

荞麦淀粉的真菌淀粉酶酶解动力学研究

张国权¹, 史一一¹, 魏益民^{1,2*}, 欧阳韶晖¹

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 2. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100094)

摘要: 为掌握真菌 α -淀粉酶对荞麦淀粉的酶解特性, 该文研究了不同底物浓度、酶浓度、pH 值及温度对水解反应速率的影响, 运用米氏方程对水解动力学过程进行描述和拟合, 用 Lineweaver-Burk 和 Wilkinson 统计法求解动力学参数。结果表明, 真菌 α -淀粉酶对荞麦淀粉的水解反应初期遵循一级反应规律, 可用米氏方程对水解动力学过程进行描述和拟合, 在酶浓度为 0.5 U/mL、pH 值 5.5、温度为 55℃ 时米氏常数 K_m 为 5.470 mg/mL, 最大反应速率 V_m 为 1.587 mg/(mL·min)。确立的包括底物浓度、酶浓度、水解温度在内的荞麦淀粉酶水解动力学模型, 在 303.15~333.15 K 的温度范围内适用。

关键词: 荞麦淀粉; 真菌 α -淀粉酶; 酶解; 动力学

中图分类号: TS201.2⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2007)5-042-05

张国权, 史一一, 魏益民, 等. 荞麦淀粉的真菌淀粉酶酶解动力学研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 42-46.

Zhang Guoquan, Shi Yiyi, Wei Yimin, et al. Kinetics of buckwheat starch enzymatic hydrolysis with fungal- α -amylase[J]. Transactions of the CSAE, 2007, 23(5): 42-46. (in Chinese with English abstract)

0 引言

淀粉的水解程度直接受淀粉种类、淀粉酶类型及水解条件的影响。淀粉酶在水解反应中不能改变反应的平衡, 但可以加快反应速度。因此, 在实际生产中要充分发挥酶的催化作用, 以较低的成本生产出较高价值量的产品, 就必须准确掌握酶促反应条件。影响酶促反应的主要因素主要包括底物浓度、酶浓度、反应温度、pH 值、反应时间等。用米氏方程(Michaelis-Menten equation)可以确定酶反应速度与底物浓度之间的关系^[1-4]。应用中温 α -淀粉酶、耐高温 α -淀粉酶对玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉等进行水解动力学的研究已多见报道^[2-8]。荞麦淀粉的理化特性与薯类淀粉、其他谷物淀粉等存在明显差别, 猪胰腺 α -淀粉酶和真菌 α -淀粉酶对荞麦淀粉的水解效率较高^[9-12], 但受其淀粉糊化时吸水膨胀能力强、黏度高的影响以及先糊化后液化水解工艺条件的限制, 荞麦淀粉水解时底物淀粉乳液的浓度还很低。因此, 本试验利用真菌 α -淀粉酶系统研究了底物浓度、酶浓度、pH 值及反应温度对荞麦淀粉水解速率的影响, 并用数学方法进行模拟, 以期推导出真菌 α -淀粉酶水解荞麦淀粉的动力学模型, 为荞麦淀粉的水

解及工业化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

荞麦淀粉: 宁夏泽发荞麦制品有限公司提供, 实际测得淀粉含量为 72.45%;

真菌 α -淀粉酶: Novo 公司产, 实测酶活力为 12500 U/g。

1.2 试验方法

1) 荞麦淀粉溶液的制备: 准确称取一定量的荞麦淀粉, 置于 25 mL 的具塞试管中, 加入 8 mL 蒸馏水, 于沸水浴中加热糊化 30 min, 加热时不断振荡, 取出后定容至 8 mL 刻度处。

2) 酶液的制备: 准确称取 0.16 g 真菌 α -淀粉酶, 用 pH 值 5.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液溶解, 并定容至 100 mL, 即得 20 U/mL 的酶溶液, 使用时按要求稀释至不同浓度。

3) 水解试验: 取浓度为 5 mg/mL 荞麦淀粉溶液, 加入 pH 值 5.5 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液 2 mL, 摇匀后加 0.5 mol/L 的 CaCl₂ 溶液 0.5 mL, 于 55℃ 水浴中保温预热 5 min, 加 0.5 mL 酶液, 使反应液的酶浓度达到 0.5 U/mL, 反应 5 min 后取出, 沸水浴 5 min 钝化酶, 使反应中止, 冷却后离心, 取上清液测定还原糖含量, 并按下式计算反应 5 min 时的反应速率 r_p 。每组试验重复两次取平均值。

$$r_p = \frac{\text{还原糖含量}}{\text{溶液体积} \times \text{反应时间}}$$

研究底物浓度、酶浓度、pH 值及温度对反应速率

收稿日期: 2006-06-03 修订日期: 2007-05-05

基金项目: 西北农林科技大学校重点科研项目(20030203085)

