



Topraklarda enzimatik reaksiyonların başlangıç hızının belirlenmesi

Fariz MİKAİLSOY*, Erhan ERDEL

İğdir Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, İğdir

Öz

Toprağın enzimatik aktivitesi, toprakların verimliliğinin, kalitesinin tanınan bir göstergesi olarak kullanılabilir. Enzimlerin bu özelliğinin anlaşılması için enzimlerin kinetiğinin incelenmesi gerekmektedir. Bilindiği gibi, kinetik araştırmalarda reaksiyon hızının pratik olarak tespit edilmesi, enzimatik reaksiyonun başlangıç hızının belirlenmesi temelinde gerçekleştirilir. Çalışmada, toprağın katalaz enziminin kinetik parametrelerini (V_{max} , K_M , V_{max}/K_M , K_{SEE} , $[S]_{opt}$ ve $u_{0,max}$) hesaplamak için H_2O_2 substratının farklı konsantrasyonlarında (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30 %) analizler yapılmıştır. Bu parametrelerin hesaplanması için analiz sonuçları kullanılarak önce hız (v) değerleri hesaplanmıştır. Sonra ürün - substrat: $[P]=f([S])$ bağıntısını ifade eden farklı modeller belirlenmiştir. Daha sonra model seçim kriterlerine (R^2 , R^2_{adj} , σ , A , D , UII , AIC) göre $[P]=f([S])$ bağıntısını yansıtan en uygun model belirlenmiştir. Belirlenen modele göre başlangıç hızı: $u_0=d([P])/dt|_{t=0}$ formülü ile hesaplanmıştır. Çalışmadaki tüm hesaplamalar STATISTICA-10 paket programı ile yapılmıştır. Araştırma sonuçlarında; substrat (H_2O_2) konsantrasyonu arttıkça, ürünün (O_2 'nin) azaldığı tespit edilmiş, substratın katalaz enzim reaksiyonunu engellediği (inhibe ettiği) gözlenmiştir. Başlangıç hızın belirlenmesi için, model seçim ölçütlerine göre en uygun modelin Binom-1 olduğu bulunmuştur. Substratın düşük ve yüksek konsantrasyon değerlerine karşılık gelen başlangıç hız değerleri kullanılarak kinetik parametreler hesaplanmıştır. Ayrıca, substratın optimum değerinde (12.2957 %) en yüksek başlangıç hızı ($u_{0,max}=5.3508$ ml $O_2/1$ dak 5g toprak) ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Toprak, enzim, katalaz, kinetik parametreler, başlangıç hız.

Determination of the initial rate of enzymatic reactions in soils

Abstract

The enzymatic activity of the soil can be used as a diagnostic indicator of soil fertility and quality. In order to understand this feature of enzymes, the kinetics of enzymes should be examined. As is known, the practical determination of the reaction rate in kinetic studies is carried out on the basis of determining the initial rate of the enzymatic reaction. In the study, analysis were conducted with different concentrations (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30 %) of H_2O_2 to calculate kinetic parameters (V_{max} , K_M , V_{max}/K_M , K_{SEE} , $[S]_{opt}$ and $u_{0,max}$) of catalase enzyme to calculate the kinetic parameters of the soil catalase enzyme (V_{max} , K_M , V_{max}/K_M , K_{SEE} , $[S]_{opt}$ and $u_{0,max}$). In this regard, first the values for velocity (v) were calculated by using the analysis results. Then, different models expressing the relation product - substrate: $[P]=f([S])$ were determined. Based the model selection criteria (R^2 , R^2_{adj} , σ , A , D , UII , AIC), the most proper model showing the relation $[P]=f([S])$ was determined. Initial velocity was calculated with the formula $u_0=d([P])/dt|_{t=0}$ using the selected model. All calculations in the study were made with the STATISTICA-10 package program. Results showed that, it was determined that as the substrate (H_2O_2) concentration increased, the product (O_2) decreased, and it was also observed that the substrate inhibited the catalase enzyme reaction. In order to determine the initial velocity, it was found that the most suitable model according to the model selection criteria was Binomial-1. The kinetic parameters were calculated using the initial rate values according to low and high concentration values of the substrate. In addition, the highest initial velocity ($u_{0,max}=5.3508$ ml $O_2/1$ min 5g soil) was reached at the optimum value of the substrate (12.2957 %).

Keywords: Soil, enzyme, catalase, kinetic parameters, initial rate.

