

酸性脲酶反应动力学研究

易蕴玉 帅桂兰 赵凤妹 赵光鳌

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

摘要 用 Berthlot 法测定酸性脲酶酶反应过程产物 NH_4^+ 的浓度变化。实验表明, 酸性脲酶反应是按 Michaelis 机理进行。其最佳反应条件是 $\text{pH} = 4.5$, 反应温度 60°C , 反应活化能 $E_a = 37.34 \text{ kJ/mol}$, 米氏常数 $K_m = 0.2868 \text{ mmol/L}$, $V_m = 0.1744 \text{ mmol/L} \cdot \text{min}$ 。

关键词 酸性脲酶; 反应动力学; 尿素

中图分类号 TQ 920.1

0 前 言

酿造酒在发酵过程中, 由于酵母代谢机制常会产生不等量的尿素, 尿素进一步与酒精反应, 形成氨基甲酸乙酯。为此, 常用酸性脲酶来分解尿素, 使其含量减少。作者研究了酸性脲酶酶反应动力学, 建立了动力学模型, 求出各参数, 以寻求降低氨基甲酸乙酯的方法。

1 实验部分

1.1 酸性脲酶的获得

取一定体积酸性脲酶产生菌的发酵液, 离心, 倒去上清液, 加入 $\text{pH} 4.5$, 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液恢复体积, 将菌体打散混匀, 置冰箱保存, 所得酶液此条件下 48 h 活性不变。

1.2 酶催化反应初速率 V_0 的测定

实验在恒温水浴槽中进行, 在 25 ml 比色管中加入 4 ml 浓度为 30 g/L 的尿素溶液, 预热 5 min , 加入已预热的恒温酶液 1 ml , 用 Berthlot 法^[1]测定不同时间的产 NH_4^+ 量, 以单位时间产氮量来表示酶催化反应初速率 V_0 。

1.3 酶催化反应条件的选择^[2~6]

1.3.1 酶用量对初速率 V_0 的影响 在反应温度、底物浓度及 pH 值不变的情况下, 实验测出不同酶浓度下的初速率 V_0 , 结果见图 1, 酶用量在 $0.8 \sim 1.2 \text{ ml}$ 时, V_0 与 C_E 之间成线性关系, 实验选用线性部分的一点 $C_E = 1 \text{ ml}$ 为实验的酶用量。

1.3.2 底物浓度对初速率的影响 脲酶将尿素分解为 CO_2 和 NH_3 , 这一反应很专一。配制尿素浓度梯度, 测定尿素浓度 C_s 对初速度 V_0 的影响, 结果见图 2。 V_0 先随 C_s 增大而增大, 当

C_s 增大到一定浓度时, V_0 趋向最大, 故选择 $C_s = 30 \text{ g/L}$ 为实验的底物浓度。

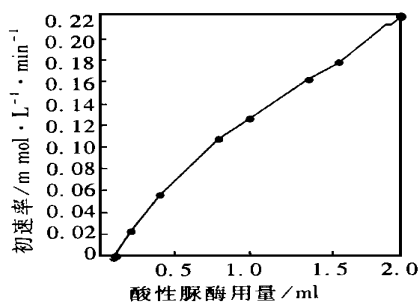


图1 酶用量与初速率关系图

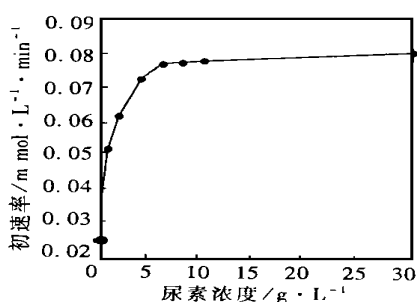


图2 底物浓度与初速率关系图

1.3.3 反应体系 pH 对初速率 V_0 的影响 测得 pH 对反应初速率 V_0 的影响, 见图3。当 pH 4.5 时, V_0 最大; 当 $\text{pH} > 4.5$, V_0 因酸性脲酶部分变性失活而下降。故选体系 $\text{pH} = 4.5$ 。

1.3.4 反应温度对初速率 V_0 的影响 在底物浓度、酶用量、pH 为实验最佳情况下, 分别测出不同温度 t 下初速度 V_0 , 结果如图4所示, 当温度 $t = 60$ 时, V_0 最大; 当 $t < 60$ 时, V_0 随 t 的增大而增大, 符合阿尼伦乌斯定律; 而当 $t > 60$ 时, V_0 随 t 增大而减小。