作者简介: 张国权(1968-), 男, 副教授, 主要从事谷物品质评价及淀粉深加工利用研究。杨凌 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 712100。Email: zhanggq98@126.com

*通讯作者: 魏益民(1957-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事农产品质量与安全研究。北京 中国农业科学院农产品加工研究所, 100094。Email: Weiyimin35@126.com

的影响时, 在控制其他因素条件不变的情况下, 根据要求分别改变淀粉溶液浓度、反应液酶浓度、缓冲溶液 pH 值及温度, 按上述方法进行水解试验。

4) 还原糖测定: 费林氏直接滴定法^[13, 14]。

2 结果与分析

2.1 底物浓度对反应速率的影响

在荞麦淀粉溶液浓度分别为 2、2.5、5、10、15、20、30 mg/mL 时进行水解, 不同底物浓度下的反应速率如图 1 所示。由 $\ln r_p$ 对 $\ln [S]$ 作图得到图 2 所示直线, 可以认为在加酶后很短的时间内真菌 α -淀粉酶降解荞麦淀粉遵循一级反应规律^[15]。由图 1 曲线可以看出, r_p 对 $[S]$ 呈典型的双曲线关系, 符合经典表征酶促反应特征的米氏方程所绘制的曲线形状, 表明真菌 α -淀粉酶对荞麦淀粉的降解遵循米氏方程规律, 可用米氏方程对试验数据进行拟合。

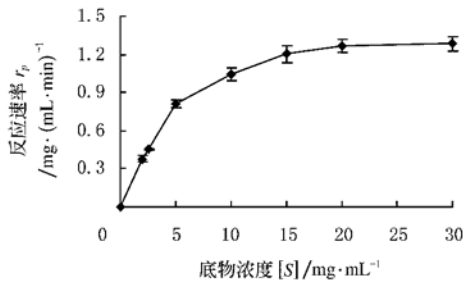


图 1 反应速率与荞麦淀粉浓度的关系图

Fig. 1 Relationship between reaction velocity and buckwheat starch concentration

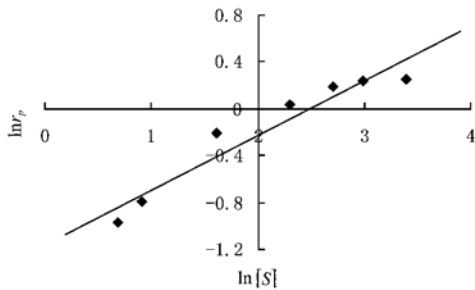
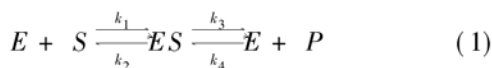


图 2 $\ln r_p$ 与 $\ln [S]$ 关系图

Fig. 2 Relationship between $\ln r_p$ and $\ln [S]$

Michealis-Menten 提出酶促反应按下列两步进行:



即酶(E)与底物(S)首先结合成中间产物(ES), 中间产物分解成产物(P)后酶重新游离出来。式中 k_1 为 ES 生成的反应速度常数, k_2 和 k_3 分别代表 ES 分解为 $E + S$ 和 $E + P$ 的反应速度常数, k_4 为 $E + P$ 复合生成

ES 的反应速度常数。在反应初期, 没有产物(P)或产物浓度 $[P]$ 极低, 不足以引起可逆反应, k_4 可以忽略不计, 故第二步反应是单向的。由质量守恒定律可得到反应的动力学模型:

$$r_p = \frac{k_3[E_t][S]}{(k_2 + k_3)/k_1 + [S]} \quad (2)$$

式中 $[S]$ ——底物浓度, mg/mL; $[E_t]$ ——总酶浓度, U/mL, $[E_t] = [E] + [ES]$, $[ES]$ 表示中间产物的 ES 的浓度。令 $V_m = k_3[E_t]$, $K_m = (k_2 + k_3)/k_1$, 则方程 (2) 可简化为

$$r_p = \frac{V_m[S]}{[S] + K_m} \quad (3)$$

米氏常数 K_m (mg/mL) 和最大反应速率 V_m (mg/(mL·min)) 是酶促反应的两个重要动力学参数。 K_m 相当于酶的活性部位一半被底物占据时所需的底物浓度。 V_m 表示在酶浓度不变时, 酶被底物饱和, 反应速度达到最大^[15]。

