

畚土壤에서 尿素的 分解樣相과 Urease 의 Kinetic 特性

曹康鎭*·崔 烜**

Urea Transformation and Kinetics of Soil Urease in Paddy Soils

K.J. Cho* and J. Choi**

ABSTRACT

A laboratory experiments were carried out to study the urea transformation and kinetics of soil urease in paddy soils with different properties.

Urea transformation in paddy soils followed first-order kinetics, the rate of urea hydrolysis and the first-order constant was higher in the soil with high total urease activity (TUA) and accumulated urease activity (AUA) than those with low TUA and AUA.

The values of Km and Vmax indicated that the Km values of accumulated urease in the soils were different in each soils and lower than that of microbial urease. However, the Km values of microbial urease were nearly same each other.

緒 言

土壤에 施用된 尿素肥料의 效率性面에서 가장 중요한 Ammonia의 揮散損失과 직접 關聯되는 尿素의 加水分解率에 影響을 주는 要因으로서는 土壤의 urease 活性^{13,30)}, 尿素 施肥量 및 施肥方法^{10,20,29)}, 尿素의 施肥位置^{6,7)}, 土壤의 pH^{7,15)}, 土壤水分含量^{1,6,20)}, 溫度^{8,11,29)} 等 여러가지 要因을 들 수 있으나 이 중에서도 urease 活性이 가장 重要한 因子로 알려져 있다.^{3,11,19,23,30)}

그러나, 土壤의 特性에 따라서 尿素의 分解樣相과 urease 의 Kinetic 特性이 多少 相異한 結果들을 보이고 있는데, Simpson과 Melsted²⁹⁾은 Illinois 土壤에서 尿素의 加水分解는 거의 일정한 比率로 分解되나 Vlek와 Carter²⁹⁾, Kumar 와 Wagenet¹⁰⁾들은 尿素의 加水分解는 1次反應을 따랐다고 하였다.

土壤에서 urease 의 Km 値에 대해서는 Tabatabai²⁹⁾는 1.3~7.0mM로서 土壤間에 差異가 있었으며, Ar-

dakani 들¹⁾은 2.1mM, Nor¹⁸⁾는 1.04~2.06 mM, Paulson과 Kurtz²⁹⁾은 57~252 mM urea라고 報告하

材料 및 方法

였는데 土壤의 特性과 測定方法에 따라서 상당한 差異가 있음을 볼 수 있다.

따라서, 本 研究은 土壤의 生成要因, 土層의 分化, 管理方法, 그리고 土壤內外의 環境要因이 다른 우리나라 土壤에서 尿素의 加水分解와 關聯한 urease 의 kinetic 特性을 究明하고자 實施하였다.

本 研究에 사용한 土壤은 表1에서와 같이 理化學性과 urease 活性이 相異한 畚土壤의 表土(0~15cm)를 採取하여 風乾後 2mm체를 통과한 細土를 試料로 使用하였다.

土壤의 理化學性 分析은 土壤化學分析法¹⁷⁾과 土壤學實驗⁹⁾에 準하였으므로 土性은 美國農務省分類基準²⁷⁾에 의하여 區分하였다. 그리고 土壤에 蓄積된 urease 의 活性

* 嶺南作物試驗場 (Yeongnam Crop Experiment Station, RDA, Milyang, Korea)

** 慶北大學校 農科大學 (Kyungpook National University, Taegu, Korea)

Table 1. Some chemical Properties and urease activity of the surface soil samples.