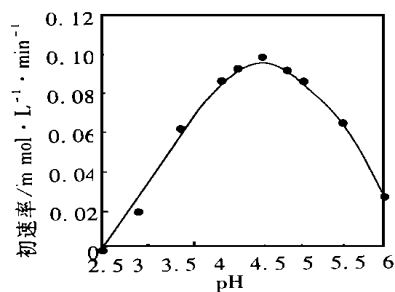


图3 pH 与初速率关系图

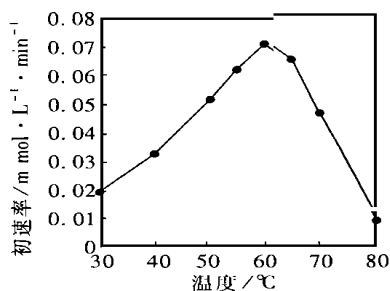


图4 温度与初速率关系图

2 结果与讨论

2.1 酸性脲酶催化反应动力学参数的测定

2.1.1 反应活化能 E_a 的测定^[7] 由于在低温下, 酸性脲酶催化反应的初速率常数 K 与反应温度 t 之间符合阿伦尼乌斯定律, 故有: $K = K_0 \exp(-E_a/Rt)$. 式中: K_0 为指前因子, R 为摩尔气体常数, E_a 为反应活化能。将上式写成自然对数形式: $\ln K = \ln K_0 + (-E_a/Rt)$. 可知, $\ln K$ 与 $1/t$ 成线性关系。而 K 与初速率 V_0 成正比。因此 $\ln V_0$ 与 $1/t$ 也成线性关系。按不同温度下的 V_0 , 作 $\ln V_0 - 1/t$ 图(见图5), $\ln V_0$ 与 $1/t$ 也成线性关系, 由直线斜率求得反应活化能 $E_a = 37.34 \text{ kJ/mol}$, 相关系数 $\alpha = 0.995339$ 。

2.1.2 酶催化反应的米氏常数和反应最大速率测定 脲酶的催化反应 Michaelis) 机理^[8] 可用下式来描述: $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ 。

由稳态法处理上式得米氏方程: $V = V_{\max} \times C_s / (K_m + C_s)$. 酶催化反应以初速率 V_0 表示, 此时底物浓度为 S_0 , 则上述速率方程式为 $V_0 = V_{\max} \times C_{s0} / (K_m + C_{s0})$, 写成倒数形式, 有 $1/V_0 = K_m / (V_{\max} \times C_{s0}) + 1/V_{\max}$. 按实验测出的不同底物浓度下的反应初速率作 $1/V_0 - 1/S_0$ 关系图(见图6)。可知 $1/V_0$ 与 $1/S_0$ 呈线性关系, 说明用米氏机理描述酸

性脲酶催化反应机理是合理的。由直线斜率和截距求得: 最大反应速率 $V = 0.1744 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, 米氏常数 $K_m = 0.2868 \text{ mmol}/\text{L}$, 相关系数 $\alpha = 0.998223$ 。

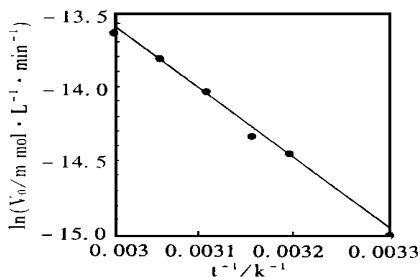


图5 $\ln V_0 - 1/t$ 关系图

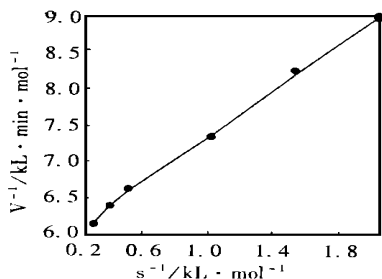


图6 $1/V_0 - 1/S_0$ 关系图

3 结 论

- 1) 酸性脲酶酶促反应的最适条件为 $\text{pH} = 4.5$; 反应温度 $t = 60$; $C_s = 30 \text{ g}/\text{L}$ 。
- 2) 测出动力学参数反应活化能 $E_a = 37.34 \text{ kJ}/\text{mol}$, 米氏常数 $K_m = 0.2868 \text{ mmol}/\text{L}$, 最大反应速率 $V_{\max} = 0.1744 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, 反应动力学方程: $1/V_0 = K_m/(V_{\max} \times C_{s0}) + 1/V_{\max}$ 。

参 考 文 献

- 1 Weatherburn M W. Phenol-Hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry, 1967, 39(8)
- 2 鲁宝重. 酶学概论. 北京: 科学出版社, 1986
- 3 Gerald Reed. The enzyme (VOLI·PART2). N Y: Academic Press, 1951
- 4 狄克松 M, 威勃 E C 著. 酶. 戚正武译. 上海: 上海科技出版社, 1964
- 5 许根俊. 酶的作用原理. 北京: 科学出版社, 1990
- 6 袁勤生, 赵建, 王维育. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 1992
- 7 天津大学物理化学教研室. 物理化学. 北京: 高教出版社, 1978
- 8 Michadlis L. Menten Kinetics of inevertase action. Biochem, 1913, 49: 333 ~ 336

Study on the Reaction Kinetics of Acid Urease

Yi Yunyu Shuai Guilan Zhao Fenmei Zhao Guanhao

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract Berthlot method was used to determined the change of ammonia ion concentration during the reaction process. Results show that acid urease catalysed reaction is of Michaelis reaction. It's optimal reaction conditions are as follows: $\text{pH} = 9.0$; temperature $t = 30$, the energy of activation $E_a = 37.34 \text{ kJ}/\text{mol}$; the Michaelis constant $K_m = 0.2868 \text{ mM}$, and the maximum velocity is $0.1744 \text{ mM}/\text{min}$.

Key words acid urease; reaction kinetics; urea

(责任编辑: 陈 娇)