

第一篇 酶学基础

第一章 绪 论

新陈代谢是生命活动最本质的特征之一,而组成生物体内新陈代谢的千千万万种化学变化,除极少数例外,几乎全都是在一种被称为酶的生物催化剂的催化下完成的。离开了酶的催化作用,生物体内的新陈代谢就无法进行,生命活动就会停止。因此,对酶进行深入的研究,对于阐明生命现象的本质具有非常重要的意义。

迄今为止,人们发现,绝大多数酶都是由简单蛋白质或复合蛋白质组成的。这种由生物体产生的具有催化作用的蛋白质就称为酶。新近的研究证实,某些核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)也具有催化功能,分别被称为核酶(ribozyme)和脱氧核酶(deoxyribozyme)。这就将人们对酶本质的研究推向一个新的阶段。

随着人类生产活动的发展和科学技术的进步,人们对酶的研究越来越深入,逐渐形成了一个专门研究酶及其催化反应的学科,被称为酶学(enzymology)。目前,酶学已成为一门内容广泛、发展迅速的学科,其分支遍及众多不同的领域,并与很多学科密切相关。

酶工程(enzyme engineering),又称酶工艺学或酶技术(enzyme technology),是在1971年第一届国际酶工程会议上才得到命名的一项新技术。它是指在一定的生物反应器内,利用酶的催化作用,进行物质转化的技术。酶工程是酶学、分子生物学与化学工程及电子学、计算机等工程学科交叉渗透、相互融合而形成的新技术。酶工程主要研究酶的研制和生产,酶分子的修饰和改造,酶和细胞的固定化技术,酶反应器的设计和研制,以及酶在工业、医药、农业、林业、牧业、渔业、化学分析、环境保护、能源开发以及生命科学研究等方面的应用。

本书将介绍酶学基础理论,酶的生产、固定化和反应器、酶的应用,酶的分子工程,以及酶学和酶工程研究的新进展。

第一节 酶学概述^[1~18]

与很多其他学科一样,酶学的产生和发展,起源于人类的生产实践活动。早在远古时期,人们从自己的生活经验和生产活动中,就逐渐感觉到酶的存在。但是,并没有真正认识到酶的本质和作用,当然更谈不上对酶进行深入的研究。到15~16世纪,欧洲由于生产力的发展,自然科学的发展非常迅速。随着与酶有关的生命科学的进步,人们对酶的认识和研究得以不断深入。

1878年,Kühne最先使用来自希腊的“enzyme*”来称呼酶。1897年,德国科学家 Hans Büchner 和 Eduard Büchner 兄弟俩利用酵母的无细胞抽提液,成功地使葡萄糖发酵,生成酒精。这就证明,酶能够以溶解的、有活性的状态从细胞中分离出来,从而推动了对酶的分离技术和酶理化性质研究的发展,促进了对与生命过程有关的各种酶系统的深入探讨。1926年,美国生物化学家 James B. Sumner 第一次从刀豆中得到脲酶结晶,并证明了脲酶的蛋白质本质。此后酶学就逐渐形成和发展起来。以下简要回顾酶学发展的历史。

一、古代人们对酶的认识

在国外,人们对酶的认识与消化和发酵过程密不可分。公元前 7000 年,很多地区的人们都开始利用由小牛、小羊胃中制取的干胃膜生产奶酪。这是由于胃膜中凝乳酶作用的结果。据考证,啤酒起源于公元前 7000 年的地中海南岸地区,后传入欧洲、美洲和东亚。葡萄原产于亚洲西南小亚西亚地区。公元前 5000 年,美索不达米亚已开始栽培葡萄并酿造葡萄酒。啤酒和葡萄酒的酿造都利用了酵母细胞内酶的作用。有报道称,早在公元前 800 年,古希腊诗人荷马(Homer)在荷马史诗中就已经谈到酶的作用。

我国人民早就在自己的生活和生产活动中,积累起有关利用酶催化作用的经验。酒的酿造、饴糖的制作以及酱油和食醋的生产等都是利用酶的作用为人类服务的实例。据古籍记载和考证,早在仰韶文化前期(距今六七千年前),我国就出现了早期的黄酒。到战国时期(公元前 475 年),浙江绍兴等地已开始生产黄酒。迄今为止,绍兴的元红酒、加饭酒等仍然驰名中外。据《战国策》记载,夏禹时代(公元前 21 世纪)仪狄做酒,酒已盛行。后来禹的孙子太康甘酒嗜音,盘游无度,为诸侯所逐。酒是酵母细胞内酶作用的产物。酿酒用的酒母古时称为“曲”或“酶”,“酶”古时通“媒”。据《书经》记载,“若作酒醴,尔为曲蘖”。现代生物化学仍用“酶”字表示促进生物体内化学反应的媒介物质——催化剂。据《周礼·天官篇》、《礼记·内则》、《说文解字注》、《博物志》等古籍记载,我国从周朝(公元前 12 世纪)起,已开始制造酱、酱油和食醋。这些食品都是发酵产品,发酵则是由酶所催化和促进的。周朝时,酱的种类已经很多,有“百酱”之称。公元前 6 世纪,孔子说:“不得其酱不食”,可见酱早已成为调味的必需品。公元前 12 世纪的周朝,我们的祖先也已知道用风干、磨碎的麦芽粉来制饴。饴即饴糖,是大麦发芽时经酶作用转变成的麦芽糖。据《周礼》记载,饴为五味之一。《诗经》记载,“周原膴膴,萋茶如饴”。这句话是说:“周国的土地非常肥沃,生长出的野菜像饴糖一样甘鲜可口。”我们的祖先也早已发现酒曲对胃肠疾病的治疗作用。据《左传》记载,鲁宣公 12 年(公元前 597 年),叔展曰:“有麦曲乎?曰无。有山曲穷乎?曰无。河鱼腹疾奈何?”“山曲穷”是中药川芎的别名。“河鱼腹疾”乃腹泻的比喻。这句话的大意是:“既没有麦曲,又没有山曲穷,怎么能治疗腹泻呢?”迄今为止,“酒曲”仍可用于治疗某些胃肠疾病。早在春秋战国时代(公元前 841—221 年),漆的应用已很普遍。而当时所用的漆是酶作用于漆树脂的氧化产物。此外,我们的祖先在古代就知道利用胰脏软化皮革,利用粪便使兽皮脱毛、制造皮革等。所有这一切,也都是不自觉地利用了酶的作用。

