

文章编号:1671-9352(2007)09-0016-03

# 微量量热法研究酸度和金属离子 对淀粉酶催化作用的影响

茹淼焱<sup>1\*</sup>, 王明刚<sup>1</sup>, 张洪林<sup>2</sup>

(1. 山东大学 化学与化工学院, 山东 济南 250100; 2. 曲阜师范大学 化学系, 山东 曲阜 273165)

**摘要:**利用热活性检测仪测定了在不同酸度和有抑制剂时淀粉在淀粉酶催化作用下的热功率-时间曲线.根据酶催化反应动力学理论和对比进度法对实验结果进行处理,确定了酶催化反应的最适酸度,得到了有抑制剂( $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ )时酶催化反应的表现米凯利斯常数( $K'_m$ )和最大速率( $V_{\max}$ ).定量比较了金属离子对酶催化反应的抑制效果.

**关键词:**微量量热法; 热动力学; 淀粉酶催化反应; 抑制

中图分类号:O654 文献标志码:A

## Influences of acidity and metal ions on enzymatic catalyzed reaction by microcalorimetry

RU Miao-yan<sup>1\*</sup>, WANG Ming-gang<sup>1</sup>, ZHANG Hong-lin<sup>2</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, Shandong, China;

2. School of Chemical Science, Qufu Teachers Normal University, Qufu 273165, Shandong, China)

**Abstract:** The power-time curves of a starch enzymatic catalyzed reaction were determined by using a 2277 thermal activity monitor (Sweden). According to thermokinetic theory and the reduced extent method, the values of  $K_m$  and  $V_{\max}$  and the optimum acidity (pH = 5.27) were obtained. Apparent  $K'_m$  and  $V_{\max}$  data were gained for inhibiting ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ). The relationship between  $K'_m$  and concentration of metal ions was established and so was the rule of the inhibitory affect of metal ions on an enzymatic catalyzed reaction.

**Key words:** microcalorimetry; thermokinetics; enzymatic catalyzed reaction; induction

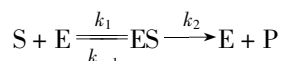
## 0 引言

酶促反应动力学的研究已取得了很大的进展<sup>[1-6]</sup>.但从微量量热法测出的淀粉酶催化反应的热功率-时间曲线中的数据,按照酶促反应动力学理论和对比进度法解析出有抑制剂时酶催化反应的米凯利斯常数( $K_m$ )和表观米凯利斯常数( $K'_m$ )与抑制剂金属离子浓度间的关系,进而定量得出金属离子的抑制效果,尚未见报道.

在激活剂对酶催化反应的影响的研究基础上<sup>[7]</sup>,对酶的最适酸度和金属离子的抑制作用进行了探讨.

## 1 热动力学理论

设淀粉酶对淀粉的酶催化反应符合 Michaelis-Menten 机理,即



收稿日期:2007-04-16

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(Y2006B13)

作者简介:茹淼焱(1963-),男,高工,主要从事胶体化学及材料化学研究.

\* 通讯作者;Email:ru1977@sdu.edu.cn

式中 S 和 P 分别代表底物和产物, E 代表酶, ES 为中间复合物, 从上式可推导出无诱导剂时酶催化反应方程即

$$\frac{1}{\nu} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

对于可逆体系来说, 从竞争性抑制机理<sup>[8]</sup>可推导出酶催化反应的方程, 即

$$\frac{1}{\nu} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}},$$

令  $K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ , 则

$$\frac{1}{\nu} = \frac{K'_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

假设酶催化反应方程与加入抑制剂时的酶催化反应方程的形式类似, 有抑制剂时, 酶催化反应也符合方程

$$\frac{1}{\nu} = \frac{K'_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3)$$

又根据对比进度法可推导出下列关系式<sup>[7]</sup>

$$K_m = \frac{2\varphi_2 - \varphi_1 - \varphi_3}{2\ln(1 - \varphi_2) - \ln(1 - \varphi_1) - \ln(1 - \varphi_3)} [S_0] \quad (4)$$

$$V_{\max} = \frac{K_m}{\Delta t} \cdot \frac{(\varphi_3 - \varphi_1)\ln(1 - \varphi_2) - (\varphi_3 - \varphi_2)\ln(1 - \varphi_1) - (\varphi_2 - \varphi_1)\ln(1 - \varphi_3)}{2\varphi_2 - \varphi_1 - \varphi_3} \quad (5)$$

式中  $\varphi$  为反应的对比进度,  $\varphi = \frac{Q}{Q_{\infty}}$ .

## 2 实验部分

### 2.1 试剂

实验所用淀粉酶, 是从海洋丝状真菌的发酵液中提取得到的. 酶溶液质量浓度为  $5.20 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-3}$  (比活为  $3.24 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ); 配制不同的 pH, 可溶性淀粉溶液质量浓度为  $5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-3}$  的溶液. 有抑制剂 ( $\text{Li}^+$  和  $\text{K}^+$ ) 存在时, 定量配成含一定质量浓度金属离子的溶液, pH = 5.02, 可溶性淀粉的质量浓度为  $5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-3}$  的溶液.

