

D-葡萄糖转化为 D-果糖的酶异构化速度

李桂琴 冯淑娣 陈英武

(中国科学院兰州化学物理研究所)

用葡萄糖异构酶使 D-葡萄糖转化为 D-果糖是新兴固相化酶工艺过程。从实用^[1,2]和机理^[3,4]观点研究此酶对醛糖异构化的催化动力学已见报道。但此酶的菌源很多^[1],酶纯度不同,求得的动力学参数相差较大。为了建立我国自己的果糖生产,发展玫瑰暗黄链霉菌^[6]和满足本所用自溶破壁法提取酶制剂需要,我们初步考察了这种酶催化 D-葡萄糖转化为 D-果糖的动力学行为。

一、试验方法

1. 酶制剂及试剂 半纯化酶制剂是本所从培养玫瑰暗黄链霉菌 K_{c13-375}, 经自溶破壁, 3000 转/分离心, 用硫酸铵透析获得。用高渗法^[6]测活力。其活力达 0.001 单位, 为半纯化酶制剂, 才能应用于动力学试验。酶活力单位定义为: 在 60℃, 以 1.5ml 1.99M D-葡萄糖为底物; pH = 6.9, 0.2M 磷酸缓冲液 1.0ml; 0.1M 硫酸镁溶液 0.5ml, 0.005M 氯化钴溶液 0.5ml 的条件下; 每秒钟, 每升酶制剂具有转化 1 克分子 D-葡萄糖为 D-果糖的酶活性定义为 1 个酶活力单位。此值可换算为 33.15 国际酶活单位 (IGIU)^[11]。

D-葡萄糖 (C. P., 天津试剂三厂), D-果糖 (A. R., 上海化学制药厂), 吡唑 (L. R., 英国 B. D. H.), 其余均为国产 A. R. 试剂。

2. 活力测定 异构化过程按高渗法^[6]进行, 果糖测定采用吡唑-半胱氨酸-硫酸法^[7], 用上海分析仪器厂 72 型分光光度计测定。

3. 酶异构化 D-葡萄糖动力学考察程序: 考察不同因子对异构化速度的影响。**A.** 底物浓度: 在 50℃, 60℃, 70℃ 水浴中分别在 5.83M, 4.83M, 3.83M, 2.91M 或 3.03M 的底物

1.5ml 中, 加入 1.5ml 酶制剂, 反应 pH = 6.9, 0.2M 磷酸缓冲液 1.5ml, 0.1M 硫酸镁溶液 0.5ml, 经异构化反应后^[6], 按活力测定法测其果糖含量。**B.** 酶用量: 70℃, 底物浓度为 5.83M, 按 A 试验条件进行, 但改变酶用量 (用蒸馏水稀释酶制剂), 测 5、20、60 分钟反应时间内生成果糖量。**C.** pH 效应: 60℃, 底物浓度 2.99M, 酶制剂 1.5ml, 0.1M 硫酸镁 0.5ml, 然后分别加入 pH = 7.0、7.2、7.4、7.6、7.8 的 0.2M 的磷酸缓冲液 1.5ml, 测定 20 分钟内的果糖生成量。**D.** 激活剂效应: 60℃, 底物浓度 2.99M, 0.2M 磷酸缓冲液 1.5ml, 酶 1.5ml, 加入 0.001—0.5M 五种不同的硫酸镁溶液 0.5ml, 测 20 分钟果糖生成量。测钴激活剂效应时的温度、底物浓度、酶用量均与测定镁离子时的条件相同。0.2M 磷酸缓冲液 1.0ml, 0.1M 硫酸镁 0.5ml, 0.0001—0.1M 四种不同浓度的氯化钴溶液 0.5ml, 测 20 分钟果糖生成量。

二、结果与讨论

1. 底物浓度、温度对异构化速度的影响

图 1—3 的反应温度分别为 70℃、60℃、50℃ 观察不同底物浓度, 在不同时间内 D-果糖生成情况。从图可以看出, 在 70℃, 60℃ 时分别反应 20 分钟和 30 分钟后, 果糖生成量基本不变。在 50℃ 反应体系中, 当底物浓度低时, 反应经 60 分钟后, 生成的果糖量不再增加; 底物浓度高时, 虽然经 120 分钟后, 反应仍在进行。按 Michaelis-Menten 机理^[8]

$$S + E \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} (ES) \xrightarrow{k_3} P + E,$$

