

超音波下之酵素反應

計劃編號：NSC 89-2214-E-002-035-

執行期限：88/08/01~89/07/31

主持人：劉懷勝 台灣大學化工系 教授

中文摘要

(關鍵詞：超音波, 水解枝鏈澱粉酵素)

本文主要探討超音波對 isoamylase 水解枝鏈澱粉反應的影響。超音波在無攪拌的情形下，具有增進 isoamylase 反應的效果，其增進之效率與置於恆溫振盪器下的結果相近，因此，超音波應是具有混合之效果，藉以增進質傳效果而加速反應。當超音波強度大於 0.005W/ml 時，反應速率隨超音波強度增加而增加。然而在有攪拌的情形下，超音波藉由增進質傳效果，以達到加快反應的效果則無法顯現。進一步探討超音波洗淨槽系統下 isoamylase 反應動力學，發現 V_{max} 增加 1.9 倍， K_m 增加 4.1(power=7)及 4.5(power=9)倍。而探針系統下，反應速率增加主要是起因於超音波直接裂解枝鏈澱粉，不易討論其動力學性質。

英文摘要

(keyword: ultrasound, isoamylase)

The effect of ultrasound on hydrolysis of amylopectin by isoamylase were investigated. Ultrasound without agitation can enhance reaction with the similar rate to that in the shaker. Thus, it implied that ultrasound may enhance mass transfer. Besides, reaction rate is linearly related to the ultrasound intensity when intensity higher than 0.005W/ml. According to kinetic investigation in the cleaning bath system, V_{max} increases to 1.9 times and K_m to increases 4.1 (power=7) and 4.5 (power=9) times respectively. For probe system, reaction rate enhancement may actually result from

amylopectin degradation under ultrasound, therefore it is hard to discuss its kinetic property.

介紹

超音波已廣泛被使用在許多地方，例如：清洗、除氣(degas)、打破細胞、萃取、乳化、檢測等，且更因為超音波的物理及化學效應，不少研究將超音波應用在有機合成、聚合反應及金屬催化反應中。因此，探討超音波對於蛋白質等分子的影響亦有其必要。

當將超音波用於自由酵素反應中，酵素分子可能因超音波所具有的氣穴現象(cavitation)而失活，因此，雖然一般化學反應中氣穴現象扮演重要角色，但就自由酵素反應而言，氣穴現象是否為必要仍值得討論。目前超音波在自由酵素的應用上通常是使用澱粉水解酵素，例如：- amylase、glucoamylase 以及 invertase。本研究將藉由 isoamylase 水解澱粉反應來探討超音波在其中具有何種影響，並且和前人的研究相比較。

此外，目前有關於超音波方面的論文，通常缺乏超音波強度的資料，或是採用的方法不一，彼此間相互對應的關係尚未建立，以致於在比較各實驗數據上常有困難。本實驗使用到超音波洗淨器及探針(probe)兩種系統，因此嘗試在目前已被使用的超音波強度測量法中，找出一個兩種系統皆適用的方法。

結果與討論

鋁箔法與熱量測定法之關係

將超音波洗淨槽系統下，對於以試管做為反應容器，在 40 °C 下以鋁箔法和熱量測定法測得之超音波強度相比較，發現在此強度範圍之內，二種方法之間有極佳的線性關係。當欲測量系統之體積較小時，雖然熱量測定法測得整體之強度，而鋁箔法測出局部之強度，但當鋁箔法測量之範圍可涵蓋整個欲測系統時，二者之間便易於對照。另一方面，雖然鋁箔法未將超音波通過反應容器器壁之損失除去，無法測得反應系統真正接受之超音波能量，然而，由鋁箔法和熱量測定法之間的線性關係，鋁箔法測得之數值仍可作為反應系統接受到超音波強度大小之指標。

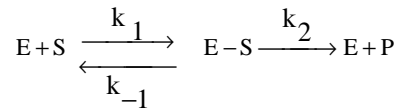
探針系統及超音波洗淨槽中燒杯系統，對於其超音波強度之量測，因欲測量系統之體積較大，熱量測定法測得整體平均值，而鋁箔法測得局部分布值，故此二者間難以比較。