Soil samples	pH (1:5)	Organic carbon (%)	Total nitrogen (%)	Ex. Na (me/ 100g)	C. E. C. (me/ 100g)	Clay (%)	Urease activity ^{a)}		
							TUA	AUA	MUA ^{b)}
Gangseo SL	6.0	0.9	0.11	0.10	7.2	13.3	27.6	3.4	23.2
Honam SiCL	5.9	1.5	0.14	0.36	15.0	39.9	8.0	3.4	4.6
Jangcheon LS	6.6	0.4	0.04	0.10	6.9	5.5	2.5	1.6	0.9
Gwangpo SL ^{c)}	6.5	0.4	0.05	6.42	6.4	8.9	1.6	0.8	0.8

a) Expressed in μg of urea-N hydrolyzed/g of soil/hr. at 37°C

b) TUA ; Total urease activity, AUA ; Accumulated urease activity, MUA ; Microbial urease activity

c) Recent saline deposits

(AUA), 總 urease 活性(TUA), 및 微生物 分泌 urease 의 活性(MUA)은 曹들²⁾의 方法에 의하여 測定하였다.

尿素의 分解樣相과 1次反應速度 定數는 風乾土壤 5g을 100 ml 容量의 Erlenmyer flask에 秤取하고 toluene 處理 및 無處理로 區分하여 35.7mM/g of soil 相當의 尿素 水溶液 5 ml을 添加한 후 aluminum foil로 뚜껑을 하였다. 30°C에서 恒溫培養시키면서 4, 8, 16, 24, 48, 72, 144, 및 216時間마다 2M KCl-PMA 溶液 50 ml을 넣고 30分間 振盪한 후 濾過하여 濾液 中の NH₄⁺-N을 Indophenol blue 法³⁾으로 定量하여 土壤別 尿素의 分解速度를 推定하였다. 모든 分析은 2反復으로 하였으며 blank test도 併行하여 土壤에서 無機化되는 窒素를 定量하여 分析結果를 補正하였다. 그리고, 1次反應速度定數는 Kumar와 Wagent¹³⁾가 使用한 (1)式을 利用하여 計算하였다.

$$k = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{S_0}{S_t} \right) \dots\dots\dots (1)$$

여기서 k = first - order rate constant (h⁻¹), t = time (h), S₀ = initial urea concentration (μg N/g soil), 그리고 S_t = urea concentration at time t (μg N/g soil) 이다.

Km 및 Vmax 值 測定은 風乾土壤 5g을 100 ml 容量의 Erlenmyer flask에 넣은 후 toluene 處理 및 無處理 條件下에서 基質로서 尿素濃度を 1.8mM에서 57.6 mM 水準으로 5 ml씩 添加하여 37±1°C에서 恒溫培養한 후 尿素의 分解量을 測定하고¹⁴⁾ Lineweaver - Burk plot 方法을 使用하여 (2)式에서 Km 및 Vmax 值를 구하였다.^{2), 25)}

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \dots\dots\dots (2)$$

여기서 V는 反應速度(μg urea - N hydrolyzed/h/g soil)이며 [S]는 基質濃度이다.

結果 및 考察

1. 尿素의 分解樣相과 反應速度

Urease 活性이 相異한 4個 土壤에 toluene 處理 및 無處理條件에서 時間別로 尿素의 分解量을 測定한 結果는 表2와 같았다. Toluene 無處理에서는 總 urease 活性이 가장 높은 江西 砂壤土에서 尿素의 分解가 가장 빨라서 48時間에 거의 完全히 分解되었으며 湖南 微砂質壤土에서는 72時間이 所要되었다. 總 urease 活性이 낮은 長川 壤質砂土에서는 216時間 經過하여도 約 36% 程度밖에 分解되지 않았으며 總 urease 活性이 가장 낮은 鹽害畚인 廣浦 砂壤土에서는 約 24%가 分解되었다. 그리고 toluene 處理區는 toluene 無處理에 비하여 分解가 相當히 遲延되었으며 216時間 恒溫할 경우의 分解率은 江西 砂壤土에서는 約 81%였으나 湖南 微砂質壤土는 54%, 長川 壤質砂土는 15%, 鹽害畚인 廣浦砂壤土는 11% 程度로 낮은 편이었다.

또한, 基質에 대한 酵素의 反應速度를 구하기 위하여 表2의 結果를 利用하여 時間 t에 대한 尿素의 濃度 S_t를 그림1과 같이 plot한 結果, 高度의 有意한 直線回歸式을 얻을 수 있었다. 이 式을 利用하여 1次反應速度定數를 구한 結果, 尿素의 分解樣相과 마찬가지로 toluene 處理 및 無處理에 따른 差異도 컸지만 土壤에 따른 差異도 컸다(表4 參照).