* 据 J. S. Fruton 考证,“enzyme”一词早在 12 世纪,就已经被亚美尼亚哲学家 Theorionus 用作哲学词汇。

二、酶学的形成与发展(1783—2009)

酶学的形成和发展与运用实验方法对酶进行研究密不可分。下面让我们追踪一下近代酶学的发展轨迹。

表 1-1 列举出酶相关研究及其应用发展史上的一些重大事件。

表 1-1 酶相关研究及其应用发展史上的一些重大事件

年份/年	重 大 事 件	有 关 人 物
公元前 7000 年	利用由小牛、小羊胃中制取的干胃膜生产奶酪	
1783	证明肉类可被胃液水解	Lazzaro Spallanzani
1814	发现发芽的大麦可以降解淀粉和生产糖类	Kirchhoff
1833	从麦芽的水抽提物中,提取出一种活性成分,被称为“diastase”(淀粉酶),首先发现了酶	Payen 和 Persoz
1835—1837	提出“催化作用”的概念	Jöhn Jacob Berzelius
1846	发现蔗糖酶活性	Dubonfout
1854—1864	证明发酵作用由微生物引起	Louis Pasteur
1867	利用“enzymes”(酶)一词来称呼酶	Willy Kühne
1893	证明酶是催化剂,并给催化剂下了定义	Wilhelm Ostwald
1894	证明酶的专一性,预言了酶的立体专一性,提出酶和底物的关系是“锁和钥匙”关系的假说	Emil Fisher
1894	利用表面培养法由米曲霉(<i>Aspergillus oryzae</i>)生产“高峰淀粉酶”(“Taka diastase”)	Takamine(高峰让吉)
1897	提出“辅酶”(coenzyme)一词	Gabriele Bertrand
1897	利用酵母的无细胞抽提物使葡萄糖发酵,生成酒精	E. Büchner, H. Büchner
1905	浓缩出第一个辅酶,以后证明是 NAD	Harden 和 Yang
1906	利用肝脏抽提物由水解丙酯制得的外消旋混合物中分离出 L-亮氨酸	Warburg
1908	利用杏仁中的 D-醇腈醛化酶合成光学活性的氢醇	Rosenberg
1908	利用胰脏内的酶,在制革工业中,进行皮革的软化	Otto Röhm
1909	证明 pH 对酶作用的影响	Sørensen
1911	利用木瓜蛋白酶防止啤酒浑浊	Wallerstein
1911—1913	在高浓度酒精和丙酮存在下合成葡萄糖苷	Bourquelot, Bridel 和 Verdon
1912	发现脱氢酶	Batali Stern
1912	假设氧的活化需要呼吸酶。证明呼吸时要有氧的参与,发现该酶被氰化物抑制	Warburg
1913	发展了酶作用的动力学理论	Michaelis 和 Menten
1913—1915	用胰脏酶生产洗涤剂,出售第一个产品“Burnus”	Otto Röhm
1916	将蔗糖酶固定在活性炭上,能保持其活性,开创固定化酶雏形	Nelson 和 Griffin