© 2022 Türkiye Toprak Bilimi Derneği. Her Hakkı Saklıdır

* Sorumlu yazar:

Tel. : 0 505 968 8288

E-posta : fariz.mikailsoy@igdir.edu.tr

Makale Türü: ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş Tarihi : 7 Kasım 2022

Kabul Tarihi : 18 Aralık 2022

e-ISSN : 2146-8141

DOI : 10.33409/tbbbd.1200435

Giriş

Toprak kalite parametrelerinden olan toprak enzimleri, besin döngüsünden, organik maddenin parçalanmasından ve toprakta çok sayıda reaksiyonun katalizlenmesinden sorumludur. Toprak enzimleri genellikle mikrobiyal kökenli olmakla birlikte hayvansal ve bitki kökenlidir de.

Topraktaki enzimlerin miktarı belirlenemediği için aktiviteleri belirlenir. Enzimler hakkında daha detaylı bilgi için enzimlerin etki mekanizmasının araştırılması önemlidir. Bu noktadan hareketle enzimlerin kinetik ve termodinamiğinin belirlenmesi önemlidir (Edwards, 1970; Cornish-Bowden, 1976; Aliev ve ark., 1981; Khabirov ve Kuvatov 1990).

Toprak enzimlerinin kinetiği üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Toprak enzimlerinin incelenmesine yönelik kinetik yaklaşım, son yüzyılda ve özellikle 1950'lerden itibaren önemli ilerlemeler kaydetmiştir (Michaelis ve Menten 1913; Tabatabai ve Bremner 1971; Khaziev ve Agafarova 1976; Aliev ve ark., 1981; Panikov ve Ksenzenko 1982; Khabirov ve Kuvatov 1990; Yano ve Suzuki 2018; Mikailsoy, 2022).

Toprak enzimlerinin, toprak parçacıklarının yüzeyinde hareketsiz olarak kalan organizmaların salgıları olarak kabul edilebileceği bilinmektedir. O halde, durağan bir sistemde toprak enzimatik reaksiyonlarının kinetiğini incelemek daha uygundur. 'Hareketsiz enzimler' terimi 1971'den itibaren kullanılmaya başlanmıştır (Tabatabai ve Bremner 1971).

Durağan kinetik, enzimatik reaksiyonların incelenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle, enzimatik reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna bağımlılığını belirlemek için durağan kinetik çalışmalar yapılır. Kararlı durumda enzimatik reaksiyonların mekanizmasını incelerken, başlangıç hızını belirlemek gerekir (Briggs ve Haldane 1925; Keleti, 1986; Hegyi ve ark., 2013). Başlangıç hızı, farklı substrat konsantrasyonlarında reaksiyon ürünlerinin oluşumunun başlangıç hızının (v_0) ölçülmesine dayanır.

Genellikle, kinetik mekanizmaları açıklamak ve reaksiyonların kinetik parametrelerini belirlemek için, enzimler tarafından katalize edilen reaksiyonun başlangıç hızı hakkındaki verilerin kullanılması önerilir. Kinetik çalışmalarda kullanılan Michaelis-Menten modeli için enzimatik reaksiyonun başlangıç hızı (v_0) bilinmelidir (Michaelis ve Menten 1913; Aliev ve ark., 1981; Keleti, 1986; Hegyi ve ark., 2013; Mikailsoy, 2022).

Bir substratlı enzimsel reaksiyonun klasik kinetiği şematik olarak aşağıdaki şekilde gösterilebilir (Michaelis ve Menten 1913):



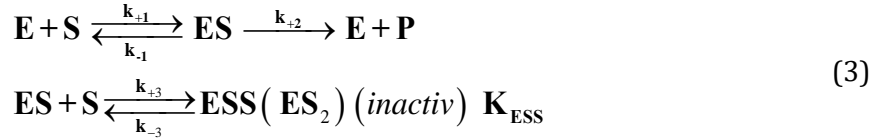
Eşitlik (1)'de E-enzim; S-substrat; ES-enzim-substrat kompleksi (bazen buna Michaelis kompleksi denir); P-ürün (produkt); k_{+1} , k_{+2} ve k_{-1} – sırasıyla iki ileri ve bir ters reaksiyonun hız sabitleridir, S ve ES arasındaki çift oklar enzim-substrat bağlanmasının tersinir olduğunu belirtir. Bu mekanizmada E enzimi, sadece reaksiyonu kolaylaştıran bir katalizördür.

Enzimatik reaksiyonun ilk (başlangıç) aşamasında substrat konsantrasyonunun azalması ihmal edilebilir. Yani, analizlerin yapıldığı ilk anda $[S]_0 \gg [E]_0$ olduğundan $[S]_0 \gg [ES]$ olur. Bu halde, $[S] = [S]_0 - [ES]$ eşitliğinden aşağıdaki eşitlik $[S] = [S]_0$ bulunur. Bu durumda, reaksiyonun başlangıç hızı aşağıdaki biçimde yazılabilir (Michaelis ve Menten 1913; Edwards, 1970; Williams ve Williams 1973; Cornish-Bowden, 1976; Panikov ve Ksenzenko 1982; Keleti, 1986; Hegyi ve ark., 2013; Tazdaıt ve ark., 2013; Mikailsoy, 2022).