### 2.2 仪器

滴定微量量热仪 (瑞典, Thermometric AB 公司), 恒温器的工作范围在  $10 \sim 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  之间, 温度精度为  $\pm 2 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}$ . 该仪器灵敏度最小检测值为  $0.15 \mu\text{W}$ , 24 h 基线飘移不大于  $0.2 \mu\text{W}$ . 它包括一个 Kelf 涡轮搅拌器和搅拌马达及控制系统, 研究体系可以

被搅拌, 其搅拌速度为  $0 \sim 120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### 2.3 实验方法

实验是在 4 mL 不锈钢安瓿瓶滴定微量量热仪中进行的. 取溶液 2 mL 放入不锈钢安瓿瓶中. 把滴定微量量热仪的连杆上绕细塑料管, 管中盛淀粉酶溶液 0.10 mL, 先预热, 当温度恒定一定值后, 将搅拌系统打开, 转速为  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 用蠕动泵把淀粉酶溶液注入安瓿瓶中, 然后进行热功率—时间曲线的测定, 记录仪开始记录, 当记录笔画出与基线平行的直线时即认为实验结束, 搅拌停止.

## 3 结果与讨论

### 3.1 不同酸度时的实验

本文用滴定微量量热仪测定了淀粉在淀粉酶催化作用下 310 K 及不同酸度时的热功率—时间曲线. 曲线下的面积代表了反应体系的热效应, 根据  $t$  时刻曲线下的面积和总面积之比可求出对比进度  $\phi$ . 利用式(4)和(5), 对 310 K, pH = 5.02 时的数据按照上述处理方法处理, 得到不同酸度下数据, 见表 1.

表 1 在 310 K 和不同酸度时酶催化反应的  $K_m$  和  $V_{\max}$

Table 1 Values of  $K_m$  and  $V_{\max}$  of enzymatic catalyzed reaction at 310 K and different acidities

$\frac{T}{K}$	4.10	4.56	5.02	5.72	6.37
$K_m \times 10^3 / (\text{g} \cdot \text{L}^{-3})$	1.989 9	2.277 3	2.491 6	2.403 0	2.166 7
$V_{\max} \times 10^5 / (\text{g} \cdot \text{L}^{-3} \cdot \text{s}^{-1})$	1.996 8	2.005 8	1.995 8	1.997 4	1.996 0

根据表 1 中的数据, 用计算机拟合, 可得  $K_m$ —pH 曲线方程, 即

$$K_m = 4.73 \times 10^{-5} \text{ pH}^3 - 1.06 \times 10^{-4} \text{ pH}^2 + 7.20 \times 10^{-3} \text{ pH} - 1.31 \times 10^{-2}$$

该曲线方程有一最高点, 求极值为 pH = 5.27, 定义  $K_m$  为最大时对应的酸度为最适反应酸度, 即酶催化反应的最适酸度 (pH = 5.27).

### 3.2 有抑制剂时的实验结果

#### 3.2.1 金属离子 ( $\text{Li}^+$ ) 存在时

用滴定微量量热仪测定了有金属离子 ( $\text{Li}^+$ ) 作为抑制剂时淀粉在淀粉酶催化作用下 310 K, pH = 5.02 时的热功率—时间曲线, 按照上述处理方法, 对其它质量浓度的  $\text{Li}^+$  存在时的数据进行同法处理, 可得到  $K'_m$  和  $V_{\max}$ , 其数据见表 2.

$$K'_m = 2.547 1 \times 10^{-3} - 1.153 \times 10^{-4} c,$$

$$(R = -0.995 6)$$

由上式可见,  $\text{Li}^+$  对酶催化作用起到抑制作用,  $\text{Li}^+$  的质量浓度增加, 抑制作用增强。

### 3.2.2 金属离子( $\text{K}^+$ )存在时

用滴定微量量热仪测定了间金属离子( $\text{K}^+$ )作

为抑制剂时淀粉在淀粉酶催化作用下, 310 K, pH = 5.02 时的热功率 - 时间曲线, 按照上述处理方法, 对其它浓度下的  $\text{K}^+$  存在时的数据进行处理, 可得到和  $V_{\max}$ , 其数据见表 3。

表 2 310 K, pH = 5.02 和不同质量浓度的  $\text{Li}^+$  存在时酶催化反应的  $K'_m$  和  $V_{\max}$

Table 2 Values of  $K'_m$  and  $V_{\max}$  of enzymatic catalyzed reaction at 310 K, pH = 5.02 and different  $\text{Li}^+$  concentrations