续表

年份/年	重大事件	有关人物
1917	利用枯草芽孢杆菌生产淀粉酶,用作纺织工业的退浆剂	Boidin 和 Effront
1925	对酶的动力学理论做重要修正	Briggs 和 Haldane
1926	第一次由刀豆制备出脲酶结晶,证明它是一种蛋白质	Sumner
1930—1933	分离出胃蛋白酶结晶,证明它是蛋白质	Northrop
1932	发现“黄酶”(flavo-enzyme)是一种黄素蛋白	Warburg 和 Chiristian
1932	分离出细胞色素 C,并在特殊的心肌制剂中重建了电子传递系统	Keilin
1933	证明糖酵解和发酵过程中关键性中间物	Embden 和 Meyerhof
1935	发现核黄素(维生素 B ₂)是黄酶的组成成分	Kuhn
1936	在苯存在下利用胰脏的脂肪酶改进酶促酯类的合成	Ernst Sym
1937	提出三羧酸循环的假说	Krebs
1939—1941	提出 ATP 在能量传递循环中具有中心作用的假说	Lipmann
1940	提出一个基因和一个酶的对对应关系	Beadle 和 Tatum
1943	首次将分光光度法用于酶-底物相互关系研究	Chance
1944	第一次用过渡态理论解释催化现象	Linus Pauling
1951	证明 CoA 在脂肪酸氧化中的作用,稍后,分离出脂肪氧化酶	Lynen, Green 和 Ochoa
1953	提出 DNA 双螺旋结构模型	Watson 和 Crick
1953	阐明第一个蛋白质胰岛素的氨基酸排列顺序,证明蛋白质的化学本质	Frederick Sanger 和 Hans Tuppy
1955	发现多核苷酸磷酸化酶	Ochoa 和 Grunberg - Manago
1956	发现 DNA 聚合酶	Kornberg
1957	提出酶合成中的阻遏作用	Vogel, Magasanik 等
1958	提出酶的“诱导契合”理论,解释了酶的催化理论和酶的专一性	Koshland
1958—1959	发现 DNA 介导的 RNA 聚合酶	Weiss, Hurwitz 等
1960	阐明核糖核酸酶的氨基酸排列顺序	Hirs, Moore 和 Stein
1960	深层培养地衣芽孢杆菌(<i>Bacillus licheniformis</i>),开始大规模生产蛋白酶	Novo 公司
1961	提出变构酶的功能和作用假说	Jacob, Monod 和 Changeux
1967	发现限制性内切酶	Robert 和 Yuan
1969	首次人工合成具有活性的牛胰 RNA 酶	Gutt 和 Merrifield
1972	首次使 SV-40 DNA 与噬菌体 P22 DNA 在体外重组成功	Berg
1973	建立 DNA 重组技术,使用限制酶和连接酶切割、连接细菌中的 DNA,并产生新 DNA,导致了基因工程的诞生	Stanley Cohen 和 Herbert Boyer

续表

年份/年	重 大 事 件	有 关 人 物
1979	发现左手螺旋的 DNA, 命名为 Z-DNA	Rich 和 Wang
1980 年以后	利用基因工程技术提高酶的产量, 利用蛋白质工程技术改变酶的性质	众多研究者
1981	发现 RNA 分子具有酶功能, 被称为核酶	Cech 和 Altman
1985	建立定点突变技术	Michael Smith
1985	发现参与端粒 DNA 复制的端粒酶	E. H. Blackburn 和 C. W. Greider
1986	研制出抗体酶(abzyme)	L. R. Lerner 和 P. G. Schultz
1986	提出“RNA 世界”假说, 认为地球上早期生命分子先有 RNA, 后有 DNA	Walter Gibert
1988	建立聚合酶链式反应(PCR)技术	Karry B. Mullis
1993	阐明 ATP 合酶(ATP synthase)合成与分解的分子机理	Boyer 和 Walker
1994	发现 DNA 分子能够切割 RNA, 称为脱氧核酶	Ronard R. Breaker
1994	研制出 DNA 分子计算机	Leonard M. Adleman
2000—2006	2000 年完成人类基因组工作框架图, 2003 年美国、英国、法国、德国、日本和中国众多科学家完成精细图, 2006 年完成全部染色体的注释	多国的科学家
2006	通过体外加速进化, 将核酶转变为脱氧核酶	Gerald F. Joyce
2008	研制出 RNA 分子计算机	Christina Smolke
2009	模拟地球早期环境, 首次合成类 RNA	John D. Sutherland

1783 年, Lazzaro Spallanzani 用小铁丝笼盛肉喂鹰, 结果发现食物的消化是由于胃液的作用, 而不是靠机械磨碎作用。他成为利用实验进行有关酶研究的第一人。1814 年 Kirchhoff 发现发芽的大麦可以降解淀粉并生成糖类。1833 年 Payen 和 Persoz 利用酒精从麦芽的水抽提物中, 得到一种对热不稳定的沉淀物。这种物质具有将淀粉分解成可溶性糊精的活性, 被他们命名为 diastase(淀粉酶)。此词来源于希腊语, 是“分离”的意思。即该物质具有从淀粉颗粒的不溶性包膜内分离出可溶性糊精的能力, 尽管 Payen 和 Persoz 只得到一种很粗的淀粉酶制剂, 但是, 由于他们已经采用了最简单的抽提、沉淀等纯化方法, 获得了一种无细胞制剂; 并指出了其催化活性和热不稳定性。他们的研究涉及了酶的一些本质性问题, 所以, 人们认为 Payen 和 Persoz 首先发现了酶。

早期人们对酶的研究工作, 促使 Berzelius 在 1835—1837 年提出了“催化作用”的概念。这个新概念的产生, 极大地推动了化学的发展, 迄今为止, 催化化学已经成为化学中一个重要的、独立的分支学科。由此可见, 人们对于酶的认识从一开始就和其具有催化活性密切联系在一起。后来, Duclaux 在 1898 年提出, 利用“diastase”末尾的三个字母, 即词尾“-ase”, 加到酶所作用的物质的名称的词根上, 就组成该酶的英语名称。这就奠定了酶的系统命名法的基础, 并沿用至今。