式中 S 为底物浓度, E 为酶, (ES) 为中间活性络合物, P 为产物, k_1 、 k_2 、 k_3 分别为反应速度常数。按恒态理论

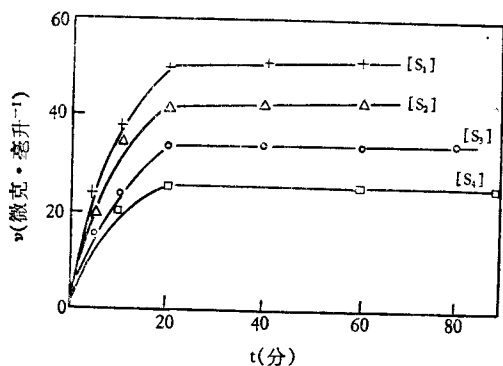


图 1 不同浓度的底物在不同时间内 D-果糖生成的关系图

反应条件: 温度 70°C , $\text{pH} = 6.9$, 0.2M 磷酸缓冲液, 1.5 毫升, 0.1M 硫酸镁 0.5 毫升, $E_0 = 1.5 \times 10^{-3}$ 单位, $[S_1] = 5.83\text{M}$, $[S_2] = 4.83\text{M}$, $[S_3] = 3.83\text{M}$, $[S_4] = 2.91\text{M}$ 。

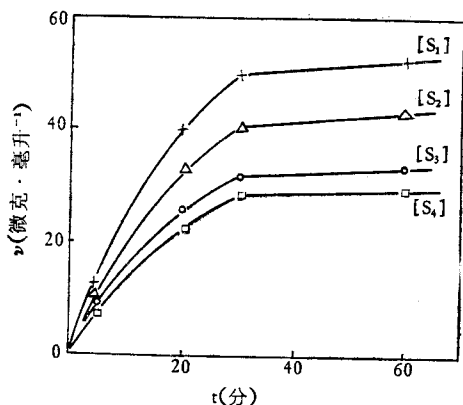


图 2 不同浓度底物在不同时间内生成 D-果糖关系图
反应条件: 温度 60°C , $[S_4] = 3.03\text{M}$ 。其他条件同图 1

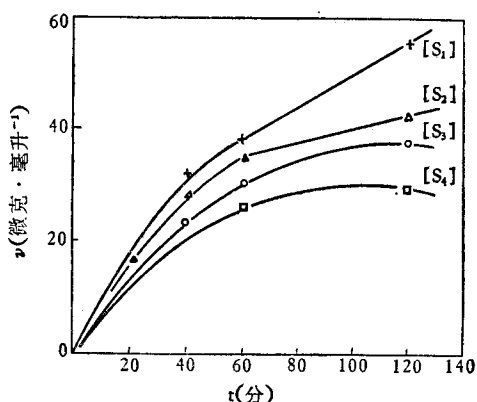


图 3 不同的底物浓度在不同时间内生成 D-果糖关系图

反应条件: 温度 50°C 其他条件同图 1。

$$\frac{1}{V_i} = \frac{1}{k_3 E_0} + \frac{K_m}{k_3 E_0} \left[\frac{1}{S_0} \right]$$

式中 S_0 为底物反应初浓度(M), V_i 为不同

温度和不同 S_0 下的反应初速度 (M/秒), K_m 为米氏常数 (M), k_3 为反应速度常数 (M/秒 · 单位), 若分别以 $\frac{1}{V_0}$ 和 $\frac{1}{S_0}$ 为纵横坐标作图, 即可得 Lineweaver-Burk 图, 其截距为 $\frac{1}{k_3 E_0}$, 斜率为 $\frac{K_m}{k_3 E_0}$, 故可求出 K_m 。图 4 为三个不同温度的 Lineweaver-Burk 图。从图 4 及已知 E_0 值得不同温度下的 K_m 。

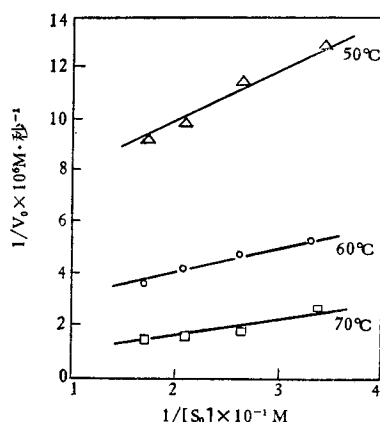


图 4 不同温度下 D-葡萄糖异构为 D-果糖的 Lineweaver-Burk 图和 k_3 值(表 1)。

表 1 不同温度下 K_m 和 k_3 值

温度 $^{\circ}\text{C}$	$K_m(\text{M})$	$k_3(\text{M/秒} \cdot \text{升})$
50	3.9	0.12×10^{-3}
60	3.7	0.36×10^{-3}
70	10.2	1.30×10^{-3}