2.1.1 用 Lineweaver-Burk (双倒数做图法) 求解米氏常数和最大反应速率

以 $1/r_p$ 对 $1/[S]$ 作图, 得到图 3 所示的各对应点, 用最小二乘法线性拟合, 可以求得

$$V_m = 1.769 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min}), K_m = 7.191 \text{ mg}/\text{mL}$$

回归方程

$$r_p = \frac{1.769[S]}{7.191 + [S]} \quad (4)$$

方程的相关系数 $r = 0.996$, 方程极显著。

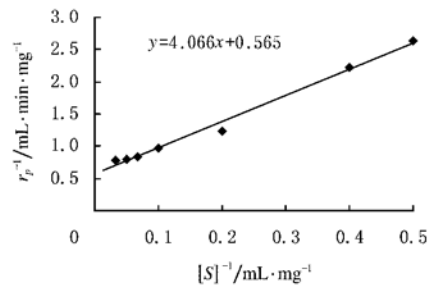


图 3 真菌 α -淀粉酶水解荞麦淀粉的 Lineweaver-Burk 图

Fig. 3 Lineweaver-Burk plots for buckwheat starch hydrolyzed with fungal α -amylase

2.1.2 用 Wilkinson 统计法求解米氏常数和最大反应速率

Wilkinson 统计法包括非线性二乘法求估算解和泰勒展开式求精校解^[3], 计算过程如表 1 和表 2 所示。

由表 1 可得,

估算解:

$$V_m^0 = \frac{\beta\epsilon - \delta^2}{\alpha\epsilon - \gamma\delta} = 1.576 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$$

$$K_m^0 = \frac{\beta\gamma - \alpha\delta}{\alpha\epsilon - \gamma\delta} = 0.524 \text{ g}/(100 \text{ mL})$$

$$b_2 = \frac{\alpha'\epsilon' - \gamma'\delta'}{\alpha'\beta' - \gamma'^2} = 2.280 \times 10^2$$

式中 V_m^0 ——最大反应速率的估算解; K_m^0 ——米氏常数的估算解。

式中 b_1, b_2 —— V_m 和 K_m 计算过程中修正常数。

由表 2 得,

由此可求得精较解:

$$b_1 = \frac{\beta'\delta' - \gamma'\epsilon'}{\alpha'\beta' - \gamma'^2} = 1.007$$

$$V_m = V_m^0 \cdot b_1 = 1.587 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$$

$$K_m = K_m^0 + \frac{b_2}{b_1} = 0.5470 \text{ g}/(100 \text{ mL})$$

表 1 Wilkinson 法求估算解

Table 1 Calculate the provisional value by Wilkinson method

实验点	$[S]/\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$	$r_p/\text{mg} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$X = r_p^2$	$Y = r_p^2/[S]$	$r_p X$	X^2	$r_p Y$	XY	Y^2
1	0.20	0.380	0.144	0.722	0.055	0.021	0.274	0.104	0.521
2	0.25	0.451	0.204	0.815	0.092	0.041	0.368	0.166	0.663
3	0.50	0.809	0.654	1.308	0.529	0.428	1.058	0.856	1.711
4	1.00	1.040	1.082	1.082	1.125	1.170	1.125	1.170	1.170
5	1.50	1.203	1.446	0.964	1.739	2.091	1.159	1.394	0.929
6	2.00	1.265	1.600	0.800	2.024	2.561	1.012	1.280	0.640
7	3.00	1.283	1.645	0.548	2.109	2.705	0.703	0.902	0.301
Σ	—	—	—	—	7.673	9.017	5.699	5.872	5.936
代号	—	—	—	—	α	β	γ	δ	ϵ