在发现酶的早期, 人们注意到酶的作用与发酵时酵母的作用非常相似, 因此用“ferment”(酵素)一词来称呼酶。19 世纪后半叶, 德国 Liebig 和法国 Louis Pasteur 在对酶的

认识方面发生了激烈的争论。曾经对微生物学和发酵工业做出很大贡献的 Pasteur, 错误地认为发酵过程是活的微生物细胞作用的结果。他将酶分为与活细胞无关的“非活体酵素”(unorganized ferment) 和与活细胞有关的“活体酵素”(organized ferment) 两类。胃液中的酶能在细胞外发挥消化作用, 属于“非活体酵素”。而引起糖类发酵的酵母的发酵酶, 不能与酵母活细胞分离, 离开活细胞就没有作用, 属于“活体酵素”。Liebig 则认为酵母之所以引起糖类的发酵作用, 并不是由于酵母活细胞本身的作用, 而是由于酵母细胞所含有的酶的作用。在合适的条件下, 无酵母细胞的酶制剂仍然可以引起发酵。但他未能用实验证明他的观点, 因此, 没有得到当时其他科学家的赞同。

1878 年 Liebig 和 Pasteur 之间的争论还没有结束。为避免使用“非活体酵素”和“活体酵素”名称的不便, Kühne 最先用来自希腊语的“enzyme”(酶)来称呼酶。在希腊语中, 其意义是“在酵母内”。有人对提出该名称的理由不太理解。Kühne 当时曾强调指出: “这一命名并不试图包含任何特殊的假说, 只是说明在酵母内存在某些物质, 具有这种或那种所谓发酵类型的活性。但是, 该名称并不局限于酵母内的发酵酶, 而是试图表明复杂的生物体(从中可以获得胃蛋白酶、胰蛋白酶等各种酶), 并不像某些人所相信的那样, 与单细胞生物体有本质的区别。”Kühne 提出的“enzyme”这个术语得到人们的公认, 并一直沿用至今。但“酵素”一词仍为某些国家(如德国、日本)所沿用。我国采用的汉字“酶”, 非常恰当。《五半集韵》称, 酶, “酒母”也, 《会韵》记载, 酶通作“媒”, 可见“酶”字不仅在意义上与英语 enzyme 或 ferment(都与酿酒发酵有关)相当, 而且比“酵素”一词简洁。在英语中, 酶名之后缀常为“-ase”, 个别酶则为“-in”。我国均以后缀“酶”字表示, 也很合理。

1894 年 Emil Fisher 对一些糖代谢的酶类进行了深入的研究, 发现了酶与底物(即酶作用的物质)之间的特殊关系, 证明了酶的专一性, 预言了酶的立体专一性。他还在实验研究的基础上, 提出了酶和底物的关系是“锁和钥匙”的假说, 成功地解释了酶的专一性。1897 年 Gabriele Bertrand 提出了辅酶一词。同样在 1897 年, Büchner 兄弟俩利用石英砂磨碎酵母细胞, 制备无酵母细胞的抽提液, 成功地实现了糖类无细胞的发酵, 生成酒精。有人认为, 酶学研究始于 Büchner 的发现。据俄语文献记载, 在此前后, Манассеина 用细砂磨碎酵母细胞, 制成无酵母细胞的匀浆, Лебедев 将干燥酵母浸入温水, 然后过滤, 制得浸出液。他们也能利用这些无酵母细胞的制剂, 实现糖类发酵。所有这些研究工作推翻了 Pasteur 的观点, 使 Liebig 和 Pasteur 之间的争论得以结束。Büchner 为此获得了 1911 年的诺贝尔奖。

1909 年 Sørensen 证明了 pH 对酶作用的影响。1913 年 Michaelis 和 Menten 提出了酶作用的动力学理论。1925 年 Briggs 和 Haldane 在酶的动力学理论方面做出了重要修正。

此后, 人们越来越认识到酶是蛋白质, 逐渐阐明了酶的化学本质。1926 年 Sumner 首次从刀豆中获得了第一个结晶的酶——脲酶, 并用实验方法证明了它是一种蛋白质。脲酶能够催化尿素水解成 CO_2 和 NH_3 。在 1930—1933 年, Northrop 又分离制得了胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的结晶, 并开展动力学的研究, 更加深了人们对酶的蛋白质本质的了解。

20 世纪 20 年代由 Svedberg 发展起来的超离心技术, 能够使高分子物质在很高的离心力作用下沉降下来。超离心技术的研究证实, 溶液中的蛋白质通常不是胶体悬浮液, 而是由具有一定相对分子质量(M_r)的均一的分子组成的。对酶而言, M_r 在 $10^4 \sim 10^7$ 。

