна количеству макромолекул. Действительно, при исследовании ПАВ природной морской воды доля макромолекул с $MW \geq 50\,000$ составляла обычно $79\text{--}84\%$. Таким образом, получаемый препарат ПАВ, экстрагированных с поверхности песка, не был ни чисто высокомолекулярным, ни мономолекулярным, однако макромолекулы составляли большую его часть.

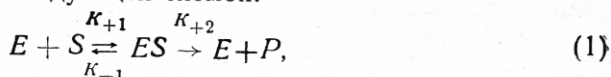
Препарат ПАВ, прижизненно выделяемых цистозирой, получали следующим образом. Свежесобранные талломы водорослей помещали на $6\text{--}7\text{ час}$ в сосуд с непроточной морской водой, где накапливались выделяемые соединения. После удаления водорослей воду центрифугировали в проточной суперцентрифуге ($\sim 12000\text{ об/мин}$) для отделения взвесей и экстрагировали упомянутым эмульсионным методом для выделения суммы гидрофильных ПАВ, в состав которых входили и высокомолекулярные вещества (предположительно — полисахариды, типичные для морских макрофитов). Полученный препарат, как и первый, представлял собой смесь высокомолекулярных (большая часть) и низкомолекулярных веществ.

Количество органического вещества в препаратах определяли путем ультрафиолетовой фотометрии их растворов, сопоставляя экстинкции с экстинкциями шкалы растворов (полисахариды) при известных концентрациях. Для этого препараты растворяли в $0,1\text{ н. NaOH}$ с последующей нейтрализацией.

Полученные ПАВ вводили отдельно в пятилитровые бутылки с морской водой, пропущенной через стеклянный фильтр № 4 для удаления фитопланктона. В бутылках концентрация ПАВ, элюированных с частиц песка, составляла 8 мг/л , выделяемых цистозирой — 10 мг/л , «фоновых» ПАВ в воде, взятой для эксперимента, — около 5% введенных ПАВ. Гидролиз высокомолекулярных ПАВ в воде происходил в аэробных условиях. Через пять и 14 дней в случае с ПАВ цистозирой и через 30 и 60 дней — с ПАВ песка из двухлитровых проб воды методом эмульсионной экстракции извлекали сумму ПАВ, пропорциональную содержанию в воде гидрофильных макромолекул. Количество выделенного на эмульсии органического вещества определяли спектрофотометрически.

Результаты и их обсуждение

Кинетика ферментативного гидролиза полисахаридов. Реакция ферментативного гидролиза растворенных в морской воде полисахаридов является одностратной и в простейшем виде может быть представлена следующей схемой:



где E — фермент, S — субстрат (полисахариды), ES — фермент-субстратный комплекс Михаэлиса, P — продукт.

Скорость реакции V в соответствии со схемой (1) описывается уравнением Михаэлиса — Ментена:

$$V = \frac{K_{+2}[E]_0 \cdot [S]}{K_m + [S]}, \quad (2)$$

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}, \quad (3)$$

где $[S]$ — концентрация субстрата, $[E]_0$ — общая концентрация фермента, K_m — константа Михаэлиса.

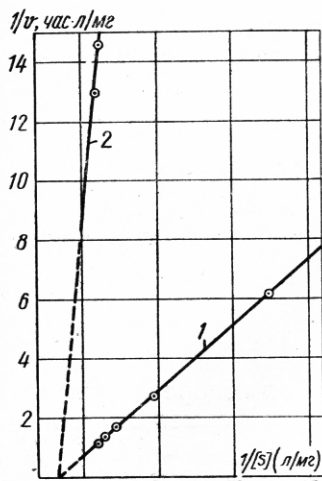


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза от концентрации полисахаридов, выделяемых в морской воде одноклеточными водорослями:

1 — при интенсивном развитии бактерий, 2 — при блокировании их антибиотиками, выделяемыми водорослями.

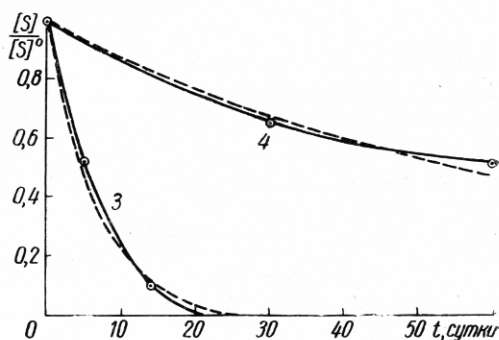


Рис. 2. Кинетические кривые гидролиза гидрофильных макромолекул цистоэри (3) и стойких к разложению элюированных с песка (4).