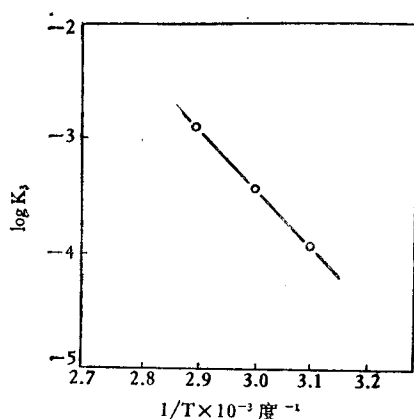


图 5 D-葡萄糖异构为 D-果糖的 Arrhenius 图

按 Arrhenius 方程 $k_3 = Ae^{-\frac{E}{RT}}$, 则可求得本异构化反应的活化能 E_a (千卡/克分子), 和频率常数 A (秒⁻¹)。图 5 就是根据表 1 给出的 Arrhenius 图。 $E = 21.3$ 千卡/克分子, $A \approx 3 \times 10^{12}$ 秒⁻¹。

2. 酶浓度对异构化速度的影响 图 6 为反应 60 分钟, 底物为 5.83M 时, 在不同酶制剂用量下, 转化为 D-果糖关系图。

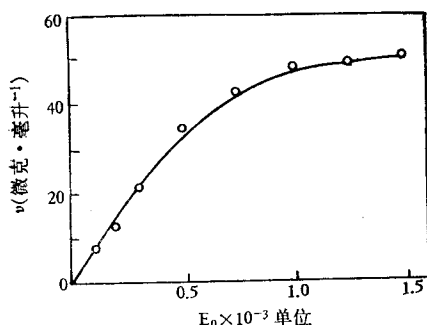


图 6 不同酶量对 D-葡萄糖异构化为 D-果糖的关系图

反应条件: 温度 70℃ pH = 6.9, $[S] = 5.83M$, 0.2M 磷酸缓冲液, 1.5 毫升, 0.1M 硫酸镁 0.5 毫升。

按 Schultz 方程式^[10] $(S_0 - F) = k_D(E_0 t)^{\frac{1}{2}}$, 式中 $F(M)$ 为果糖生成量, t (秒) 为反应时间, k_D 为扩散系数, 以 $(S_0 - F)$ 和 $(E_0 t)^{\frac{1}{2}}$ 为纵横坐标作图, 可求得一直线。说明此异构化反应是由扩散机理所控制。图 7 就是不同的 E_0 在不同时间下对 5.83MD-葡萄糖的 Schultz 图。

3. pH 影响 从图 8 可知此酶异构化反应最佳 pH = 7.6。

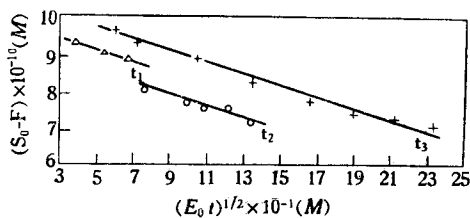


图 7 葡萄糖异构酶浓度对其催化动力学行为的 Schultz 图

$t_1 = 300$ 秒 $t_2 = 1200$ 秒 $t_3 = 3600$ 秒

4. 金属离子激活影响 Mg^{2+} 的影响见图 9, 在一定浓度的 Mg^{2+} 存在下 Co^{2+} 的影响见图 10。其激活浓度最佳范围为 0.1M 和

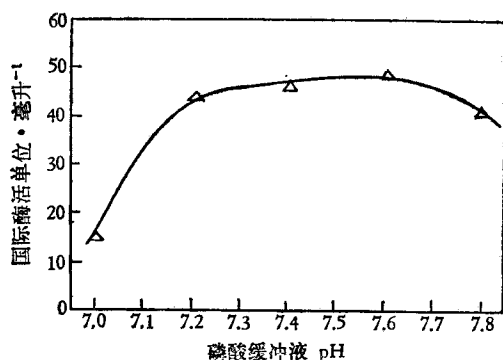


图 8 酶活力随缓冲液 pH 变化的关系图

反应条件: 温度 60℃, 反应时间 20 分钟 $[S] = 2.99M$ $E_0 = 1.5 \times 10^{-3}$ 单位, 0.2M 磷酸缓冲液, 1.5 毫升, 0.1M 硫酸镁 0.5 毫升。

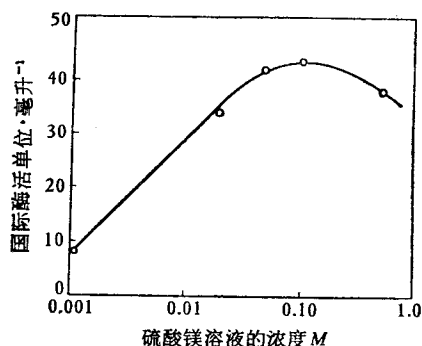


图 9 不同浓度的镁离子对 D-葡萄糖异构构成 D-果糖关系图

反应条件: 温度 60℃, pH = 6.9, $[S] = 2.99M$, 反应时间 20 分钟, $E_0 = 1.5 \times 10^{-3}$ 单位, 0.2M 磷酸缓冲液 1.5 毫升, 镁离子溶液用量 0.5 毫升。