到了 20 世纪 50 ~ 60 年代,很多研究工作证实酶具有相当的柔性。为此,1958 年 Koshland 提出了“诱导契合”学说(induced fit theory),用于解释酶的催化理论和酶的专一性。同时也搞清楚某些酶的催化活性能够对生理条件的变化做出反应。1960 年 Hirs、Moore 和 Stein 阐明了核糖核酸酶的全部氨基酸排列顺序。核糖核酸酶能够催化核糖核酸水解。这不仅为酶的蛋白质本质提供了最直接的证据,而且,使人们可以用精确的化学术语来描述酶的结构。1961 年 Jacob、Monod 和 Changeux 提出了变构酶(allosteric enzyme,又称别构酶)的功能和作用假说,以定量方式解释了某些酶的催化活性可以通过与小分子(效应物)的结合来进行调节。由此提供了了解细胞中很多酶的调控作用的基础。变构酶假说的重要特征是,他们认为效应物与酶的结合诱导了酶结构的改变,并可以用于解释有关现象。1965 年首次运用 X-射线衍射技术阐明了溶菌酶的三维结构以及结构与功能的关系。溶菌酶能催化某些细菌细胞壁多糖的水解,是由 129 个氨基酸残基组成的单肽链蛋白质。此后,越来越多的酶的氨基酸排列顺序和三维结构,及其相互关系得以阐明。

1969 年, Gutt 和 Merrifield 首次用化学方法人工合成了具有催化活性的牛胰核糖核酸酶,充分证明酶和非生物催化剂,即普通的化学催化剂,在本质上没有区别。不过当时合成的产品活性纯度和催化活性都不很高。

20 世纪 70 年代重组 DNA 技术的建立和基因工程的诞生,及其在酶学研究中的应用,大大推动了酶学理论研究和酶应用技术的发展。1985 年 Smith 建立的定点突变技术能够在指定的位点进行突变,改变酶的催化活性和专一性。此项研究被授予 1993 年诺贝尔化学奖。这一发现有助人们了解酶的作用机理,以及为设计具有特定功能的酶开拓了新的途径。例如,在乳酸脱氢酶的活性中心引入三个特定的氨基酸残基的突变,其专一性就发生改变,变得与苹果酸脱氢酶的专一性一样。

20 世纪 80 年代酶学研究的一个重大发现是,除去由蛋白质组成的“经典”酶以外,其他生物高分子物质 RNA 和 DNA,也具有催化活性。1981 年 Cech 研究组发现四膜虫的 26S rRNA 的前体,在没有蛋白质存在的情况下,能够进行内含子的自我剪接加工,形成成熟的 rRNA,证明 RNA 分子具有催化功能,并将其称为核酶。1983 年 Altman 研究组,从核糖核酸酶 P 中分离的蛋白质组分都没有催化活性,而其中的 RNA 组分至少能够催化 6 种 tRNA 前体的加工,其结论也是 RNA 具有核糖核酸酶的活性。

1985 年 E. H. Blackburn 和 C. W. Greider 首次在四膜虫中分离并鉴定出参与染色体端粒 DNA 复制的一种特异的逆转录酶——端粒酶。他们发现,端粒变短会引起细胞衰老,而端粒酶能够维持端粒的长度。他们的研究成果对衰老和癌症的研究具有重要意义。2009 年 10 月他们与 J. W. Szostak 一起被授予 2009 年诺贝尔生理学或医学奖。

1986 年 Lerner 和 Schultz 各自领导的研究组分别报道,利用事先设计好的过渡态类似物作为半抗原,应用普通单克隆技术获得了具有催化活性的抗体,被称为抗体酶。这就为酶结构和功能的研究,以及酶的应用,开辟了一个新的领域。

因建立核酸碱基顺序测定方法获得 1989 年诺贝尔化学奖的 Walter Gilbert 于 1986 年提出“RNA 世界假说”(RNA world hypothesis),认为地球上早期的生命分子是 RNA 先出现, DNA 后出现。而且这些早期的 RNA 分子同时具有如同 DNA 的遗传信息储存功能,以及如同蛋白质一样的催化能力,可以支持早期的细胞或前细胞生命的运作。

ATP 合酶(ATP synthase)是生物体内进行氧化磷酸化和光合磷酸化的关键酶。Boyer

从 20 世纪 60 年代起就开始进行 ATP 合酶催化机理的研究。1993 年他提出“结合变化机理 (binding change mechanism)”假说,阐明了 ATP 合酶合成与水解的分子机理,获 1997 年诺贝尔化学奖。

1994 年 Breaker 首次发现了能够切割 RNA 的 DNA 分子,并将其命名为脱氧核酶。1995 年 Cuenoud 又发现某些 DNA 分子也具有催化功能。这就改变了只有蛋白质才能有催化功能的传统观念,也为先有核酸,后有蛋白质,提供了进化的证据。

2006 年 Joyce 通过体外加速进化 (accelerated evolution),成功地将一个核酶 (RNA 分子) 转变为脱氧核酶 (DNA 分子)。这一发现不仅为生命起源于“RNA 世界”的假说提供了一个新的证据,而且在临床诊断和治疗方面具有良好的应用前景。

2009 年 5 月 Sutherland 等报道,通过模拟早期地球环境条件,利用生命出现以前的原料,经过一系列化学反应,可以合成一种被称为阿拉伯糖氨基噁唑啉 (arabinose amino-oxazoline) 的重要中间物,进而合成活化的嘧啶核糖核苷酸,最终合成类 RNA。在解开生命起源的谜团的征程中又向前迈出了一大步。

第二节 酶工程概述^[1~7,11~31]