Сплошная линия — эксперимент, пунктир — кривые, описываемые уравнением (8).

Для обработки экспериментальных данных воспользуемся линейной трансформацией уравнения (2):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{[E]_0 \cdot K_{+2}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{K_{+2}[E]_0}. \quad (4)$$

Как свидетельствуют полученные результаты (рис. 1), расчетные точки хорошо укладываются на прямой 1, которая соответствует процессу, протекающему при интенсивном развитии бактерий. Следовательно, экспериментальные данные не противоречат принятой кинетической схеме (1). Для случая интенсивного развития бактерий скорость и общую концентрацию фермента обозначим соответственно нижними индексами $V_{(1)}$ и $[E]_{0(1)}$. Прямая 2 соответствует процессу, протекающему при блокировании бактерий выделяемыми водорослями антибиотиками. Для этого случая обозначим скорость $V_{(2)}$ и общую концентрацию ферментов $[E]_{0(2)}$. Экстраполяция прямой 2 затруднительна, поэтому при построении ее предполагается, что наличие токсинов влияет лишь на концентрацию выделяемых бактериями ферментов, но не на механизм самой реакции и на константы скорости.

Из рис. 1, учитывая уравнение (4), находим: $1/K_m = 0,155$; отсюда $K_m = 6,5$ (мг/л), или $K_m \approx 1 \cdot 10^{-7}$ (M), если считать в среднем молекулярный вес полисахаридов равным 100000. (Сравним с константой Михаэлиса ферментативного гидролиза сахарозы [6], где $K_m = 2 \cdot 10^{-2}$, и константой Михаэлиса потребления кислорода бактериями [9] с K_m порядка от 10^{-6} до 10^{-8} для различных бактерий).

Отрезок ординаты, отсекаемый прямой 1:

$$\frac{1}{K_{+2}[E]_{0(1)}} = 0,7, \quad K_{+2}[E]_{0(1)} = 1,43.$$

Отрезок ординаты, отсекаемый прямой 2:

$$\frac{1}{K_{+2}[E]_{0(2)}} = 8,3, \quad K_{+2}[E]_{0(2)} = 0,12,$$

Отсюда

$$\frac{[E]_{0(1)}}{[E]_{0(2)}} \approx 12.$$

Другой путь расчета относительной концентрации ферментов непосредственно по экспериментальным данным заключается в сравнении соответствующих скоростей $V_{(1)}$ и $V_{(2)}$ при одной и той же $[S]$. Действительно, из уравнения (2) при $[S]_{(1)} = [S]_{(2)}$:

$$\frac{V_{(1)}}{V_{(2)}} = \frac{[E]_{0(1)}}{[E]_{0(2)}}.$$

Подсчет отношения скоростей реакции при $[S]_{(1)} = [S]_{(2)} = 9 \text{ мг/л}$ также дает значение:

$$\frac{V_{(1)}}{V_{(2)}} = \frac{[E]_{0(1)}}{[E]_{0(2)}} = \frac{0,9}{0,075} = 12.$$

Иными словами, при действии токсинов, выделяемых водорослями, концентрация выделяемых бактериями гидролитических ферментов падает в 12 раз. Это приводит к понижению скорости гидролиза в 18 раз [3]. Заметим, что, согласно уравнению (2) при $[E]_0 \ll [S]$ скорость гидролиза должна линейно зависеть от общей концентрации фермента $[E]_0$.

Кинетика ферментативного гидролиза макромолекул, выделяемых макрофитами, и стойких гидрофильных макромолекул. На рис. 2 представлены экспериментальные кривые, отражающие кинетику гидролиза высокомолекулярных ПАВ цистозир (3) и стойких к разложению гидрофильных макромолекул (4). На оси ординат отложены безразмерные (отнесенные к начальной концентрации $[S]^{(0)}$) концентрации макромолекул.

