

· 研究简报 ·

23 125-130

一级反应网络法求 单底物酶促反应的米氏常数

王静 王刚 刘武钧 魏泽英 谭辉玲

(重庆大学化学化工学院, 重庆, 400044, 第一作者 22 岁, 女, 学士)

Q556.2

摘要 以可溶性淀粉为底物, 研究了糖化酶(EC 3.2.1.3)的动力学规律。淀粉水解反应具有单底物酶促反应的特征, 且当 $[s] \ll K_m$ 时, 服从拟一级反应规律。根据一级反应网络理论, 采用单纯形加速法拟合酶促淀粉水解反应的过程曲线求各速率常数和米氏常数。

关键词 一级反应网络理论; 单纯形加速法; 速率常数; 米氏常数

中国图书资料分类法分类号 Q556.2

0 引言

糖化酶

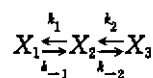
一级反应网络法

~~酶促反应~~ 淀粉, 水解

研究酶反应动力学对了解酶的作用机制, 确定反应条件, 选择合适的生产工艺及反应器的设计都有重要的意义。目前大量文献报道了根据米氏常数, 采用温度跃迁法, 停留法求速率常数^[1], 但由于涉及快速反应技术, 对实验仪器的精度要求很高。笔者提出了一种根据一级反应网络理论, 运用计算机和数值计算技术, 仅用常规的实验方法就能得到各基元反应速率常数的一级反应网络法, 且无需测定初速率即可得到米氏常数。

1 一级反应网络模型^[2]

对下列可逆反应



相应的久期方程

$$\begin{vmatrix} k_1 - \lambda & -k_1 & 0 \\ -k_1 & k_{-1} + k_2 - \lambda & -k_2 \\ 0 & -k_2 & k_{-2} - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

方程的根

$$\lambda_1 = 0, \quad \lambda_2 = (p - q)/2, \quad \lambda_3 = (p + q)/2$$

其中

* 收文日期 1997-07-07

$$p = k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}, q = [p^2 - 4(k_1k_2 + k_{-1}k_{-2} + k_1k_{-2})]^{1/2}$$

设初始条件 $X_1(0) = A_0, X_2(0) = X_3(0) = 0$, 得:

$$X_1(t) = A_0 \left\{ \frac{k_{-1}k_{-2}}{\lambda_2\lambda_3} + \frac{k_1(k_2 + k_{-2} - \lambda_2)}{\lambda_2(\lambda_3 - \lambda_2)} \exp(-\lambda_2 t) + \frac{k_1(\lambda_3 - k_2 - k_{-2})}{\lambda_3(\lambda_3 - \lambda_2)} \exp(-\lambda_3 t) \right\}$$

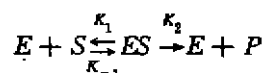
$$X_2(t) = A_0 \left\{ \frac{k_1k_{-2}}{\lambda_2\lambda_3} + \frac{k_1(\lambda_2 - k_{-2})}{\lambda_2(\lambda_3 - \lambda_2)} \exp(-\lambda_2 t) + \frac{k_1(k_{-2} - \lambda_3)}{\lambda_3(\lambda_3 - \lambda_2)} \exp(-\lambda_3 t) \right\}$$

$$X_3(t) = A_0 \left\{ \frac{k_1k_2}{\lambda_2\lambda_3} - \frac{k_1k_2}{\lambda_2(\lambda_3 - \lambda_2)} \exp(-\lambda_2 t) + \frac{k_1k_2}{\lambda_3(\lambda_3 - \lambda_2)} \exp(-\lambda_3 t) \right\}$$

淀粉在糖化酶催化下水解生成葡萄糖:



是一个多步骤,多中间产物的复杂反应。本课题组前期工作^[3]发现它具有单底物酶促反应特征。可用下式表示:



把一个复杂的多步骤反应合理简化,但各速率常数并不是真正的基元反应速率常数,在化学动力学上常称为“表观速率常数”。而生化反应工程上仍把它们称为速率常数,把有传质阻力影响时的速率常数称为“表观速率常数”。

米氏方程:

$$v = \frac{V_m[s]}{K_m + [s]}$$

米氏常数 $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, 最大反应速率 $V_m = k_2 \cdot e$ 。当 $[s] \ll K_m$ 时, 上式服从拟一级反应规律。