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2} \cdot [ES] = \frac{k_{+2} [E]_0 [S]_0}{K_M + [S]_0} = \frac{V_{\max} [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (2)$$

Burada, $V_{\max} = k_{+2} \cdot [E]_0$ enzimsel reaksiyonun ulaşabileceği maksimum hızdır. K_M – ise aşağıdaki biçimde tanımlanır: K_M – Michaelis-Menten sabiti olup en yüksek hız değerinin (V_{\max}) yarısına ulaşmak için gerekli olan substrat miktarıdır. Birimi: $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Aktif ES kompleksine ek olarak, inaktif bir ESS kompleksinin oluştuğu en basit enzimatik reaksiyonun substrat inhibisyonunun durağan kinetiğinin şeması aşağıdaki gibidir.



Burada, \mathbf{K}_{ESS} - enzimatik reaksiyonu inhibe eden (engelleyen) inaktif ESS kompleksinin oluşum hızını karakterize eden ayrışma parametresidir.

Basit dönüşümler yoluyla, substratın fazlalığı ile inhibe edilen sabit (*durağan, kararlı*) reaksiyonun başlangıç hızı (v_0) için aşağıdaki formül elde edilmiştir (Haldane, 1930; Lineweaver, Burk, 1934; Yano et al., 1966):

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [\text{S}]_0}{\mathbf{K}_M + [\text{S}]_0 + \frac{1}{\mathbf{K}_{\text{ESS}}} [\text{S}]_0^2} = \frac{V_{\max} \cdot [\text{S}]_0}{\mathbf{K}_M + \left(1 + \frac{[\text{S}]_0}{\mathbf{K}_{\text{ESS}}}\right) \cdot [\text{S}]_0} \quad (4)$$

(2) ve (4) nolu formüllerde, V_{\max} , \mathbf{K}_M ve \mathbf{K}_{ESS} kinetik parametreleri aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$V_{\max} = k_{+2} [\text{E}]_0, \mathbf{K}_M = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{[\text{ES}]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}, \mathbf{K}_{\text{ESS}} = \frac{[\text{ES}][\text{S}]}{[\text{ESS}]} = \frac{k_{-3}}{k_{+3}} \quad (5)$$

İnhibitörlerin etkisinin incelenmesi, toprakta meydana gelen enzimatik kataliz mekanizması hakkında daha eksiksiz bilgi elde edilmesini sağlar. Topraklarda enzim reaksiyonlarının inhibisyonu üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Edwards, 1970; Panikov ve Ksenzenko 1982; Tazdait, 2013; Yano ve Suzuki 2018; Yun ve Han 2020).

Bilindiği gibi toprağın biyolojik özellikleri incelendiğinde en önemli enzimlerden biri katalazdır. Katalaz, toprak ortamı için toksik kimyasal madde olan hidrojen peroksiti parçalayan ve topraktaki mikroorganizmaların oksijen ihtiyacını karşılamada etkili olan enzimdir. Bu enzimin topraktaki işlevini belirlemek için kinetiğini bilmek önemlidir.

Bu çalışmanın amacı killi-tın bünyeli toprakta katalaz enziminin başlangıç hızı ve kinetik parametrelerinin belirlenmesidir. Ayrıca bu çalışma, fazla substrat tarafından katalaz inhibisyonunun kinetik çalışmalarının sonuçlarını sunmaktadır.

Materyal ve Metod

Materyal

Toprak örnekleri Iğdır Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi deneme alanından toplanmıştır. İncelenen bölge, iklimi nedeniyle dolayı yazları sıcak, kışları ılımandır. Ovada en yüksek yağış Mayıs ayında, en düşük ise Ağustos ayında düşer. Iğdır ilinde yıllık ortalama yağış 254.2 mm, buharlaşma 1094.9 mm'dir. En soğuk ay Ocak, en sıcak ay Temmuzdur (Anonim, 2018). Çalışma alanının rakımı 850 m, ovanın merkez ilçesinde sulanan arazilerin eğimi düz ve düze yakın (% 0-2). Bazı toprak özellikleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Araştırma topraklarının bazı özellikleri

Toprak özelliği	Değer
Tekstür	Killi tın
Organik madde, %	1.34
Hacim ağırlığı, g cm ⁻³	1.16
pH(1:2,5)	8.22
Electriksel iletkenlik, dS m ⁻¹	1.2
Toplam azot, %	0.067
Kireç, %	9.04

Yöntemler

Toprak analizleri

Toprak örnekleri, fiziksel, kimyasal ve enzim analizleri için 0-30 cm derinlikten, üç farklı noktadan, üç tekerrürlü, bozulmuş ve bozulmamış olarak alınmıştır.