이와같이 toluene 無處理時에는 總 urease 活性과 微生物 分泌 urease 活性이 높은 土壤에서 尿素의 分解가 빨랐는데 이는 恒溫 時間이 經過함에 따라 尿素分解性 微生物數의 增加에 따른 urease 活性의 增加에 起因한 것 같으며^{16), 20)}, 土壤間의 差異도 根本的으로 尿素分解性 微生物數의 差異에서 오는 것으로 생각된다. 그리고

Table 2. The concentration of hydrolyzed urea(S* in mM urea) in different soil series with different incubation time under waterlogged condition (soil : solution = 1 : 1).

Soil type	Treatment	Incubation period (hr.)							
		4	8	16	24	48	72	144	216
Gangseo SL	+T ^{a)}	0.5	0.9	1.4	3.5	4.0	6.1	19.2	28.9
	-T	0.7	5.3	21.3	30.4	35.5	-	-	-
Honam SiCL	+T	0.5	1.7	3.1	3.7	7.5	9.1	15.1	19.1
	-T	1.4	3.0	19.8	22.5	32.8	34.6	-	-
Jangcheon LS	+T	0.1	0.3	0.6	1.3	1.6	2.3	3.6	5.2
	-T	0.3	0.3	0.7	1.7	4.1	6.7	9.5	12.8
Gwangqpo SL	+T	0.04	0.13	0.22	0.58	0.93	2.2	2.7	4.0
	-T	0.07	0.16	0.24	0.69	1.98	2.5	5.2	8.4

* The "So" value is 35.7mM urea for all the soils.

a) "+T" and "-T" represent toluene added and toluene not added treatment, respectively.

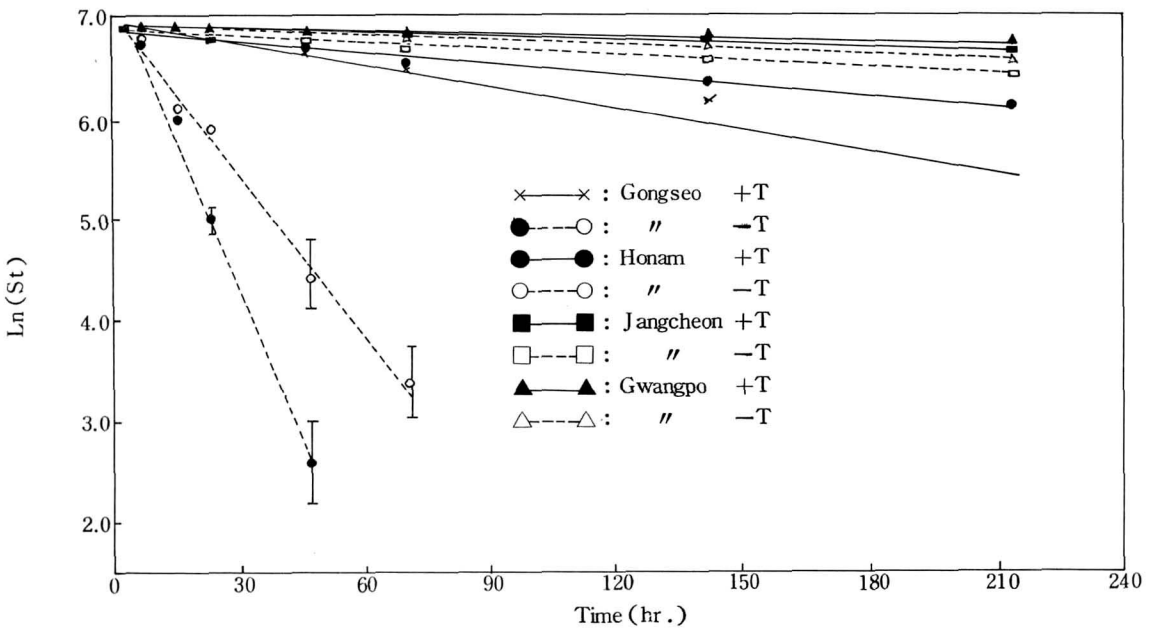


Fig. 1. Urea hydrolysis in various soils plotted for the determination of first - order rate constant with and without toluene treatment.