根据一级反应网络理论, 且当 $t = 0$ 时, $c_{\text{底}} = c_0, c_{\text{酶}} = 0$, 有

$$c_{\text{底}}(t) = c_0 \left\{ \frac{k_1(k_2 - \lambda_1)}{\lambda_1(\lambda_2 - \lambda_1)} \exp(-\lambda_1 t) + \frac{k_1(\lambda_2 - k_2)}{\lambda_2(\lambda_2 - \lambda_1)} \exp(-\lambda_2 t) \right\}$$

$$c_{\text{酶}}(t) = c_0 \left\{ \frac{k_1k_2}{\lambda_1\lambda_2} - \frac{k_1k_2}{\lambda_1(\lambda_2 - \lambda_1)} \exp(-\lambda_1 t) + \frac{k_1k_2}{\lambda_2(\lambda_2 - \lambda_1)} \exp(-\lambda_2 t) \right\}$$

式中

$$\lambda_1 = \alpha(1 - \sqrt{1 - g}), \lambda_2 = \alpha(1 + \sqrt{1 - g})$$

$$\alpha = (k_1 + k_{-1} + k_2)/2, \beta = k_1k_2$$

$$g = \beta/\alpha^2$$

当 k_{-1} 大大地大于 k_1 或 k_2 时

$$\lambda_1 \approx k_1 k_2 / (k_1 + k_2 + k_{-1})$$

$$\lambda_2 \approx k_1 + k_{-1} + k_2$$

2 单纯形加速法*

所谓单纯形,就是指在一定空间中最简单的几何图形。非线性规划中的单纯形法是从顶点着手寻优的。以二元函数 $f(x_1, x_2)$ 求极小值为例。

在二维平面空间中选择 P_G, P_H, P_L 三个点构成单纯形三角形。设这三个顶点对应的函数值为 f_G, f_H, f_L , 比较这三个函数值的大小, 找出最大点(假设为 P_H) 次大点(P_G) 和最小点(P_L)。设想最佳点可能在最差点 P_H 的对称位置上, 因此将 P_G, P_L 边线 $\overline{P_G P_L}$ 的中点 P_F 与 P_H 点连接并延长到 P_F 方向, 在此方向上找 P_H 的对称点 P_R , 让 $\overline{P_H P_F} = \overline{P_F P_R}$ 。然后去掉 P_H 点, 用 P_G, P_L, P_R 构成一新的三角形, 再比较反射, 一直搜索下去。

在 P_R 的位置初步确定后, 比较 f_R 和 f_G , 若 $f_R \leq f_G$, 反射是成功的, P_R 可最终确定。若 $f_R > f_G$, 说明重点不好, 可往回压缩到 P_S 点, 使 P_S 点好于 P_G 点即可。如果 $f_R < f_G$, 则最优点可能在此方向上, 因此, 可加大步长, 将 P_R 点外移到 P_S 点, 这种加大步长或压缩步长的做法, 大大加快了单纯形法的搜索速度, 因而称为单纯形加速法。

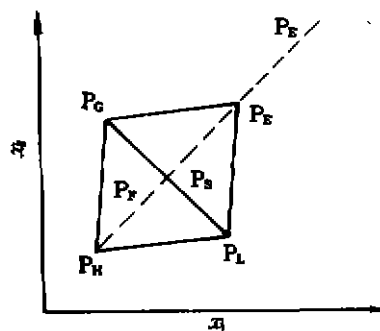


图 1 单纯形加速法

3 实验方法与结果

3.1 药品和设备

所有分析试剂为分析纯。糖化酶为河北邢台市酶制剂厂出品, 淀粉为四川省彭州市军乐化工厂产品。

主要仪器: 721 型分光光度计(四川仪表九表), 超级恒温槽(重庆实验设备厂)。

3.2 淀粉浓度的测定

淀粉与碘试剂反应生成蓝色物质, 该物质在 600 nm 处有特征吸收峰。笔者成功地将其用于定量分析, 制得标准曲线 ($c_{\text{淀}} = 0.0012 + 0.0789 \times A \pm 0.0003$), 相关系数 $r = 0.999$ 。

3.3 葡萄糖浓度的测定

淀粉经过很多中间物水解生成葡萄糖。根据 3,5-二硝基水杨酸溶液与葡萄糖共热后被还原成红棕色的氨基化合物在 520 nm 处有特征吸收峰。在一定范围内, 葡萄糖浓度与红棕色化合物的颜色深浅成一定比例关系。制得标准曲线 $c_{\text{葡}} = -0.0072 + 0.1468 \times A \pm$

* 谭世语, 周志明. 化学化工计算机应用基础. 重庆: 重庆大学化工学院, 1991.5 ~ 29

0.0018, 相关系数 $r = 0.996$.

3.4 反应条件的确定

采用萃取化学公司法测得温度-酶活力曲线, pH-酶活力曲线, 得糖化酶的最适温度范围为 $60 \sim 65^\circ\text{C}$, 最适 pH 值为 4.5. 本实验选反应温度 60°C , pH 值为 4.5.