随着人们对酶的本质和重要性认识的深入,随着酶学的形成和发展,酶的应用和酶制剂工业迅速发展起来。与此同时,酶工程也就应运而生。

一、酶制剂工业的兴起和发展

前已述及,早在公元 7000 年以前,远古的人们在不清楚酶的本质和功能的情况下,就开始在生活中利用了酶的催化作用(表 1-1)。他们用小牛、小羊胃中制取的干胃膜来生产奶酪。此后,人们在生活和生产实践活动中越来越多地使用各种不同的粗酶制剂。随着酶应用范围的扩大,促成了酶制剂工业的兴起和发展。

在 19 世纪末和 20 世纪初,开始了酶的商品化生产和应用。1894 年高峰让吉利用表面培养法由米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 生产“高峰淀粉酶”,用作消化剂。1908 年 Rohm 利用胰脏内的酶,在制革工业中,进行皮革的软化。1911 年 Wallerstein 利用木瓜蛋白酶防止啤酒浑浊。1913—1915 年 Rohm 将胰脏内的酶用于洗涤衣服,出售第一个产品“Burnus”。1917 年 Boidin 和 Effront 最先利用枯草芽孢杆菌生产淀粉酶,并在纺织工业中用作退浆剂。此后,从 20 世纪 20 年代到 40 年代,人们运用表面培养技术,陆续生产了淀粉酶、转化酶、蛋白酶、纤维素酶和果胶酶,并应用于不同的工业部门。

但是,只有到第二次世界大战后,由于抗生素工业迅速发展的推动,人们将深层培养技术用于酶制剂的生产,才真正兴起了近代酶制剂工业。1949 年日本开始利用深层培养技术生产 α -淀粉酶,可算作近代酶制剂工业形成的标志。此后,糖化酶(又称葡萄糖淀粉酶)、脂肪酶、乳糖酶、葡萄糖异构酶、葡萄糖氧化酶、氨基酰化酶、凝乳酶、磷酸二酯酶等,也相继开始工业化大生产。其中特别是 20 世纪 50 年代末,糖化酶的大量生产和在酶法生产葡萄糖方面的成功应用,替代了沿用上百年的酸水解工艺,促进了酶制剂工业的大发展,从而成为酶制剂工业发展史上的第一个里程碑。

1960 年丹麦 Novo 公司采用深层培养技术,利用地衣芽孢杆菌大规模生产蛋白酶。20

世纪 60 年代中期,欧洲碱性蛋白酶的大量生产和加酶洗涤剂的广泛流行,进一步促进了酶制剂工业的发展。与此同时,从 20 世纪 50 年代起,Grubhofer、Schleich、Katchalski 和千畑一郎(Ichiro Chibata)等人在 Nelson 和 Griffin 于 1916 年开创的固定酶雏形的基础上,进行了一系列创新性的研究,使酶的固定化技术得以快速发展并成熟起来。固定化酶具有稳定性高,可以反复使用,实现连续化操作,获得高纯度、高产率产品等优点。1969 年,日本首先在工业上应用固定化氨基酰化酶拆分 D,L-酰化氨基酸,生产 L-氨基酸。固定化酶的生产和应用在 20 世纪 70 年代达到了高潮,有近十种固定化酶用于工业生产。特别是 20 世纪 70 年代初,固定化葡萄糖异构酶成功地用于高果糖浆的生产,年产量达到 1 000 多万 t。由此开创了由淀粉制造食糖的新途径,有力地推动了酶制剂工业和整个食品工业的发展,形成了酶制剂工业生产中的第二个里程碑。

1973 年 Cohen 和 Boyer 建立了 DNA 重组技术,从此开启了基因工程时代的序幕。DNA 重组技术的逐步成熟和发展对生命科学的众多领域产生了革命性的影响,成为 20 世纪以来发展最快的学科之一。DNA 重组技术的发展,使人们能通过克隆获得许多种天然的酶基因,并在异源微生物受体中高效表达。自 1984 年诺维信公司成功开发了第一个用于淀粉工业的由基因修饰微生物产生的酶——生麦芽糖淀粉酶(商品名 Maltogenase)以来,该公司现在生产的酶制剂产品的 80% 以上为基因工程产品,而且酶蛋白异源高效表达技术已普及成为国际酶制剂工业中的常规技术手段。此后,诺维信公司等又将定点突变等蛋白质工程技术、酶蛋白的体外进化技术等用于酶制剂的工业生产,开创了酶制剂工业生产的第三个里程碑。

此后,酶制剂走上快速发展的道路,酶制剂品种越来越多,酶制剂产量和销售额越来越大,酶制剂的应用范围越来越广,酶制剂的质量越来越好。

目前世界上生产的商品酶制剂涵盖了酶分类中的六大类酶,通常可以分为工业用酶、临床检测用酶、治疗用酶和研究用酶四类。其中工业用酶近 100 种,其他 3 类酶达到 500 多种。

世界上酶制剂的产量和销售额一直持续增长。1979、1981、1985 年和 1990 年世界酶制剂的产量分别为 5.3、6.5、7.5 万 t 和 10.0 万 t。1993、1996、1999 年和 2002 年世界酶制剂的销售额分别达到 10.2、13.5、19.2 亿美元和 25.7 亿美元。我国酶制剂产量虽大,但销售额不高,只占全世界的 4% 左右。预计全球酶制剂市场复合年增长率为 4% ~ 5%,到 2012 年酶制剂市场将达到 27 ~ 29 亿美元。