Toprak tekstürü (Gee ve Bauder 1986), toprak organik maddesi (Walkley ve Black 1934), elektriksel iletkenlik (Rhoades, 1983), katalaz aktivitesi (Beck, 1971), kireç ve toprak pH'sı (McLean, 1982) ve hacim ağırlığı (Blake, 1965)' e göre belirlenmiştir. Toprak Reaksiyonu (pH): 1:2,5 oranındaki toprak:su karışımında cam elektrotlu pH metre ile belirlenmiştir (McLean, 1982).

Kinetik parametrelerin hesaplanması

Çalışmada kinetik parametreleri (v_0 , V_{max} , K_M , V_{max}/K_M ve K_{ESS}) hesaplamak için farklı substrat konsantrasyonlarında (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30 %) katalaz enziminin aktivite analizleri yapılmıştır.

Katalaz enzim reaksiyonunun başlangıç hızını belirlemek için farklı modeller (Hiperbolik, Binom, Binom-parabolik, 5. derece polinom, 6. derece polinom, 5. derece pseudopolinom ve 6. derece pseudopolinom) kullanılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Ürünün (P) zamana göre değişimini ifade eden modeller

Model tipi		Modeller
1	Hyperbolik	$[P(t)] = \frac{at}{b+t}$
2	Binom	$[P(t)] = a_1 t^{a_2} e^{-a_3 t}$
3	Binom-parabolik	$[P(t)] = a_1 t^{a_2} e^{-a_3 t \pm a_4 t^2}$
4	5. derece polinom	$[P(t)] = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_5 t^5 = \sum_{k=0}^5 a_k t^k$
5	6. derece polinom	$[P(t)] = a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_6 t^6 = \sum_{k=0}^6 a_k t^k$
6	5. derece pseudo-polinom	$[P(t)] = a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_n t^n = \sum_{k=1}^5 a_k t^k$
7	6. derece pseudo-polinom	$[P(t)] = a_1 t + a_2 t^2 + \dots + a_n t^6 = \sum_{k=1}^6 a_k t^k$

Bu modellere göre her konsantrasyon için başlangıç hız hesaplamaları yapılmıştır. Bu çizelgedeki modellerin en iyisinin seçilmesi için pratikte yaygın olarak kullanılan model seçim kriterleri Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Model seçimi için temel kriterler

No	Kriterler	No	Kriterler
1	$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \tilde{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$	5	$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \tilde{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n \{ y_i - \bar{y} + \tilde{y}_i - \bar{y} \}^2}$
2	$R_{adj}^2 = 1 - (1 - R^2) \frac{n-1}{n-p}$	6	$UII = \sqrt{\frac{ESS}{\sum_{i=1}^n y_i^2}}$
3	$\sigma_{[P]/t} = \begin{cases} \sqrt{\frac{ESS}{n-p-1}}, & n \leq 30 \\ \sqrt{\frac{ESS}{n-p}}, & n > 30 \end{cases}$	7	$AIC = \begin{cases} \ln\left(\frac{ESS}{n}\right) + \frac{2p}{n}, & (n/p \geq 40) \\ \ln\left(\frac{ESS}{n}\right) + \frac{2p(p+1)}{n-(p+1)}, & (n/p < 40) \end{cases}$
4	$A = \% 100 \cdot \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left \frac{y_i - \tilde{y}_i}{y_i} \right $		

Burada, $ESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \tilde{y}_i)^2$ -tahmini kareler toplamı (Estimate Sum of Square), n — bağımsız t_i değişkenlerinin ölçüm sayıları, p — modelin parametrelerinin sayıları, y_i — gözlemlenen bağımlı değişkenin (ölçülen ürün) değerleri, \tilde{y}_i —bağımlı değişkenin model denkleminde göre hesaplanmış (tahmin edilen ürün) değerleri, \bar{y} —bağımlı değişkenin ortalama (ölçülen ürünlerin ortalaması) değerleridir. Model seçim kriterlerine göre (Determinasyon Katsayısı— R^2 , Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı— R^2_{adj} , Tahminin Standart Hatası (RMSE)— $\sigma_{[P]/t}$, Mutlak Yüzde Hata Ortalaması (MAPE) , %—A, Uyum İndeksi—D, Theil Tahmin Doğruluğu Katsayısı—UII, Akaike Bilgi Kriteri—AICC) en uygun model belirlenmiştir (Çizelge 3).