Concentration( $c$ )/(mmol·L <sup>-1</sup> Li <sup>+</sup> )	0	1.0	2.5	3.75	5.0	7.5	10.0
$K'_m \times 10^3$ /(g·L <sup>-3</sup> )	2.491 6	2.469 3	2.307 4	2.123 2	1.925 7	1.680 2	1.390 7
$V_{\max} \times 10^5$ /(g·L <sup>-3</sup> ·s <sup>-1</sup> )	2.076 2	2.071 6	2.065 4	2.065 4	2.076 2	2.061 2	2.078 4

表 3 310 K, pH = 5.02 和不同浓度的  $\text{K}^+$  存在时酶催化反应的  $K'_m$  和  $V_{\max}$

Table 3 Values of  $K'_m$  and  $V_{\max}$  of enzymatic catalyzed reaction at 310 K, pH = 5.02 and different  $\text{K}^+$  concentrations

Concentration( $c$ )/(mmol·L <sup>-1</sup> )	0	2.0	5.0	7.5	10.0	15.0	20.0
$K'_m \times 10^3$ /(g·L <sup>-3</sup> )	2.491 6	2.259 3	1.902 7	1.608 3	1.315 6	0.725 0	0.139 6
$V_{\max} \times 10^5$ /(g·L <sup>-3</sup> ·s <sup>-1</sup> )	2.076 2	2.068 8	2.080 4	2.053 5	2.078 6	2.072 4	2.060 6

$$K'_m = 2.4922 \times 10^{-3} - 1.177 \times 10^{-4} c$$

$$(R = -0.9999)$$

由上式可见,  $\text{K}^+$  对酶催化作用起到抑制作用,  $\text{K}^+$  的浓度增加而抑制作用增强。

总之,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$  对酶催化反应都有抑制作用, 但相同浓度时,  $\text{Li}^+$  的抑制作用大于  $\text{K}^+$ 。

## 4 结论

(1) 用微量量热法得到了酶催化反应的米凯利斯常数( $K_m$ )和表观米凯利斯常数( $K'_m$ )及最大速率( $V_{\max}$ ), 这种方法比滴定法、光谱法、测压法、同位素法等更简便可靠, 而且测量完毕后, 并不破坏研究体系, 还可做进一步测试, 因此它是一种研究酶催化反应的行之有效的新技术。

(2) 根据淀粉在淀粉酶催化反应的热功率 - 时间曲线, 用热力学的对比进度法进行处理, 得到了不同酸度下反应的  $K_m$ , 建立了  $K_m$  - pH 间的关系式, 并求出了反应的最适酸度 (pH = 5.27), 这一结果, 为进一步利用及开发酶的功能奠定了理论基础。

(3) 从淀粉在淀粉酶催化反应的热功率 - 时间曲线出发, 用热动力学理论和对比进度法进行处理, 得到了有抑制剂时的  $V_{\max}$  和  $K_m$  (或  $K'_m$ ), 从所得数据可知,  $V_{\max}$  是基本相同的, 而  $K_m$  和  $K'_m$  不同, 但  $K'_m < K_m$ 。从抑制剂( $\text{Li}^+$ 、 $\text{K}^+$ )存在时, 所得到的可知, 在同样浓度下, 抑制效果顺序为  $\text{Li}^+ > \text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  表现出较强烈地抑制作用。

总之, 微量量热法测定酶催化反应的热功率 -

时间曲线, 用热动力学理论和对比进度法来处理, 从而确定最适酸度和金属离子抑制效果, 是一种崭新的方法。此研究对于深入探索酶的特性及酶的应用条件有重要的理论意义和广阔的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 曾胤新, 蔡明秀, 俞勇, 等. 微生物低温酶适冷机制研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(10):52-56.
- [2] 张小里, 赵彬伐, 马政生, 等. 氮源对酵母工程菌株生产淀粉酶的影响[J]. 化学工程, 200, 28(6):31-34.
- [3] 滕利荣, 高朝辉, 王阳.  $\text{CN}_2\text{M}_3$  分泌新型淀粉酶的最适条件及酶的应用条件[J]. 吉林大学学报:理学版, 2006, 14(5):834-838.
- [4] Naoki Tanaka, Daisuke Mitani, Shigeru Kunugi. Pressure-induced perturbation on the active site of amylase monitored from the sulfhydryl reaction [J]. Biochemistry, 2001, 40: 5914-5920.
- [5] LIU Jing-song, ZENG Xian-cheng, TIAN An-min, et al. Application of a reduced extent method to thermokinetic studies of enzyme catalyzed reaction [J]. Thermochemica Acta, 1995, 253:275-280.
- [6] SAILERI G, VINCI G, ANTONELLI M L. microcalorimetric study of the enzymatic hydrolysis of starch an amylase catalyzed reaction[J]. Analytica Chimica Acta, 1995, 300:287-293.
- [7] 张洪林, 于秀芳, 张刚. 钙, 镁离子对淀粉酶催化激活作用的热动力学[J]. 物理化学学报, 2002, 18(12):1125-1128.
- [8] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 1991: 266.

(编辑:胡春霞)