Как свидетельствуют результаты обработки (рис. 3), кинетика ферментативного гидролиза ПАВ цистозир соответствует схеме Михаэлиса—Ментена и процесс описывается уравнением (2). Константа Михаэлиса (K_m) $\cong 8$, то есть практически имеет то же значение, что и K_m гидролиза полисахаридов одноклеточных водорослей. (Для сравнения на рис. 3 проведена прямая 1, отражающая кинетику гидролиза полисахаридов при интенсивном развитии бактерий.) Можно предположить, что ПАВ цистозир имеют в основном углеводную природу.

Кинетика гидролиза стойких гидрофильных макромолекул, как видно из рис. 3, не описывается уравнением (2) и не отражается схемой (1), соответствующей простым односубстратным ферментативным реакциям.

Упрощенные кинетические модели. Поскольку в воде открытых участков моря концентрация полисахаридов $[S]$ значительно меньше 1 мг/л , то есть $[S] \ll K_m$, можно принять, что $K_m + [S] = K_m$. Следовательно, из уравнения (2):

$$V \cong \frac{K_{+2}[E]_0[S]}{K_m}. \quad (5)$$

В таких условиях ферментативный гидролиз полисахаридов является реакцией второго порядка: скорость процесса прямо пропорциональна произведению концентраций растворенных полисахаридов на концентрацию фермента:

$$V \cong K^1 [E]_0 [S], \quad (6)$$

где $K^1 = K_{+2}/K_m$.

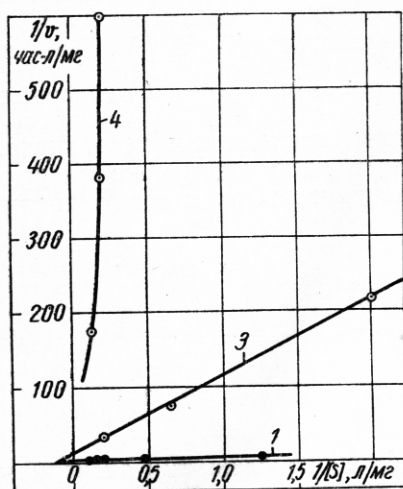


Рис. 3. Зависимость скорости гидролиза от концентрации гидрофильных макромолекул.

(Обозначения см. рис. 1 и 2.)

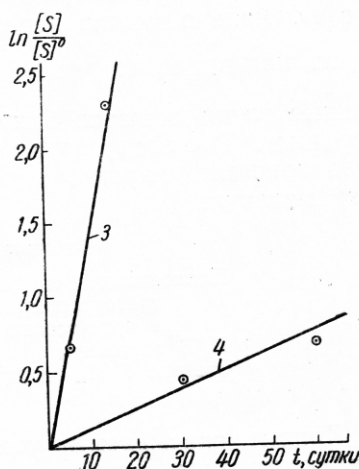


Рис. 4. Зависимость концентрации гидрофильных макромолекул от времени (уравнение 8).

В пробах морской воды с постоянным значением $[E]_0$:

$$V = \frac{d[S]}{dt} \cong \frac{K_{+2}[E]_0}{K_m} [S] = K [S]. \quad (7)$$

Иначе, при этих условиях ферментативный гидролиз полисахаридов описывается уравнением реакции первого порядка. Интегрируя уравнение (7), находим выражение, описывающее изменение во времени концентрации растворенных полисахаридов (исходная концентрация менее 10 мг/л) при ферментативном гидролизе в пробах морской воды с постоянной величиной общей концентрации фермента:

$$[S] = [S]^{(0)} e^{-kt}, \quad (8)$$

где $[S]^{(0)}$ — начальная концентрация полисахарида, K — псевдоконстанта скорости реакции:

$$K = \frac{K_{+2}[E]_0}{K_m} = \frac{K_{+1} \cdot K_{+2}}{K_{-1} + K_{+2}} [E]_0.$$