3.5 过程曲线的测定和速率常数的确定

过程曲线是指反应物, 产物浓度随反应时间 t 的变化关系曲线. 在淀粉浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 最适温度 60°C , 最适 pH 4.5 条件下, 反应服从拟一级反应规律. 测定反应的葡萄糖过程曲线和淀粉过程曲线. 用碘试剂检验淀粉水解完全与否.

表 1 自由糖化酶的淀粉浓度 $c_{\text{淀}}$ 与时间 t 的关系

t/min	0.0	1.0	2.0	4.0	6.0	11.0	16.0	21.0	31.0	41.0	61.0
$c_{\text{淀}}/\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$	1.612	1.067	0.727	0.378	0.269	0.149	0.131	0.120	0.106	0.070	0.024
$c_{\text{淀}}^*/\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$	1.612	1.019	0.768	0.437	0.249	0.150	0.128	0.118	0.104	0.067	0.030

$c_{\text{淀}}^*$ 拟合浓度是指将拟合淀粉过程曲线测定值所得 k_1, k_{-1}, k_2 值代入 $c_{\text{淀}}(t)$ 公式后, 算出 t 时刻对应的浓度值.

表 2 自由糖化酶的葡萄糖浓度 $c_{\text{葡}}$ 与时间 t 的关系

t/min	0.0	0.5	1.5	3.5	5.5	10.5	15.5	20.5	30.5	40.5	50.5
$c_{\text{葡}}/\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$	0.199	0.411	0.667	0.965	1.127	1.508	1.631	1.668	1.748	1.797	1.797
$c_{\text{葡}}^*/\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$	0.199	0.328	0.557	0.914	1.169	1.533	1.691	1.759	1.801	1.809	1.809

$c_{\text{葡}}^*$ 拟合浓度是指将拟合葡萄糖过程曲线测定值所得 k_1, k_{-1}, k_2 值代入 $c_{\text{葡}}(t)$ 公式后, 算出 t 时刻对应的葡萄糖浓度值.

用一级反应网络法, 通过设定淀粉的目标函数为:

$$F_S = \left[S_t - c_0 \left\{ \frac{k_1(k_2 - \lambda_1)}{\lambda_2(\lambda_2 - \lambda_1)} \exp(-\lambda_1 t) + \frac{k_1(\lambda_2 - k_2)}{\lambda_2(\lambda_2 - \lambda_1)} \exp(-\lambda_2 t) \right\} \right]^2$$

葡萄糖的目标函数为:

$$F_P = \left[P_t - 0.199 - c_0 \times \left\{ \frac{-k_1 k_2}{\lambda_1(\lambda_2 - \lambda_1)} \exp(-\lambda_1 t) + \frac{k_1 k_2}{\lambda_2(\lambda_2 - \lambda_1)} \exp(-\lambda_2 t) \right\} \right]^2$$

求目标函数最小, 分别拟合淀粉过程曲线和葡萄糖过程曲线测定值得各速率常数见表 3.

根据 $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$;

从淀粉过程曲线拟合得:

$$K_{m1} = 5.20 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$$

表 3 拟合得各速率常数

速率常数	$k_1/\text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$	k_{-1}/s^{-1}	k_2/s^{-1}
淀粉拟合	2.213	11.410	0.0292
葡萄糖拟合	1.910	12.60	0.0212

从葡萄糖过程曲线拟合得:

$$K_{m2} = 6.61 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$$

因淀粉测定方法本身的缺点, 所得结果不够准确, 葡萄糖的测定更经典, 可靠。

3.6 米氏常数的测定

米氏曲线就是表示反应的初速率与底物浓度关系的曲线。测得不同底物浓度时的初速率, 以反应初速率 v 对底物浓度 c 作图, 即得米氏曲线, 如图 2。

用双倒数作图法(以 $1/v$ 对 $1/s$ 作图), Hanes 作图法(以 c/v 对 c 作图), Eadie-Hofstee 作图法(以 v 对 v/s 作图), 采用最小二乘法进行线性拟合, 由截距和斜率求得 K_m 和 V_m ; 采用单纯形法, 根据测定的 v 和 c 直接拟合米氏方程得 K_m , 结果见表 4。

