

• 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.

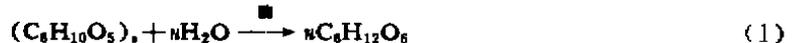
**KEYWORDS** starch saccharification; amylases; reaction kinetics equations / enzymic three states-model

## 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  $v$

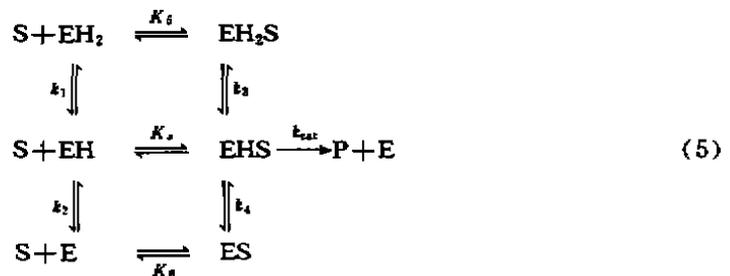
$$v = \frac{V_m \rho_S}{k_m + \rho_S} \quad (3)$$

其中  $k_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ ;  $V_m$  是最大反应速率;  $\rho_S$  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<sup>[1]</sup>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 $\lambda_{520}$ 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<sup>[2]</sup>,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℃。

## 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

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

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

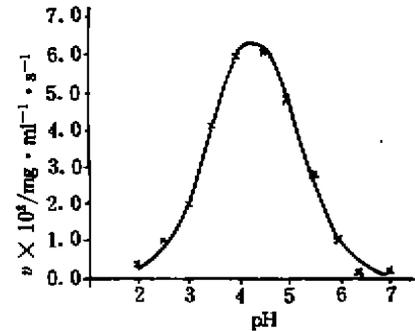
用HCl或NaOH溶液调节淀粉试样溶液的pH值,其它条件不变,测定相应条件下的水解反应初速率,采用Levenberg-Marquandt方法<sup>[3]</sup>,经计算机拟合,得出三态模型式(6)的6个参数。

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

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

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

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