尽管酶制剂工业蓬勃发展,但目前酶制剂仍处于供不应求的状态。据市场预测,世界酶制剂的需求量将以每年 6.5% 的比例递增。2009 年世界酶制剂的需求量接近 51 亿美元。

生产酶制剂的公司,经过 20 世纪末和 21 世纪初的一系列并购和重组,目前已经集中到丹麦诺维信公司(Novozymes)、丹麦丹尼斯克公司(Danisco)、荷兰帝斯曼公司(DSM)等几家大公司。这三家欧洲企业在 2008 年分别占有全球酶制剂市场的 47%、21% 和 6%,总共达到 74%,形成高度垄断的格局。

在酶制剂产量增加的同时,酶制剂的质量也在不断提高,以生产高果糖浆的商品化固定化葡萄糖异构酶为例,高果糖浆的产量从 1975 年的 500kg HFCS/kg 固定化酶产品上升到 1997 年 15 000kg HFCS/kg 固定化酶产品。

二、酶工程的形成与发展(1971—2009)

随着酶制剂工业的发展与应用范围的扩大,以及固定化酶研究和应用的日趋普遍,酶工程也迅速形成与发展起来。20 世纪 70 年代后期,在固定化酶基础上发展起来的固定化细胞技术由于迅速发展,在实际应用方面大有后来居上,超过固定化酶之势。

随着研究工作的深入,人们发现,采用适当的固定化技术,可以将微生物细胞和动植物细胞制成固定化细胞。按照细胞的生理状态,可以将固定化细胞分为固定化死细胞、固定化静止细胞和固定化生长细胞。其中固定化生长细胞适用于多酶反应,特别是需要辅酶的反应,受到人们的关注。在工业应用方面,利用固定化生长细胞发酵生产啤酒的研究引人注目。日本 Toshio Onaka 等用海藻酸钙凝胶包埋酵母细胞,可在一天内获得质量优良的啤酒。法国 Corriell 等将酵母细胞固定在聚氯乙烯碎片和多孔砖等载体上进行啤酒发酵中型试验,可连续运转 8 个月。以居乃琥为首的原上海市工业微生物研究所固定化啤酒课题组,1979 年起,利用海藻酸钙凝胶包埋法,制备固定化酵母生长细胞,采用分批式发酵啤酒,从 30L 扩大到 6.5t 规模,取得成功。自 1981 年起,批量生产 10.5°P 黄啤的感官质量、理化指标和卫生标准均符合标准,达到了传统工艺同类产品的水平。到 1982 年 8 月已有 200t 啤酒供应市场。此后,课题组内同事继续扩大到工业生产规模,再次取得成功,正式投入大规模生产。固定化生长细胞技术的进展,也大大推动了微生物生物传感器的发展。

利用化学和分子生物学方法对酶分子进行修饰和改造是 20 世纪 80 年代以来酶工程研究的一项重大进展。目前人们已经利用化学修饰、基因重组、定点突变、抗体酶、蛋白质定向进化、杂合酶等新技术,制备出各种不同的工程酶,其中蛋白质全新设计(protein de novo design)技术更引人注目,可以用于组建自然界原先并不存在的、结构和功能全新的酶蛋白。

1936 年 Ernst Sym 发现,在乙醇、丙酮等有机溶剂中能够进行脂肪酶的酶反应。从 20 世纪 60 年代起,Price、Klibanov、Zaks、Martinek 和 Kuhl 等人大力开展了在非水介质中进行酶反应的研究工作,取得引人注目的成果。1984 年 Zaks 和 Klibanov 在 *Science* 杂志上发表了关于非水介质中脂肪酶催化行为和热稳定性的研究报告,引起了酶学研究领域的广泛重视,形成了一个全新的分支——非水酶学(nonaqueous enzymology)。近些年非水酶学的发展异常迅速,已经在手性化合物的生产、药物和农药的生产、功能性高分子材料的合成、肽类的合成、生物柴油的生产等领域显示出蓬勃的生命力。

20 世纪 90 年代起,交联酶晶体(cross-linked crystals, CLECs)为代表的无载体固定化、定向固定化(oriented immobilization)和共固定(coimmobilization)等固定化新技术的发展,有力地拓展了固定化酶和固定化细胞的应用范围,其中,酶的定向固定化技术能够使酶蛋白以有序方式附着在载体的表面,酶活性的损失降到最小程度。这种有序的、定向固定化技术已经用于生物芯片、生物传感器、生物反应器、临床诊断、药物设计、亲和层析以及蛋白质结构和功能的研究。

1994 年 Leonard M. Adleman 在 *Science* 上载文报道,研制出一种基于 DNA 生化反应的新型 DNA 计算机,开创了生物大分子计算机的时代。2008 年 10 月 Christina Smolke 在 *New Scientists* 上载文报道,研制出一种比 DNA 计算机更先进的、基于 RNA 生化反应的 RNA 计算机,标志着合成生物学(synthetic biology)和生物分子计算机领域向前迈出了重要一步。将来如果将这种生物分子计算机植入哺乳动物或细菌细胞,相应的逻辑门就能表现出更复