表 2 Wilkinson 法求精校解

Table 2 Fine adjustment of value by Wilkinson method

实验点	$[S] + K_m^0$	$V_m^0/[S]$	$f = V_m^0[S]/([S] + K_m^0)$	$f' = -V_m^0/([S] + K_m^0)^2$	f^2	f'^2	ff'	$r_p f$	$r_p f'$
1	0.724	0.315	0.435	-0.601	0.189	0.361	-0.262	0.165	-0.228
2	0.774	0.394	0.509	-0.657	0.259	0.432	-0.335	0.230	-0.297
3	1.024	0.788	0.769	-0.751	0.592	0.564	-0.578	0.622	-0.608
4	1.524	1.576	1.034	-0.678	1.069	0.460	-0.702	1.076	-0.706
5	2.024	2.365	1.168	-0.577	1.364	0.333	-0.674	1.405	-0.694
6	2.524	3.153	1.249	-0.495	1.560	0.245	-0.618	1.580	-0.626
7	3.524	4.729	1.342	-0.381	1.801	0.145	-0.511	1.721	-0.488
Σ	—	—	—	—	6.835	2.540	-3.678	6.798	-3.646
代号	—	—	—	—	α'	β'	γ'	δ'	ϵ'

2.1.3 两种方法求得的数据比较

这两种方法求得的 V_m 和 K_m 值都有一定的差别, 由于用 Lineweaver-Burk^[16] 求解要求 $[S]$ 在 $0.33K_m \sim 2.0K_m$ 时才比较准确, 如果所选底物浓度比 K_m 大得多时, 所得的双倒数图的直线趋于水平, 这种情况可以测得 V_m , 而 K_m 不能准确测得; 如果 $[S]$ 比 K_m 小得多时, 所作的双倒数图的直线与两轴的交点都接近原点, K_m 和 V_m 都难以测准。钟穗生等^[3] 认为 Wilkinson 法可以克服上述问题, 其结果较为可靠。

表 3 Lineweaver 与 Wilkinson 求解结果比较

Table 3 Comparison results calculated by Lineweaver and Wilkinson methods

求解方法	$V_m/\text{mg} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$	$K_m/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
Lineweaver-Burk 法	1.769	7.191
Wilkinson 统计法	1.587	5.470

2.2 酶浓度对反应速率的影响

在反应液酶浓度分别为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 U/mL 时进行水解, 酶浓度与反应速率的关系如图 4 所示。

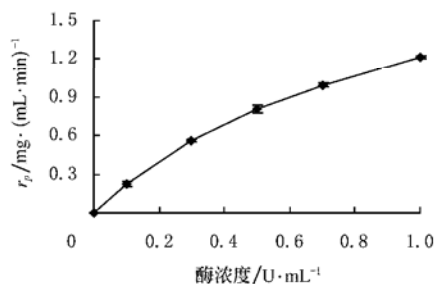


图 4 反应速率与酶浓度的关系图

Fig. 4 Relationship between reaction velocity and amylase concentration

从图4中可以看出,随着加酶量的增加,反应速率基本上呈线性增加,即反应速度与酶浓度成正比关系。在酶促反应中,酶分子首先与底物分子作用,生成活化的中间产物,再转变为最终产物。当酶促反应体系的温度、pH值不变,底物充分过量的情况下,酶的数量越多,则生成的中间产物越多,反应速度也就越快。这可以用酶促反应机制解释,有 $V_m = k_3[E_t]$,方程(3)可以写成,

$$r_p = \frac{k_3[E_t][S]}{[S] + K_m} = K[E_t] \quad (5)$$

所以底物浓度足够大时, $[S]$ 在反应过程中改变很小, $K = k_3 \cdot [S]/([S] + K_m)$ 可视为常数。因此 $r_p \propto [E_t]$,反应速率 r_p 与酶浓度 $[E_t]$ 呈线性关系,与试验结果相符。

2.3 pH值对反应速率的影响

在pH值分别为3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5的条件下进行水解,不同pH值下的反应速率见图5。

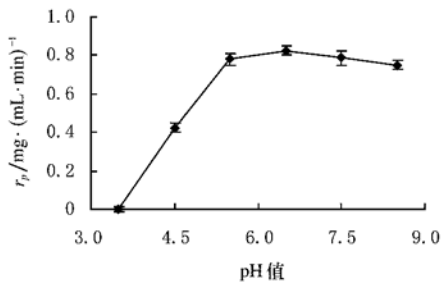


图5 反应速率与pH值的关系图

Fig. 5 Relationship between reaction velocity and pH value

图5表明,酶解速率对pH值的变化曲线为钟罩形曲线,在pH值6.0左右的反应速率最大,pH值过高或过低均可导致反应速率的下降。这与酶的自身性质有关,即在适宜pH值范围内酶表现最大活力,pH值高于或低于该范围均会改变酶的活性中心构像,甚至改变整个酶分子结构使其变性失活。pH值还能影响底物分子的解离,底物分子上某些基团只有在一定的解离状态下,才适于与酶结合发生反应。基于上述原因,pH值的改变,会影响酶与底物的结合,影响中间产物的生成,从而影响酶促反应速度。不同pH值条件下的反应速率可以用方程(6)进行拟合:

$$r_p' = \frac{V_m'[S]}{[S] + K_m'} \quad (6)$$

式中 r_p' ——不同pH值下的反应速率; V_m' 和 K_m' ——相应pH值下求得的最大反应速率和米氏常数。

2.4 温度对反应速率的影响

在温度分别为30、40、50、55、60、70、80℃时进行水解,反应温度与反应速率的关系见图6。图6中的曲线

也是一条钟罩形曲线,即温度从30℃增加到60℃,反应速率增至最大,以后随着温度升高,反应速率迅速下降。这一现象与酶促反应的普遍规律吻合,即温度升高,酶促反应速度加快,但随着温度的进一步升高,酶蛋白逐渐变性失活,反应速度降低。

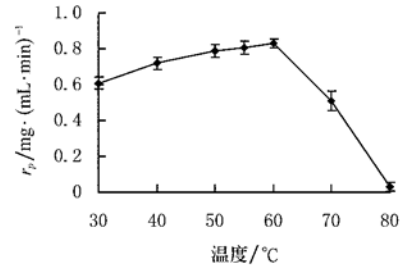


图6 反应速率与反应温度的关系图

Fig. 6 Relationship between reaction velocity and temperature

$\ln r_p$ 对 $1/T (\times 10^3 \text{ K}^{-1})$ 作图(T 为华氏温度,K),可以得到如图7所示直线,可见温度在303.15~333.15 K范围内时 $\ln r_p$ 与 $1/T$ 之间有线性关系,表明真菌 α -淀粉酶水解荞麦淀粉的速率随温度的变化服从Arrhenius方程:

$$\ln k_3 = -\frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} + B \quad (7)$$

式中 B ——积分常数; R ——气体常数, $\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$; E_a ——活化能, $\text{kJ}/\text{mol}^{[15]}$ 。

不定积分式可写成指数式,

$$k_3 = A \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (8)$$

式中 A ——指前因子, $\text{mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。

通过对直线进行线性回归,可以求得 $E_a = 8.529 \text{ kJ}/\text{mol}$,指前因子 $A = 18.47 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。统计检验的相关系数 $r = 0.978$,表明用Arrhenius方程对本研究数据的拟合是极显著的。

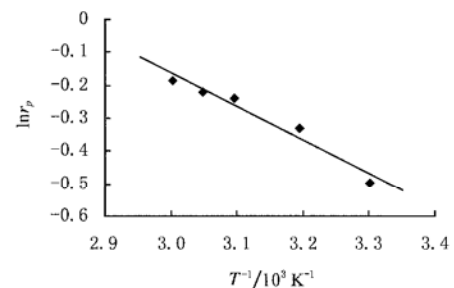


图7 $\ln r_p$ 与 $1/T$ 关系图

Fig. 7 Relationship between $\ln r_p$ and $1/T$

平衡常数 K_s 与温度 T 的关系,服从范特柯夫方程:

$$\ln K_s = -\Delta H/RT + \ln C \quad (9)$$

式中 K_s ——平衡常数; ΔH ——焓度, kJ/mol ; C ——频率因子; R ——气体常数, $\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ 。酶促反

应 $k_3 \gg k_2, K_s \approx K_m$, 以不同温度梯度下测得的米氏常数 K_m 回归求得焓度 $\Delta H = 17.395 \text{ kJ/mol}$, 频率因子 $C = 3.214 \times 10^3$ 。统计检验的相关系数 $r = 0.973$ 。由此, 确定真菌 α -淀粉酶水解荞麦淀粉的动力学方程为:

$$r_p = \frac{k_3[E_t][S]}{K_m + [S]} = \frac{A \cdot \exp(-E_a/RT)}{C \cdot \exp(-\Delta H/RT) + [S]} [E_t][S]$$

$$= \frac{18.47 \cdot \exp(-8529.3/RT)}{3214 \cdot \exp(-17395/RT) + [S]} [E_t][S]$$