Substratın farklı konsantrasyonları $[S]_0$ için belirlenmiş başlangıç hız (v_0) değerlerinin saptanmasından sonra, başlangıç hız (v_0) ve substrat konsantrasyonları arasındaki kinetik parametrelerin (K_M , V_{max} , K_{ESS}) değerleri Brigs-Holdeyn'in hiperbolik modeli;

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]_0}{K_M + [S]_0 + \frac{1}{K_{ESS}} [S]_0^2} = \frac{V_{max} \cdot [S]_0}{K_M + \left(1 + \frac{[S]_0}{K_{ESS}}\right) \cdot [S]_0} \quad (6)$$

kullanılarak belirlenmiştir.

Düşük substrat konsantrasyonlarında, yani $[S]_0^2 \ll K_{ESS}$ olduğunda (6) nolu denklem klasik Michaelis-Menten'in (2) nolu denkleminde basitleştirilir:

$$[S]_0^2 \ll K_{ESS} \Rightarrow \frac{1}{K_{ESS}} [S]_0^2 \approx 0 \Rightarrow v_0 = \frac{V_{max} [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad (7)$$

Yüksek substrat konsantrasyonlarında ise, yani $[S]_0^2 \gg K_M$ olduğunda ise;

$$[S]_0^2 \gg K_{ESS} \Rightarrow \frac{K_M}{[S]_0} \approx 0 \Rightarrow v_0 = \frac{K_{ESS} \cdot V_{max}}{K_{ESS} + [S]_0} \quad (8)$$

formülüne dönüştürülerek hesaplanır.

Kinetik parametreler (v_0 , V_{max} , K_M ve K_{ESS}) model (7) ve (8) denklemleri yazılım programı İSTATİKA-10 kullanılarak hesaplanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Katalaz enzim reaksiyon değerlerinin sonuçları Çizelge 3'te gösterilmiştir. Çizelge 4 incelendiğinde en yüksek ürünün %15 substrat konsantrasyonunda olduğu görülmektedir. Ayrıca, sonraki konsantrasyon artışlarıyla birlikte üründe bir azalma olduğu da gözlenmektedir.

Çizelge 4. İncelenen topraktaki % H_2O_2 konsantrasyonuna göre O_2 çıkış miktarı

i	Zaman, t		[S]= %, H_2O_2					
	dak	3	6	9	15	21	27	30
1	0,25	1.15	1.78	1.92	2.21	1.45	0.85	0.42
2	0,50	1.68	2.51	2.94	3.15	2.68	1.42	0.74
3	0,75	2.05	3.10	3.72	4.12	3.44	1.78	0.97
4	1,0	2.52	3.73	4.12	4.75	4.12	2.07	1.25
5	1,5	3.00	4.67	4.97	6.24	4.59	2.60	1.61
6	2,0	3.45	5.42	6.05	6.87	4.91	3.03	1.99
7	2,5	3.85	5.93	6.55	7.43	5.22	3.45	2.31
8	3,0	4.08	6.37	7.28	8.30	5.79	3.78	2.63
9	3,5	4.42	6.88	7.86	9.17	6.15	4.12	2.88
10	4,0	4.67	7.12	8.17	9.95	6.75	4.56	3.09
11	5,0	5.00	7.65	9.15	11.25	7.23	4.82	3.32
12	6,0	5.35	8.25	10.25	12.30	7.85	5.25	3.51

En Uygun Modelin Belirlenmesi

Uygun modelin seçimi istatistiksel kriterler kullanılarak hesaplanmıştır. Örneğin, $H_2O_2=3\%$ konsantrasyonu için başlangıç hız değerinin farklı modellere göre seçilmesi Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Farklı model ve istatistiklere göre $H_2O_2 = 3\%$ konsantrasyonlarında toprağın başlangıç hızının hesaplanan değerleri.