toluene의處理는 尿素의 分解를 遲延시켰는데 이는 尿素分解性 微生物의 増殖이 抑制됨으로써 순수하게 土壤에 蓄積된 urease에 의해서 尿素가 分解되면서 起因하며 AUA에 따라서 分解率도 달랐다. 또한, 分解速度와 關聯하여 1次反應速度定數를 구한 結果는 0.5~101.0 × 10⁻⁶ h⁻¹로서 Kumar 와 Wagenet¹⁰⁾, Beri 등²⁾의 報告와 같은 傾向이나 1次反應速度定數는 이들의 結果에 비해 多少 낮았는데 이는 그들이 使用한 土壤의 urease 活性이 本 研究에 供試한 土壤보다 높았던데 起

因된 것으로 여겨졌다.

2. Km 및 Vmax 値

尿素濃度別 urease 活性을 調査한 結果는 表3과 같이 대부분의 土壤에서 尿素濃도가 增加할수록 反應速度도 빨라졌다. 尿素濃도에 따른 反應速度 增加率은 toluene 處理에 비하여 無處理에서 더 컸으며 특히 TUA가 높은 江西 砂壤土에서 가장 컸다. 그러나 TUA 및 AUA가 낮은 長川 壤質砂土 및 廣浦 砂壤土에서는 增加率이 아주 적었다. 또한, Lineweaver - Burk plot 에

Table 3. Effect of urea concentrations on the reaction rate of soil urease in paddy soils.

Soil type	Treatment	Urea concentration (mM urea)					
		1.8	3.6	7.2	14.4	28.8	57.6
Gangseo SL	+T	2.2	3.2	3.5	3.7	4.3	5.1
	-T	2.8	3.6	5.0	8.2	15.3	27.4
Honam SiCL	+T	2.3	2.8	3.0	3.2	3.4	3.6
	-T	3.0	5.0	5.5	7.0	7.7	8.6
Jangcheon LS	+T	0.4	0.6	0.7	0.9	1.3	2.3
	-T	0.5	0.8	1.0	1.3	2.3	3.2
Gwangpo SL	+T	0.4	0.5	0.7	0.8	0.9	1.2
	-T	0.4	0.6	0.7	0.9	1.1	1.5

* "+T" and "-T" means toluene addition and non-addition, respectively.

의하여 Km과 Vmax 값을 구해 본 결과 表4에서 보는 것처럼 범주토양에서 총 urease의 Km 값은 3.83~8.13 mM urea 정도였으며 토양에 축적된 urease의 Km 값은 다소 낮아서 0.93에서 4.85 mM urea 정도로서 토양간에 차이가 심하였으나 微生物이 분비하는 urease의 Km 값은 19.05~22.48 mM urea로서 토양간에 차이가輕微하였으며 鹽害畚인 廣浦 砂壤土에서는 그 값이 아주 적어서 Km 값을 구할 수가 없었다. 그리고 Vmax 값은 1.01~14.04 μg urea-N hydrolyzed/g soil/hr. 정도로서 toluene 처리와 토양에 따라서 차이가 심하였다.