该动力学方程在 303.15~333.15 K, 即 30~60°C 的温度范围内适用。

3 结论

真菌 α -淀粉酶在水解荞麦淀粉的初期, 反应遵循一级反应规律, 并可用经典的米氏方程进行模拟, 用 Lineweaver-Burk 和 Wilkinson 两种方法进行数学回归, 分析比较后选择 Wilkinson 统计法, 求解得动力学参数 V_m 为 1.587 mg/(mL·min)、 K_m 为 5.470 mg/mL。真菌 α -淀粉酶水解荞麦淀粉的动力学模型为:

$$r_p = \frac{18.47 \cdot \exp(-8529.3/RT)}{3214 \cdot \exp(-17395/RT) + [S]} [E_t][S]$$

该模型在 303.15~333.15 K 的温度范围内适用。在模型的推导过程中, 对各因子影响水解速率的数据进行拟合, 统计分析检验结果均高度显著, 这表明用米氏方程对真菌 α -淀粉酶水解荞麦淀粉的动力学过程进行描述和模拟是有效的。

[参 考 文 献]

- [1] 谢永洪, 刘学文, 王文贤, 等. 鸡肉蛋白酶水解工艺条件的研究[J]. 农业工程学报, 2004, 20(5): 207-210.
- [2] 钟穗生, 张林香, 胡全胜. 马铃薯淀粉的酶解动力学与数学模型[J]. 中国粮油学报, 1997, 12(2): 34-38.

- [3] 钟穗生, 刘生玉, 张林香. 马铃薯淀粉糖化动力学的研究[J]. 中国粮油学报, 1998, 13(1): 21-25.
- [4] Heitmann T, Wenzig E, Mersmann A. Characterization of three different potato starches and kinetics of their enzymatic hydrolysis by α -amylase [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 20: 259-267.
- [5] 刘汉文, 丁志香, 颜洪. 酶法小麦粗淀粉生产高麦芽糖浆工艺研究[J]. 食品科技, 1999, (1): 34-35.
- [6] 陆冬梅, 杨连生. 双酶协同水解微波改性木薯淀粉的动力学研究[J]. 精细化工, 2004, 21(10): 668-771.
- [7] 覃红梅, 韦仕岩, 张家伟. 酶制剂在玉米生料发酵酒精生产中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2002, (5): 46-47.
- [8] 刘社际, 谭辉铃. 玉米淀粉酶催化糖化的反应动力学模型[J]. 重庆大学学报(自然科学版) 1997, 20(1): 109-111.
- [9] 魏益民. 荞麦品质与加工[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1995.
- [10] June Qian, Patricia Rayas, Linda Grant. Partial characterization of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) starch [J]. Cereal Chem, 1998, 75(3): 365-373.
- [11] 张国权, 史一一, 魏益民, 等. 荞麦淀粉酶水解工艺条件研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(9): 86-92.
- [12] Zheng G H, Sosulski F W, Tyler R T. Wet-milling, composition and functional properties of starch and protein isolated from buckwheat groats [J]. Food Research International, 1998, 30(7): 493-502.
- [13] 俞一夫. 粮油食品分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
- [14] 姜文侠, 孙武岳. 还原糖和 DE 值的测定方法[J]. 食品研究与开发, 1997, 18(2): 58-61.
- [15] 董元彦, 李宝华. 物理化学[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] Komolprasert V, Ofoli R Y. Starch hydrolysis kinetics of *Bacillus licheniformis* α -amylase [J]. J Chem Tech Biotechnol, 1991, 51: 209-223.

Kinetics of buckwheat starch enzymatic hydrolysis with fungal- α -amylase

Zhang Guoquan¹, Shi Yiyi¹, Wei Yimin^{1,2*}, Ouyang Shaohui¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China;

2. Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to master the enzymatic hydrolysis characteristics of buckwheat starch by fungal- α -amylase, the effects of substrate concentration, enzymatic concentration, pH value and temperature on reaction velocity were determined. The kinetics of the hydrolysis reaction were described with the Michaelis-Menten equation, and the kinetic parameters were calculated by the Lineweaver-Burk and Wilkinson methods. The results show that buckwheat starch hydrolysis by fungal- α -amylase obeys the classical first-order reaction rate, and the kinetics can be modeled by Michaelis-Menten equation. In the condition of 55°C and pH 5.5, the Michaelis constant (K_m) and maximum rate (V_m) for 0.5 U/mL of fungal- α -amylase are 5.470 mg/mL and 1.587 mg/(mL·min). The kinetic model, including the parameters such as substrate concentration, enzymatic concentration and temperature, is suit for the hydrolysis under the temperature range from 303.15 K to 333.15 K.

Key words: buckwheat starch; fungal- α -amylase; enzymatic hydrolysis; kinetics