İstatistiksel parametreler	Model-1	Model-2	Model-3	Model-5	Model-6	Model-5	Model-6
	Hiperbol	Binom-1	Binom-2	Polin-5	Polin-6	PPolin-5	PPolin-6
Başlangıç hız (v_0), ml O_2 / 1 dak 5 g toprak							
	3.9132	2.5580	2.6309	4.1058	4.6791	4.3961	4.9055
R^2	0.992819	0.999550	0.999594	0.998161	0.998714	0.997832	0.998612
R^2_{adj}	0.992166	0.999460	0.99945	0.996848	0.997428	0.996749	0.997621
σ	0.142990	0.037526	0.037589	0.090689	0.081943	0.092139	0.078820
D	0.998244	0.999887	0.999898	0.999539	0.999678	0.999463	0.999654
UII	0.037260	0.009323	0.008860	0.018851	0.015768	0.020472	0.016382
AICc	-3.6570	-6.1611	-5.9298	-3.4197	-2.9766	-3.8259	-3.7002
A, %	5.3079	0.7951	0.8079	2.2841	1.8323	2.7779	2.0077

Bilindiği gibi model seçimi, seçim kriterlerinden R^2 , R^2_{adj} ve D'nin en yüksek değerlerine ve σ , A, UII ve AICc'nin en küçük değerlerine göre yapılır (Tusat ve Mikailsoy 2018).

Model seçim kriterlerine göre 2. Modeldir (Binom-1) en uygun sonucu vermektedir. Model-2'ye (Binom-1) göre başlangıç hız (v_0) için $[S] = [H_2O_2] = 3\%$ hesaplanmış ve en uygun değer $v_0 = 2.5580$ olarak bulunmuştur (Çizelge 5).

Başlangıç Hızın Hesaplanması

Binom-1 Modeli kullanılarak farklı H_2O_2 konsantrasyonlarında hesaplanan toprağın katalaz enzim reaksiyonunun başlangıç hız (v_0) değerleri Çizelge 6'da verilmiştir.

Çizelge 6. Düşük ve yüksek substrat konsantrasyonlarında toprağın katalaz enzim reaksiyonu için başlangıç hızı (v_0) değerleri

№	[S]	v_0	№	[S]	v_0
	%			ml O_2 / 1 dak 5 g toprak	
1	3	2.5580	1	18	7.9453
2	6	5.0248	2	21	6.7866
3	9	7.6178	3	24	5.3866
4	12	8.5678	4	27	3.6728
5	15	8.6990	5	30	1.8557

Kinetik Parametrelerin (V_{max} , K_M , K_{ESS} , V_{max}/K_M) Değerleri

Başlangıç hızın Çizelge 6'da düşük ve yüksek konsantrasyonlarındaki değerleri (7) ve (8) nolu eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen verilerden kinetik parametrelerin (V_{max} , K_M , K_{ESS} , V_{max}/K_M) değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 7. Toprakta H_2O_2 substratının düşük ve yüksek konsantrasyonlarda katalaz enzim reaksiyonunun kinetik parametrelerinin (V_{max} , K_M , K_{ESS} , V_{max}/K_M) değerleri.

	Kinetik parametreler			İstatistiksel parametreler			
	V_{max}	K_M	V_{max}/K_M	R^2 , %	A, %	σ	UII
Düşük Konsantrasyon	ml O_2 /1 dak 5g toprak	%	%				
	18.695	15.3317	1.2194	98.058	7.326	0.640	0.072
Yüksek Konsantrasyon	V_{max}	K_{ESS}		R^2 , %	A, %	σ	UII
	ml O_2 /1 dak 5g toprak	%		%			
	18.695	9.8604	-	60.496	38.320	1.644	1.312

Enzimatik Reaksiyonun Ekstremum (Optimal Substrat ve Hız) Değerleri

Son olarak, enzimsel reaksiyonların mekanizmalarının daha ayrıntılı yorumlanmasında faydalı olan ekstremum (optimum substrat, $[S]_{opt}$ ve hız $v_{0,max}$) değerlerinin hesaplaması yapılmıştır. Ekstremum değer, substratın optimum konsantrasyonunda enzimin spesifik aktivitesini belirlemek için önemlidir.

Başlangıç hız fonksiyonunun $v_0=f([S]_0)$ maksimum değerini belirlemek için, Eşitlik (4)' ün $[S]$ 'e göre türevini hesaplamak ve sıfıra eşitlemek gerekir:

$$\frac{dv_0}{d[S]_0} = \frac{V_{max} \cdot \left\langle K_M + [S]_0 + \frac{1}{K_{ESS}} [S]_0^2 \right\rangle - V_{max} \cdot [S]_0 \cdot \left\langle 1 + \frac{2}{K_{ESS}} [S]_0 \right\rangle}{\left\langle K_M + [S]_0 + \frac{1}{K_{ESS}} [S]_0^2 \right\rangle^2} = 0 \quad (9)$$

Bu durumda, enzimatik reaksiyonların mekanizmalarının daha iyi yorumlanması için yararlı olan ekstremum (optimum substrat, $[S]_{opt}$ ve hız $v_{0,max}$) değerleri için Eşitlik (10) elde edilir:

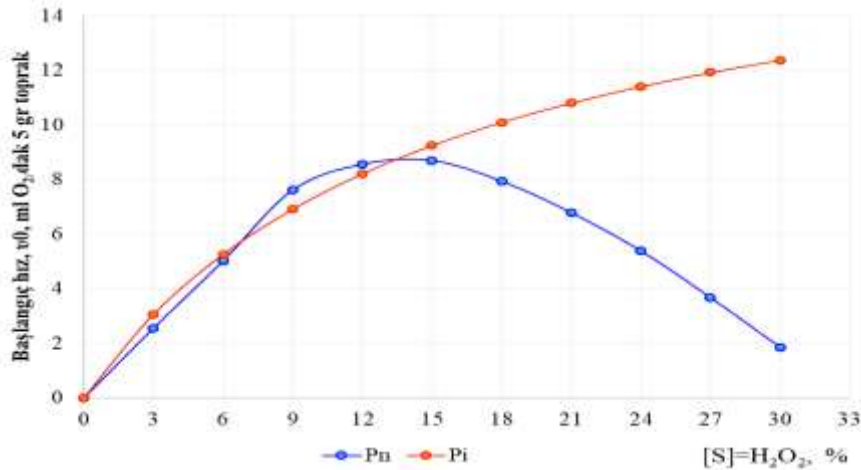
$$[S]_{0,opt} = \sqrt{K_M \cdot K_{ESS}}, \quad v_{max} = f([S]_{opt}) = \frac{V_{max}}{1 + 2\sqrt{K_M / K_{ESS}}} \quad (10)$$

Enzimatik reaksiyonların mekanizmalarının daha fazla yorumlanması için yararlı olan ekstremum (optimum substrat, $[S]_{opt}$ ve hız $v_{0,max}$) değerleri (10) nolu eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Bu değerler, Çizelge 8'de verilmiştir.

Çizelge 8. Deneme toprağının katalaz enzim reaksiyonunun ekstremum değerleri

Kinetik Parametreler						
V_{max}	K_M	V_{max}/K_M	K_{EES}	K_M/K_{EES}	$[S]_{opt}$	$v_{0,max}$
18.6950	15.3317	1.2194	9.8609	1.5548	12.2957	5.3508

Çizelge 7'deki kinetik parametrelerin değerleri kullanılarak inhibisyon yokluğunda ve varlığında kinetik eğrilerin akışını gösteren grafik Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Enzimatik reaksiyonun substrat inhibisyonu: Pn, inhibisyon yokluğunda beklenen hiperbolik eğri; Pi, substrat konsantrasyonlarının artmasıyla inhibisyonunda bir artış gösteren deneysel veriler

Araştırmada substrat konsantrasyonunun artmasıyla reaksiyon sonucu oluşan ürün miktarında azalma (inhibisyon) belirlenmiştir. Substrat konsantrasyonunun artmasıyla reaksiyon sonucu oluşan ürün miktarının azaldığını (inhibe olduğu-Pi) gösteren parabolik eğri ve inhibisyon olmadığı durumda ise konsantrasyonun artmasıyla ürün miktarının arttığını (Pn) gösteren hiperbolik eğri Şekil 1'de görülmektedir.

Sonuç

Araştırma sonuçları; substrat (H_2O_2) konsantrasyonu arttıkça, ürünün (O_2 'nin) azaldığı tespit edilmiş, substratın katalaz enzim reaksiyonunu engellediği (inhibe ettiği) gözlenmiştir. Başlangıç hızın belirlenmesi için, model seçim ölçütlerine göre en uygun modelin Binom-1 olduğu bulunmuştur. Substratın düşük ve yüksek konsantrasyon değerlerine karşılık gelen başlangıç hız değerleri kullanılarak kinetik parametreler hesaplanmıştır. Katalaz enziminin reaksiyonunu karakterize eden maksimum hız: $V_{max}= 18.695$ ml $O_2/1$ dak 5g toprak. $K_M= 15.3317$ %. $V_{max}/ K_M= 1.2194$ ve $K_{ESS}= 9.8604\%$ olduğu belirlenmiştir. Ayrıca. substratın optimum değerinde (12.2957 %) en yüksek başlangıç hızı ($U_{0,max}= 5.3508$ ml $O_2/1$ dak 5g toprak) ulaşılmıştır.

Ttopraklarda enzimatik reaksiyonların kinetiğinin incelenmesinde, kullanılan hız hesaplamasında enzimlerin aktivitesinin kullanılmasından farklı olarak, mutlaka başlangıç hızın hesaplanması gerekmektedir. Bunun yanında, kinetik parametrelerin hesaplamalarında grafiksel yöntemlerden farklı olarak paket programları (STATISTICA vb.) ile çalışılmalıdır.