이로써 우리나라 범주토양에서는 토양에 축적된 urease

의 Km 값이 微生物 urease의 Km 값보다 적어서 尿素에 대한 親和力은 토양에 축적된 urease가 더 큼을 알 수 있었다. 또한, 微生物 urease의 Km 값은 토양간에 差異가 輕微한 것으로 보아서 우리나라 범주토양에서는 微生物이 분비하는 urease의 特性은 거의 같음을 알 수 있다. 그러나, 鹽害畚인 廣浦 砂壤土에서는 微生物 urease의 活性이 매우 낮아서 Km 값은 計算할 수 없었는데, 이는 鹽濃度가 높아서 微生物의 生育이 阻害됨에 따라서 酵素의 生成도 크게 抑制된 것으로 생각된다.⁹⁾ 그리고 토양에 축적된 urease의 kinetic 特性이 相異함은 有機物含量³⁰⁾과 粘土礦物의 形態와 量¹⁹⁾이 다르기 때문에 urease-有機-無機複合體의 構造와 安

Table 4. First-order rate constant, Km and Vmax values for urease activity in different paddy soils.

Soil type	Source ¹⁾ of urease	First-order rate constant k _{30°C} (x10 ⁻³ h ⁻¹)	Michaelis - Menten ²⁾ equation values	
			Km	Vmax
Gangseo SL	AU	7.2	1.93	4.63
	TU	101.0	8.13	14.04
	MU	-	19.63	5.29
Honam SiCL	AU	3.5	0.93	3.51
	TU	52.0	3.32	8.77
	MU	-	22.48	10.31
Jangcheon LS	AU	0.7	4.85	1.43
	TU	2.1	6.84	2.34
	MU	-	19.05	1.17
Gwangpo SL	AU	0.5	2.96	1.01
	TU	1.2	3.83	1.23
	MU	-	-	-

1) AU; Accumulated urease, TU; Total urease, MU; Microbial urease

2) Km; mM urea, Vmax; μg urea-N hydrolyzed/g soil/hr.

定性이 달라지기 때문인 것으로 생각된다.

摘 要

畚土壤에서 尿素的 分解樣相과 關聯한 urease의 kinetic 特性을 알기위해서 土壤의 理化學성과 urease 活性이 相異한 4個 土壤을 使用하여 toluene 處理 및 無處理 條件에서 時間別 尿素的 分解量과 尿素 濃度別 urease 活性을 測定한 結果는 다음과 같았다.

Toluene 無處理 條件에서는 總 urease 活性이 높은 江西 砂壤土에서 尿素的 分解가 가장 빨랐고 1 次反應速度定數와 Km 및 Vmax 值도 가장 높았으며 그 다음은 湖南 微砂壤土 > 長川 壤質砂土 > 廣浦 (鹽害畚) 砂壤土 順이었다. 그리고 toluene 處理는 全 土壤에서 尿素的 分解를 遲延시켰으며 土壤蓄積 urease 活性이 가장 느렸으며 1 次反應速度定數와 Km 및 Vmax 값도 가장 낮았다. 그리고 土壤에 蓄積된 urease 의 Km 值가 微生物 分泌 urease 의 Km 值보다 적었으며, 微生物 分泌 urease 의 Km 值는 土壤間에 差異가 輕微하였다.

引 用 文 獻

1. Ardakani, M.S., M.G. Volz and A.D. McLaren. 1975. Consecutive steady state reactions of urea, ammonium and nitrite nitrogen in soil, *Can. J. Soil Sci.*, 51: 339-350.
2. Beri, V., K.P. Goswami and S.S. Brar. 1978. Urease activity and its Michaelis constant for soil systems, *Plant and Soil*, 49: 105-115.
3. Bremner, J.M. and L.A. Douglas. 1971. Inhibition of urease activity in soils, *Soil Biol. Biochem.*, 3: 297-307.
4. 曹康鎭, 鄭鍊泰, 崔 炡. 1987. 畚土壤에서 尿素的 分解와 關聯한 urease 活性 評價, 農試論文集(植環·菌茸·農加) 29(1): 125 ~ 131.
5. 崔 炡, 金鼎濟, 中榮五. 土壤學實驗, 螢雪出版社, 大邱(1985).
6. Delaune, R.D. and Wm. H. Patrick, Jr.. 1970. Urea conversion to ammonia in waterlogged soils, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 34: 603-607.
7. Fenn, L.B. and S. Miyamoto. 1981. Ammonia loss and Associated Reactions of urea in calcareous soils, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45: 537-540.
8. Fisher Jr., W.B. and W.L. Parks. 1958. Influence of soil temperature on urea hydrolysis and subsequent nitrification, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 22: 247-248.
9. Frankenberger, Jr., W.T. and F.T. Bingham. 1982.