反應速率與超音波強度之關係

超音波洗淨槽試管系統下的實驗數據可發現：超音波強度對反應速率有直接影響，因熱量測定法能測出反應系統實際接受到的超音波強度，故將 40 °C 下以此法測出之強度對其反應速率(S=3.5g/l)作圖，如圖 A，在強度大於 0.005W/ml 時，反應速率隨強度增加而呈線性增加，而強度為 0.005W/ml，反應速率為 0.0646O.D./min，此速率和未施予超音波下之反應速率 0.0626 O.D./min 相近，因此，超音波強度必須大於一限制值，方可促進反應。

超音波對 Isoamylase 動力學性質之影響

對於 isoamylase 的反應動力學，我們採用 Michaelis-Menten 模式探討。Michaelis 與 Menten 二氏提出酵素(E)與基質(S)間的反應機構如下：



$$V = \frac{V_{\max} S}{K_m + S}$$

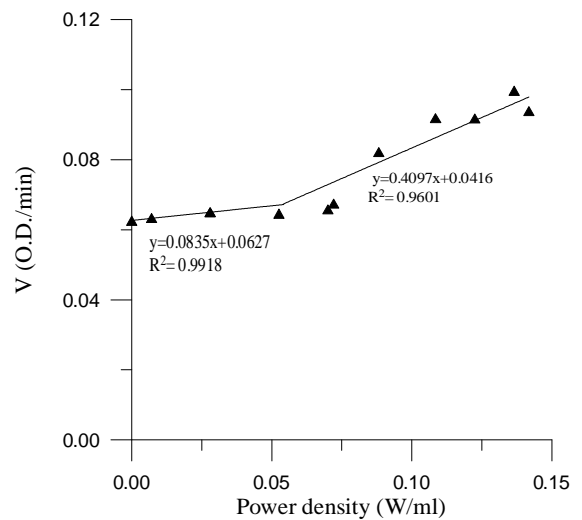


圖 A 反應初速率與超音波強度之關係(超音波洗淨槽試管系統, 40°C, S₀=3.5g/l, 70U/ml)

對於超音波洗淨槽系統，以不同基質濃度 S 做實驗，並取得初始速率 V 之值，再以 1/V 對 1/S 繪圖，即可得 Lineweaver-Burk 圖。由圖中之截距(1/V_{max})及斜率(K_m/V_{max})可得動力學參數，列於表 B。

表 B 超音波洗淨槽系統下, isoamylase 水解澱粉反應之動力學參數 (40 °C, E=70U/ml)

	V _{max} (O.D./min)	K _m (g/l)
Without ultrasound	0.0667	0.33
Power=7	0.1300	1.36
Power=9	0.1302	1.50

由表 B 可知，超音波洗淨槽下的 isoamylase 反應之 V_{max} 值約增加 1.9 倍，而 K_m 值約增加 4.1(power=7)及 4.5(power=9)倍。若超音波扮演增進質傳速率的角色，而且除了增進酵素與基質間的質傳效果，更進一步增進中

間產物(E-S)自酵素上脫去的質傳效果，增進酵素與基質複合物移除之速率，相對於使第二步驟反應速率增快，因此 k_2 增加，造成 V_{max} 上升。而 K_m 增加則顯示超音波使酵素和基質間的親和力減小。如果超音波傾向於分開基質與酵素，一方面使已和酵素結合的基質脫去形成產物，增進產物釋放的速率，亦有可能使基質經由第一步驟之逆反應和酵素分離，造成中間產物濃度下降。而中間產物濃度下降，又會促成酵素與基質進行第一步驟的反應，所以超音波會影響 k_{-1} 與 k_1 的比值，如果 k_{-1} 的增加比例大於 k_1 ，將造成 K_m 值上升。

而探針系統下，以不同基質濃度 S 做實驗，並取得初始速率 V 之值，再以 $1/V$ 對 $1/S$ 繪圖，即可得 Lineweaver-Burk 圖可得動力學參數，列於表 C。然而探針系統

表 C 探針系統下，isoamylase 水解澱粉反應之動力學參數 (40, E=70U/ml)

	V_{max} (O.D./min)	K_m (g/l)
Without ultrasound	0.1696	1.09
Power=5	0.3988	4.19

超音波下反應速率增加，主要是由於超音波直接裂解枝鏈澱粉，並非真正增加酵素水解枝鏈澱粉之速率，若考慮將超音波直接造成枝鏈澱粉降解之效果扣除，再討論其動力學性質。因此，將初始速率 V 減去超音波直接裂解枝鏈澱粉的速率，再以此值之倒數對 $1/S$ 繪圖可發現：若扣除超音波直接裂解枝鏈澱粉的效應，則無法以 Michelis-Menten 模式討論，而且反應速率出現小於未施以超音波的情形。酵素反應速率減小的原因可能為：超音波很快地自分歧處裂解枝鏈澱粉，造成酵素能反應的有效基質濃度下降，因此反應速率反而變小。

