

• 研究简报 •

② 玉米淀粉酶催化糖化的反应动力学模型

109-111

A Kinetic Model of Saccharification Reaction Enzyme-catalysed in Corn Starch

TS245.4

刘社际

Liu Sheji

谭辉玲

Tan Huiling

(重庆大学化学化工学院, 重庆, 630044, 第一作者 29岁, 男, 硕士)

A 摘要 发现玉米淀粉的酶糖化反应, 可以用酶的三态模型描述, 而且该反应具有单底物酶动力学特征。用三态模型导出的反应动力学模型式计算反应速度等参数, 其计算结果和实验数据基本一致。

关键词 淀粉糖化; 淀粉酶; 反应动力学方程 / 酶三态模型

中国图书资料分类法分类号 TS23

催化. 玉米淀粉

葡萄糖

ABSTRACT The results of this paper show that a three-state enzyme catalysis model can fit the saccharifying of corn starch by diastase. In addition, this reaction has characteristics of single-substrate reaction kinetics. Experimental data are better accordant with the results calculated by the model.

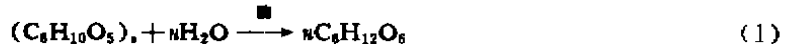
KEYWORDS starch saccharification; amylases; reaction kinetics equations / enzymic three states-model

0 引 言

淀粉作为一种工业原料, 已被广泛应用。其中经发酵生产葡萄糖、酒甚至甘油等, 已先后工业化。如何提高糖化收率, 优化糖化工艺条件, 一直是人们关注的重要问题。因而, 与此有关的淀粉化学基础研究, 应受到重视。笔者就玉米淀粉经酶催化的糖化反应速率与底物浓度、pH 和温度的关系, 选择了一种动力学模型。

1 淀粉糖化反应动力学模型

淀粉在酶催化下水解生成葡萄糖的总反应为:



现假设它具有单底物酶促反应特征,



其中 k_1 : 中间复合物 ES 的形成速率常数;
 k_{-1} : 中间复合物 ES 的分解速率常数;
 k_2 : 产物形成速率常数;
 E: 酶; S: 底物。

据稳态学说, 得出糖化反应速率 v

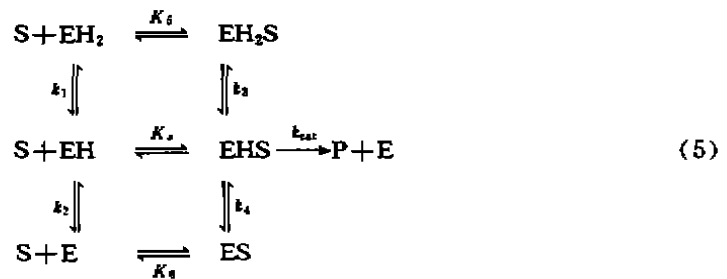
$$v = \frac{V_m \rho_S}{k_m + \rho_S} \quad (3)$$

其中 $k_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$; V_m 是最大反应速率; ρ_S 是底物质量浓度; k_m 是米氏常数。公式(3)反映了底物浓度和温度(通过各个 k_i) 对糖化反应速率的影响。

假定糖化酶在最适 pH 环境下, 活性最高的结构状态是 EH, 在 pH 值变高后结构状态变为 E^- , 而在 pH 降低后为 EH_2 (即三态模型):



同时, 假定由最适结构态 EH 和底物 S 结合的复合物 (EHS) 形成产物 P 的速率大大慢于 H^+ 的解离和结合。则存在下列平衡过程:



各 K_i 是各反应相应的解离常数, k_{cat} 是产物生成速率常数。由于 $(S + EH) - EHS - EH_2S$ 和 $(S + EH) - (S + EH_2) - EH_2S$ 两条路线始终态相同, 所以, k_1, k_3, k_2 和 k_4 等 4 个常数中仅 3 个是独立的。同理, k_2, k_3, k_4 和 k_5 中也仅 3 个是独立的。据此, 经推导得出产物形成反应速率

$$v = \frac{dp}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot (E)_0 \cdot \rho_S}{(1 + (H^+)/k_1 + k_2/(H^+))k_3 + (1 + (H^+)/k_3 + k_4/(H^+))\rho_S} \quad (6)$$