Influence of salinity on soil enzyme activities, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46: 1173-1177.

10. Ghobrial, G.I.. 1980. Effects of level, time, and splitting of urea on the yield of irrigated direct seeded rice, *Plant and Soil*, 56: 209-215.
11. Could, W.D., F.D. Cook and G.R. Webster. 1973. Factors affecting urea hydrolysis in several Alberta soils, *Plant and Soil*, 38: 393-401.
12. Kiss, S., M. Dragan-Bularda and D. Radulescu. 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil, *Adv. Agron.*, 27: 25-87.
13. Kumar, V. and R.J. Wagenet. 1984. Urease activity and kinetics of urea transformation in soils, *Soil Sci.*, 137: 263-269.
14. Lloyd, A.B. and M.J. Sheaffe. 1973. Urease activity in soils *Plant and Soil*, 39: 71-80.
15. Mikkelsen, D.S. and S.K. de Datta. Ammonia volatilization from wetland rice soils, 'Nitrogen and Rice', I.R.R.I., Manila, Philippines (1979) pp. 135-156.
16. Moe, P.G.. 1967. Nitrogen losses from urea as affected by altering soil urease activity, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 31: 380-382.
17. 農村振興廳. 1977. 土壤化學分析法, pp. 6 ~ 198.
18. Nor, Y.N. 1982. Soil urease activity and kinetics, *Soil Biol. Biochem.*, 14: 63-65.
19. Novozamsky, I., R. van Eck, J. Ch. van Schouwenburg and I. Walinga. 1974. Total nitrogen determination in plant material by means of the indophenol-blue method, *Neth. J. Agric. Sci.*, 22: 3-5.
20. Ovrrein, L.N. and P.G. Moe. 1967. Factors affecting urea hydrolysis and ammonia volatilization in soil, *Soil Sci. Amer. Proc.*, 31: 57-61.
21. Paulson, K.N. and L.T. Kurtz. 1969. Locus of urease activity in soil, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 33: 897-901.
22. Paulson, K.N. and L.T. Kurtz. 1970. Michaelis constant of soil urease, *Soil. Soc. Amer. Proc.*, 34: 70-72.
23. Pedrazzini, F.R. and R. Tarsitano. 1986. Ammonia volatilization from flooded soil following urea application, *Plant and Soil*, 91: 101-107.
24. Pettit, N.M., A.R.J. Smith, R.B. Freedman and R.G. Burns. 1976. Soil urease activity, stability and kinetic properties, *Soil Biol. Biochem.*, 8: 479-484.
25. Segal, I.H., *Biochemical calculations*, 2nd ed., John Wiley & Sons, INC. New York (1976) pp. 208-319.

26. Simpson, D.M.H. and S.W. Melsted. 1963. Urea hydrolysis and transformation in some Illinois soils, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 27: 48-50.
27. Soil survey staff. 1975. *Soil taxonomy: Soil conservation service U.S. Department of Agr. Hand book No. 436*, pp. 459-477.
28. Tabatabai, M.A. 1973. Michaelis constants of urease in soils and soil fractions, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 37: 707-710.
29. Vlek, P. L.G. and M.F. Carter. 1983. The effect of soil environment and fertilizer modifications on the rate of urea hydrolysis, *Soil Sci.*, 136: 56-63.
30. Watkins, S.H., R.F. Strand, D.S. DeBell and J. Esch, Jr.. 1972. Factors influencing ammonia losses from urea applied to northwestern forest soils, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 36: 354-347.
31. Zantua, M.I., L.C. Dumenil and J.M. Bremner. 1977. Relationships between soil urease activity and other soil properties, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41: 350-352.