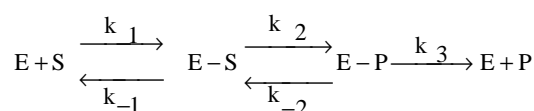
自由酵素在超音波下反應的相關研究尚有：Barton 等人[1996]研究 glucoamylase 及 -

amylase 在超音波下的反應以相同方法分析，可看出此二反應皆有增進之現象，由各基質濃度下的初速率值可決定其動力學參數。而 -amylase 的實驗結果中，當基質濃度大於 130g/l 時，有基質抑制之現象，因此，僅就 S 130g/l 的實驗數據進行動力學討論。但由 $1/V$ 對 $1/S$ 作 Lineweaver-Burk 圖時，若 S 值較大時，在取倒數之後將使點過於集中，而傾向於由準確性較低的低基質濃度下之數據來決定斜率，因此，由 S/V 對 S 作圖可得一直線，其斜率為 $1/V_{max}$ ，截距為 K_m/V_{max} ，因而可決定其動力學參數，列於表 D。由此可看出：超音波的施加可使 V_{max} 及 K_m 之值增加，這樣的結果和我們的結果類似。

表 D Glucoamylase 及 -amylase 於超音波下之動力學參數(實驗數據:Barton 等人,1996)

Enzyme		V_{max} (μ mol/min)	K_m (g/l)
Glucoamylase	Without ultrasound	2.925	11.700
	Ultrasound	3.804	15.216
-amylase	Without ultrasound	6.105	12.211
	Ultrasound	6.467	12.935

由前人對 glucoamylase 反應機構之研究 [Tanaka et al.,1982；Natarajan,1996]，可知其反應機構如下：



其中速率決定步驟為第三步驟：產物釋放之步驟。若將其速率式寫成 Michelis-Menten 之形式，則其動力學參數之意義如下：

$$V_{\max} = [E]_0 \cdot k_{\text{cat}}$$

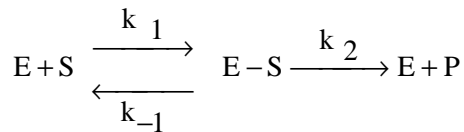
$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2 k_3}{k_{-2} + k_2 + k_3} \approx k_3$$

(Θ $k_{-2} \ll k_2$, $k_3 \ll k_2$)

$$K_m = \frac{k_{-1}(k_{-2} + k_3) + k_2 k_3}{k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)}$$

$$\approx \frac{[E][S]}{[ES][EP]}$$

而 α-amylase 反應機構如下 [Suetsugu et al., 1971] :



速率決定步驟為第二步驟

由此可推論，欲有效增加反應速率，必須提升速率決定步驟之速率，增進產物釋放之速率。由 Barton 等人 [1996] 之研究可發現：於超音波下有反應增進效果之酵素，其反應速率決定步驟為產物釋放之步驟，因此，若超音波扮演增進中間產物質傳之角色，將有助於反應的 V_{\max} 值增加。而超音波加速中間產物脫去之速率，將影響中間產物之濃度，因此，造成在此步驟之前的反應步驟亦受影響，如果正逆反應改變比率不同，將影響 K_m 之值。而 isoamylase 在超音波下之 V_{\max} 及 K_m 皆增加，很有可能超音波在此反應中亦具有增進中間產物質傳之效果，而此點尚待進一步的探討與研究。

REFERENCE

Barton, S., Bullock, C., and Weir, D., "The affects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance" *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 190-194, (1996)

Natarajan, S. K. and Sierk, M. R., "Identification of enzyme-substrate and Enzyme-product complexes in the catalytic mechanism of glucoamylase from *Aspergillus awamori*" *Biochemistry*, **35**, 15269-15279, (1996)

Suetsugu, N., Hiromi, K. and Ono, S., "Kinetic studies by stopped-flow method of hydrolysis of *o*-nitrophenyl α-maltoside catalyzed by saccharifying α-amylase from *Bacillus subtilis*" *J. Biochem.*, **69**, 421-424, (1971)

Tanaka, A., Ohnishi, M. and Hiromi, K., "Stopped-Flow kinetic studies on the binding of gluconolactone and maltose to glucoamylase" *Biochemistry*, **21**, 107-113, (1982)