假定表观最大速率为 V'_m , 表观米氏常数为 K'_m , 则有表观米氏方程式

$$v = \frac{V'_m \rho_S}{K'_m + \rho_S} \quad (7)$$

式中 $V'_m = V_m / (1 + (H^+)/k_3 + k_4/(H^+))$

$$K'_m = k_3 (1 + (H^+)/k_1 + k_2/(H^+)) / (1 + (H^+)/k_3 + k_4/(H^+))$$

2 实验方法与结果

2.1 药品和设备

葡萄糖和 3,5-二硝基水杨酸等为分析纯试剂。糖化酶为河北邢台市酶制剂厂产品。淀粉是市售玉米淀粉。主要仪器: 721 分光光度计(四川仪表九厂出品); 超级恒温池(重庆试验

设备厂产品);秒表;pH 酸度计(上海第二分析仪器厂,pH S-3 型)。

葡萄糖作为分析时的标准物质,在使用前经过干燥除水。

2.2 葡萄糖浓度测定法

采用分光光度法^[1]测定淀粉水解产物葡萄糖的浓度。3,5-二硝基水杨酸溶液与还原糖溶液共热后被还原为棕红色氨基化合物,在 λ_{520} 有特征吸水峰。在葡萄糖浓度和吸光度 A_{520} 关系呈线性的范围内作标准工作曲线和进行样品测定,所用公式有

$$\text{葡萄糖浓度} \quad C = -0.209 + 1.862A \pm 0.012 \quad (8)$$

(拟合相关系数 $R = 0.999$)

2.3 酶活力和最适宜温度的测定

按照萃取化学公司法^[2],从在醋酸盐缓冲液(pH = 5.0)中测得的糖化酶比活力得知,该酶的最适温度为 60°C。

2.4 反应速率和动力学模型参数测定

在最适温度和 pH = 5.0 的缓冲溶液中测定不同时间的葡萄糖浓度,由过程曲线得出初速率,据 Woolf-Augustinsson-Hofstee 图解法得出

$$V_m = 13.4 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_m = 4.22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

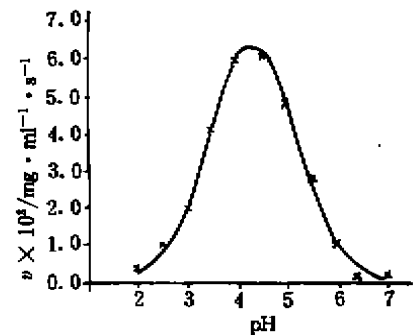
用 HCl 或 NaOH 溶液调节淀粉试样溶液的 pH 值,其它条件不变,测定相应条件下的水解反应初速率,采用 Levenberg-Marquandt 方法^[3],经计算机拟合,得出三态模型式(6)的 6 个参数。

$$k_{cat} = 2.95 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}; \quad k_1 = 3.98 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$k_2 = 3.0 \times 10^{-3}; \quad k_3 = 1.37 \times 10^{-5}$$

$$k_4 = 2.0 \times 10^{-4}; \quad k_5 = 2.6 \times 10^{-6}$$

pH- v 模型计算值和实验值的一致情况,见附图。



附图 pH 和糖化反应速率 v 的关系
— 三态模型计算曲线(据式(6));
× 实验值

3 结 语

淀粉经酶催化的水解(或俗称糖化)反应,原是一个复杂的多步反应体系。经实验发现它具有单底物酶促反应特征,可用表观米氏方程式(7)表示它的酶反应动力学。而且,糖化酶在三态模型适用于该体系,导出的动力学模型式(6)为淀粉糖化反应动力学的研究提供了一个可行的方法,据实验数据求出的玉米淀粉在本文实验条件下的表观常数 V_m 和 k_m 以及拟合参数 k_1, k_2, k_3, k_4, k_5 和 k_{cat} 等为玉米淀粉糖化工艺提供了一组可供参考的工艺参数。

参 考 文 献

- 1 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术. 北京:人民教育出版社,1982. 9~11
- 2 Stellmach B 著. 酶的测定方法. 钱嘉渊译. 北京:中国轻工业出版社,1992. 40~42
- 3 王树森. 化学工程计算方法. 北京:化学工业出版社,1989. 338~367