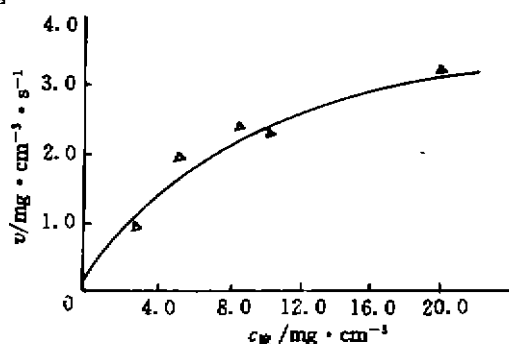


图 2 米氏曲线

— 拟合曲线; $\Delta\Delta\Delta$ 实验值

表 4 各种方法求得的 K_m 、 V_m

方法	双倒数作图法	Hanes 作图法	Eadie-Hofstee 作图法	单纯形拟合法
自由酶 $K_m/\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$	9.34	7.34	6.530	6.79
$V_m/\text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$	0.046 0	0.040 5	0.038 4	0.039 9

4 讨 论

1) 糖化酶催化淀粉水解的反应具有单底物酶促反应特征。文献报导^[4~6]该体系的 K_m 在 $6.0 \sim 10.0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ 之间。本课题组前期工作也证明在底物浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$, 该反应具有拟一级反应特征, 服从拟一级反应规律。该系统适用于一级反应网络法拟合其过程曲线求各速率常数。

2) 在几种求 K_m 的方法中, Dowd 研究认为, 双倒数法因图形点的分布集中在坐标左下方, 且低底物浓度的点因取倒数后误差较大, 外推得的结果不太准确; Hanes 法也因外推所得结果偏差较大; Eadie-Hofstee 法对偏离线性关系较敏感, 只要作出图是线性的, 所得的结果就比较可靠。单纯形拟合法直接拟合实验数据和米氏方程, 在无明显偏离线性的情况下也比较可靠。

3) 由实验结果各表中可看出, 用一级反应网络法拟合淀粉过程曲线和葡萄糖过程曲线的测定值得到的各相应速率常数基本一致; 且把拟合得到的各速率常数值代入 $c_{\text{淀}}(t)$ 和 $c_{\text{葡}}(t)$ 计算式所得的各过程曲线拟合值与实验测定值也基本吻合; 由拟合葡萄糖过程曲线得到各速率常数值计算得到的 K_m 值与用 Eadie-Hofstee 作图法和单纯形拟合法处理米氏曲线得到的 K_m 值也基本一致。由此得出结论: 根据一级反应网络理论, 采用单纯形加速法拟合单底物酶促拟一级反应的过程曲线求各速率常数的一级反应网络法是可行的, 可靠的。尤其是该法避免了传统方法必须通过测初速率来确定米氏常数的繁琐实验操作以及快速反应技术测

各速率常数对仪器高精度的要求,而仅用常规实验操作和计算机数值处理技术就可求得各速率常数和米氏常数。淀粉的酶促水解反应本身是一个复杂的,多中间产物,多步骤的反应,根据其具有单底物酶促反应特征和低底物浓度下服从拟一级反应规律的特点,采用此法得到较满意的结果。对于真正的基元一级反应,此法更是一种好方法。

参 考 文 献

- 1 袁勤生,赵健,王维育. 应用酶学. 上海:华东理工大学出版社,1994. 136~157
- 2 笛野高之著. 基元反应动力学. 谭辉玲等译编. 重庆:重庆大学出版社,1989. 10~13
- 3 刘社际,谭辉玲. 发酵甘油生产工艺(1)及其糖化动力学模型:[学位论文]. 重庆:重庆大学化学化工学院,1995
- 4 Schafhauser D Y, Storey K B. Immobilization of amyloglucosidase onto granular chicken bone. Appl Biochem Biotechnol, 1992, 32(1): 89~109
- 5 Storey K B, Duncan J A. Immobilization of amyloglucosidase using two forms of polyurethane polymer. Appl Biochem Biotechnol, 1990, 23(3): 221~236
- 6 Balasubra K. Kinetics studies on soluble and immobilized α -amylase and glucoamylase. J Chem Technol Biotechnol, 1991, 51(2): 263~272

Determination of the Michaelis Constant of Single-Substrate Enzyme-catalysed Reaction by the First-order Reaction Network Theory

Wang Jing Wang Gang Liu Wujun Wei Zeying Tan Hailing

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University)

ABSTRACT The kinetics of free glucoamylase (E C 3. 2. 1. 3) was studied with soluble starch as substrate. The hydrolysis reaction of soluble starch has the characteristics of single-substrate enzyme-catalysed reaction and when $[s] \ll K_m$, it obeys the law of apparent first-order reaction. According to the first-order reaction network theory, the time course of the starch hydrolysis and the glucose production have been dealt with and the apparent rate constants and michaelis constant are obtained by making use of the simple acceleration method.

KEYWORDS the first-order reaction network theory; simple acceleration method; rate constants; Michaelis constant