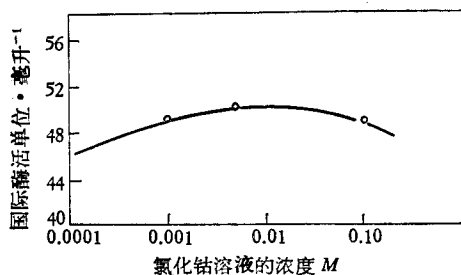


图 10 不同浓度的钴离子对 D-葡萄糖异构构成 D-果糖关系图

反应条件: 温度 60℃, pH = 6.9, $[S] = 2.99M$, 反应时间 20 分钟, $E_0 = 1.5 \times 10^{-3}$ 单位, 0.1M 硫酸镁 0.5 毫升, 0.2M 磷酸缓冲液 1.0 毫升, 钴离子溶液用量 0.5 毫升。

0.005M。

5. 讨论

(1) 本文采用 Michaelis-Menten 方程, 能较满意地处理异构化反应试验结果。但在此反应

过程中,可能还包括旋光异构体的旋光改变过程,实际上与酶结合的底物似乎是 α -D葡萄糖吡喃糖,(即椅式构象),而产物则是 α 和 β 果吡喃糖和 α 和 β 果呋喃糖的平衡混合物。 α 构象果吡喃糖似乎是最初的产物^[3,4]。果糖的各旋光结构之间的动力学转化率较葡萄糖吡喃糖快十倍^[4],因而在动力学数据处理中可忽略不计。

(2) 酶用量的动力学行为。从图7可以看出,在三个不同反应时间内,不同酶用量在固定底物初浓度和70℃的特定条件下,均服从经验Schultz方程式,而三条曲线基本平行,且有相同的扩散系数 $k_D = 3.8\text{M}/\text{秒}^{\frac{1}{2}}$ 、单位 $\frac{1}{2}$ 。这说明此异构化反应是受扩散机理控制^[10]。

(3) 由于此酶的最佳pH偏碱性,而本动力学考察却在偏中性条件下进行,因此此时所用的酶表面负电荷似较少。游离羧基过少将会影响反应速度。

致谢: 本文承蒙金振声所长审阅, 并提出宝贵意

见。放线菌由王念斌、赵进福同志提供。半纯化酶制剂由叶乃芝同志提供。菌株由沈阳食品研究所提供。

参 考 文 献

[1] Sproll, R. D. et al.: *Biotech. Bioeng.*, 18, 633, 1976.
[2] Kent, C. A. et al.: *J. Appl. Chem. Biotech.*, 23, 689, 1973.
[3] Schra, K. J. et al.: *Biochem.*, 10, 1058, 1971.
[4] Meka, G. A. et al.: *J. Mol. Catal.*, 6, 57, 1979.
[5] Berman, H. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 249, 3983, 1974.
[6] 江苏省化工设计研究所等:《江苏发酵》1976年,第2期,第1页。
[7] Dische, Z. et al.: *J. Biol. Chem.*, 192, 583, 1951.
[8] Michaelis, L. et al.: *Biochem. Z.*, 49 333 1913.
[9] Lineweaver, H. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 56, 658, 1934.
[10] Bunting, P. S. et al.: *Biochem.*, 11, 447, 1972.
[11] Johnson, J. C. *Industrial Enzymes, Recent Advances*, Noyes Data Corp., Park Ridge. N. J. 122, 1977.

[本文于1982年1月17日收到]

噪声暴露和心肌梗塞对心电图传递
函数相移和相干函数的影响

封根泉 方丹群 方跃奇 任宝云 董金英

(中国环境科学研究院 环境物理污染控制研究中心)
北京市劳动保护研究所

李 宗 浩

(北京市急救站)

一、引 言

噪声对心血管功能的影响可分暂时性^[1,2]和持久性^[3,4]两类。一般认为暂时性影响具有应激反应性质,在噪声停止后可以恢复^[1,2]。持久性影响则不易恢复^[5,6],许多作者在制订噪声标准时着重于持久性影响方面^[7]。

噪声长期职业性暴露所造成的心功能的持久性影响研究^[3-5],多数根据受试者主诉心、血

管症状,缺少客观指标,这与缺少一种能反映心血管症状的灵敏的客观生理指标有关。而极大多数在噪声环境中长期工作、心血管症状主诉很多的工人,心电图常规检查又均属正常范围。为了确切地反映噪声对心血管功能的持久性损害及其严重程度,探索一种有效的灵敏的能客观地反映心血管功能的生理指标很有必要,同时这对于提高心脏病的临床诊断率也有好处。

目前临床常规心电图目测检查方法对心脏