Из экспериментальных данных значение K определяется с помощью выражения

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{[S]^{(0)}}{[S]}.$$

Из приведенного анализа следует практическая рекомендация: при постановке экспериментов со сложными динамическими системами, включающими полисахариды или подобные им субстраты, для облегчения математической обработки результатов необходимо использовать начальные концентрации полисахаридов значительно ниже 10 мг/л. В таком случае в систему уравнений, описывающих динамику сложного процесса, включающего и гидролиз полимеров, войдут простые уравнения (6) и (7), которые не затруднят решения системы. Однако при необходимости и при высоком значении $[S]$ в качестве аппроксимационного формально можно использовать выражения (7) и (8). Действительно, как видно из рис. 4, в координатах — $\ln \frac{[S]}{[S]^{(0)}} t$ экспериментальные точки ложатся близко к прямым, проходящим через начало координат. Тангенс угла наклона прямых дает следующие значения псевдоконстант, характеризующих интенсивность процесса гидролиза макромолекул:

Субстрат	k (сутки ⁻¹)
Полисахариды одноклеточных водорослей	
в отсутствии живых водорослей	3,5
в присутствии " "	0,18
ПАВ цистозир	0,15
Стойкие ПАВ, элюированные с песка	0,013

Кривые, описываемые уравнением (8) с приведенными значениями псевдоконстант k , нанесены в виде пунктирных линий на рис. 2, из которого видно, что упрощенная модель весьма близко отражает реальность: отклонение от экспериментальных данных ниже 15% значения величины концентрации. Очевидно, при более продолжительных опытах уравнение (8) не будет удовлетворительно описывать гидролиз стойких ПАВ с песка (пунктирная кривая 4 на рис. 2 расходится с экспериментально полученными данными, обозначенными сплошной линией).

Для того, чтобы выражение (8) соответствовало экспериментальным данным и при $t \rightarrow \infty$, в него необходимо внести дополнительный член; в этом случае оно примет вид, аналогичный уравнению, описывающему деструкцию органических веществ в морской воде [1] и потребление кислорода [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Айзатуллин Т. А. 1967. Формальная химико-кинетическая характеристика процессов регенерации минеральных соединений биогенных элементов. «Тр. Ин-та океанол. АН СССР», 83, 21.
2. Айзатуллин Т. А., Леонов А. В. 1968. О вертикальном профиле изменения биохимического потребления кислорода в океане. «Тез. докл. IV науч. конф. по хим. моря», М.
3. Хайлов К. М. 1968. Микробиологические процессы внеклеточного гидролиза полисахаридов, растворенных в морской воде. «Микробиология», 37, 3.
4. Егоров же. 1968. Об органических макромолекулах, растворенных в морской воде. «Геохимия», 5.
5. Хайлов К. М., Семенов А. Д., Бурлакова З. П., Семенова И. М. 1970. Некоторые сведения о химической природе и свойствах органических макромолекул, растворенных в морской воде и входящих в состав пены. «Гидрохим. мат-лы».
6. Яковлев В. А. 1965. Кинетика ферментативного катализа. Изд-во «Наука», М.
7. Collier A., Ray S. M. a. Magnitsky W. 1950. Preliminary note on naturally occurring organic substances in sea water, affecting the feeding of oyster. «Science», 111, (2876).

8. Lewis G. J., Rakestraw N. W. 1955. Carbohydrates in sea water. «J. Marine Research», 14.
9. Longmuir I. S. 1954. The kinetics of biochemical oxidation. «Biochem. J.», 57, 1.
10. Walsh G. E. 1965. Studies on dissolved carbohydrates in Cape Cod waters. I. General survey, «Limnol. a. Oceanogr.», 10.

Поступила 17. XI 1969 г.

KINETICS OF ENZYMIC HYDROLYSIS OF MACROMOLECULES SOLVED IN SEA WATER IN THE PRESENCE OF BACTERIA

T. A. AIZATULLIN, K. M. KHAILOV

(State Oceanographic Institute, Moscow; Institute of Biology of Southern Seas, Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Sevastopol)

Summary

Hydrolysis of polysaccharides secreted by unicellate algae, and high-molecular surface active substances secreted by macrophytes solved in sea water is described by the kinetic scheme and the Michaelis—Mentene equation with the Michaelis constant of the $1 \cdot 10^{-7}$ (M) order.

A 12-fold decrease in concentration of hydrolytic enzymes was observed when blocking the bacteria with antibiotics secreted by algae that causes an 18-fold decrease in the hydrolysis rate.

When studying complex dynamic systems involving the stage of macromolecule hydrolysis in sea water, simplified kinetic models of hydrolysis can be used.

Pseudoconstants are determined of hydrolysis rate for readily hydrolyzed and stable hydrophilous macromolecules.