Kaynaklar

- Aliev SA, Gadzhiyev DA, Mikaylov FD, 1981. Kinetic indexes of catalase activity in the main soil groups of Azerbaijan. *Soviet Soil Science*, 13, 29-35.
- Beck TH, 1971. Die messung der katalaseaktivitaet von Böden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 130.1. 68-81(in German).
- Blake GR, 1965. Bulk density. In: Black, C.A. (ed.), *Methods of Soil Analysis. Part II, American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin*, 374-390.
- Briggs GE, Haldane JBS, 1925.A note on the kinetics of enzyme action. *Bio-chem J.* 19(2): 338-339. <https://doi.org/10.1042/bj0190338>
- Cornish-Bowden A, 1976. *Principles of Enzyme Kinetics*. Butterworths, London and Mir Publishing, Moscow, 190 p.
- Edwards VH, 1970. The influence of high substrate concentration on microbial kinetics. *Biotechnol Bioeng*, 12, pp: 679-712. <https://doi.org/10.1002/bit.260120504>
- Gee GW, Bauder JW, 1986. Particle-size analysis. *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Minerological Methods. Second Edition. Agronomy*, 9, 383-441.
- Haldane JBS, 1930. *Enzymes*, London, Longmans Green, 28-53, 74-92.
- Hegyi G, Kardos J, Kovács M, Málnási-Csizmadia A, Nyitray L, Pál G, Radnai L, Reményi A, Venekei I, 2013. *Introduction to practical biochemistry*. Eötvös Loránd University.
- Keleti T, 1986. *Basic Enzyme Kinetics*, Akademiai Kiadb, Budapest.
- Khabirov IK, KuvatovYuG, 1990. Kinetics and Thermodynamics of the Hydrolysis Reaction of 14c-Labelled Carbamide in the Pre-Urals Soils, *Soviet Soil Science*, 22(8), 83 – 94.
- Khaziev FK, Agafarova YaM, 1976. Michaelis Constants of Soil Ferments, *Soviet Soil Science*, 8, 149 – 157.
- Lineweaver H, Burk D, 1934. The determination of enzyme disso-ciation constants, *J. Am Chem Soc.*, 56(3), 658 – 666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
- Mclean EO, 1982. Soil ph and lime requirement. *Methods of soil analysis part 2. Chemical and microbiological properties second edition. Agronomy*, 9, 199-224. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c12>
- Michaelis L, Menten ML, 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49 (352), 333-369.
- Mikailsoy FD, 2022. Influence of high substrate concentrations on catalase reaction in loam soil (Iğdir Province, Turkey). I. Theoretical foundations of the kinetics of enzymatic soil reactions. *Soil science and agrochemistry*, 3, 60-86. https://doi.org/10.51886/1999-740X_2022_3_60
- Panikov NS, Ksenzenko SM, 1982. Study of phosphohydrolase inhibition in sod-podzolic soil. *Soviet Soil Science*, 11, 43-49.
- Rhoades JD, 1983. Soluble salts. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties* 9: 167-179. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c10>
- Tabatabai MA, Bremner JM, 1971. Michaelis constants of soil enzymes. *Soil Biol. Biochem.*, 3(4), 317-323. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(71\)90041-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(71)90041-1)
- Tazdaıt D, Abdi N, Grib H, Lounici H, Pauss A, Mameri N, 2013. Comparison of different models of substrate inhibition in aerobic batch biodegradation of malathion. *Turk. J. Eng. Environ. Sci.*, 37, 221-230. <https://doi.org/10.3906/muh-1211-7>

- Tusat E, Mikailsoy F, 2018. An investigation of the criteria used to select the polynomial models employed in local GNSS/leveling geoid determination studies. *Arab J Geosci* 11, 801. <https://doi.org/10.1007/s12517-018-4176-0>
- Walkley A, Black LA, 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37 (1), 29–38. doi: <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>.
- Williams VR, Williams HB, 1973. *Basic physical chemistry for the life sciences*. Second Edition. Freeman and Company, San Francisco, 524.
- Yano T, Nakahara T, Kamiyama S, Yamada K, 1966. 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*, 30, 43-48. <https://doi.org/10.1080/00021369.1966.10858549>
- Yano D, Suzuki T, 2018. Kinetic Analyses of the Substrate Inhibition of Paramecium Arginine Kinase. *Protein J* 37, 581–588. <https://doi.org/10.1007/s10930-018-9798-2>
- Yun KI, Han TS, 2020. Relationship between enzyme concentration and Michaelis constant in enzyme assays, *Biochimie*, 176: 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.06.002>