杂的运算能力,为生物系统的研究与疾病治疗带来希望。

2009年9月20~24日在荷兰格罗宁根市的 Martiniplaza 会议中心召开了第20届国际酶工程会议。该会议以工业生物催化与新兴的生物经济(bioeconomy)为主题,重点就是开发和利用工程酶,以持续地生产生物燃料(biofuels)和生物材料(biomaterials)。这就为酶工程未来的发展指明了方向。

第三节 酶的化学本质与基本特征^[2~7,11~18,32~40]

一、历史上关于酶的化学本质的争论

在历史上,学者们对于酶的化学本质,曾发生过激烈的争论,Willstatter 等人认为,酶是一种由大分子载体物质携带的活性物质,其本质尚不清楚。1926年 Sumner 从刀豆中获得了第一个结晶的酶——脲酶。脲酶能够催化尿素的水解,结晶的脲酶具有蛋白质的一切性质。经过多次重结晶后,单位质量脲酶的催化活性毫无变化。据此,Sumner 认为,此结晶蛋白质就是酶,酶本身就是一种蛋白质。

Willstatter 等人不同意 Sumner 的观点。他们认为,蛋白质仅仅是酶的载体。Sumner 提出了有力的反驳,如果酶仅仅是由蛋白质作为载体所携带的物质,那么,经多次重结晶后,载体的数量一定有所增减,也就是说,单位质量结晶脲酶的催化活性必定会有所改变。但是,实际情况是,单位质量脲酶的催化活性并没有变化。这是结晶脲酶就是结晶蛋白质的有力证据,也是 Willstatter 等人不得不承认的论据。

在1930—1933年间,Northrop 又分离、制得了胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的结晶。1932年 Warburg 制得了“黄酶”的结晶。他们还用实验方法证实,有些酶是简单蛋白质,有些酶是复合蛋白质。由此,Sumner 关于酶就是一种蛋白质的观点才被普遍接受。有关酶化学本质的争论才告停止。

后来的研究证实,Sumner 当时制得的结晶脲酶中含有极少量的、对催化作用非常重要的镍(约为总质量的千分之一)。人们庆幸 Sumner 那时没有如此灵敏的分析方法,否则,酶的化学本质还要等很多年以后才能搞清楚。

二、酶的蛋白质本质

酶作为一种蛋白质,具有一般蛋白质的物理、化学性质,主要表现在以下几个方面:

(一) 酶是氨基酸组成的蛋白质

(1) 酶和其他蛋白质一样,是由多肽链组成的生物大分子。多肽链由20种氨基酸通过肽键以共价键方式连接而成。酶蛋白分子的基本组成单位氨基酸,一般都是 α -氨基酸,都是L型的。

(2) 酶和其他蛋白质一样,具有一、二、三、四级结构。一级结构是指肽链中氨基酸残基的排列顺序,又称化学结构。各种多肽链都有自己特定的氨基酸排列顺序。二、三、四级结构又称空间结构、高级结构或三维构象。二级结构是指多肽链主链中原子的空间排列,即主链中有规则的重复构象。二级结构的基本类型有 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角三种。三级结构是指单体蛋白质分子或蛋白质分子亚基(只含一条多肽链)的空间结构。维持蛋白质

三级结构的作用力主要是范德华力、氢键、静电相互作用和疏水相互作用。此外,共价二硫键在维持某些蛋白质的三级结构方面也起着很大作用。四级结构是指蛋白质分子中亚基之间的相互作用。亚基是指具有独立三级结构的多肽链。亚基的数目从两个到几个、几十个、几百个不等。只有由两个或两个以上的亚基组成的酶蛋白分子才具有四级结构。四级结构涉及亚基在整个分子中的空间排列,以及亚基之间的接触位点和作用力。

应该指出,并不是所有的酶都有四级结构。有些只由一条多肽链组成的酶,就没有四级结构。

(3) 酶和其他蛋白质一样,其蛋白质分子的一级结构决定了它的高级结构。而其高级结构,即三维构象,是由多肽链上各个单键的旋转自由度受到各种限制取得平衡的结果。酶的天然构象(包含四级结构)是在一定条件下热力学上最稳定点状态。一般说来,酶分子只有具有二级结构和三级结构后,才具有酶的催化功能。

(二) 酶具有蛋白质的一般理化性质

(1) 酶蛋白分子是两性电解质,酶也具有两性电解质的各种性质,酶也有等电点。

(2) 酶在某些物理因素(如加热、紫外线照射等)和化学因素(如酸、碱、有机溶剂等)的作用下,会变性或沉淀,因而丧失活性。

(3) 酶的相对分子质量很大,一般在 6 000 ~ 1000 000。酶的水溶液具有亲水胶体的性质,不能通过透析膜。

(4) 酶能被酸、碱或蛋白酶水解,最终生成其基本组成单位——氨基酸。酶经水解后,其催化活性丧失。

三、酶本质的新发现——核酶与脱氧核酶

20 世纪 80 年代,人们在酶化学本质研究方面取得了一项重大成果。即用实验方法证明,除去由蛋白质组成的酶以外,某些 RNA 和 DNA,也具有催化活性。1982 年 Cech 研究组发现四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)的 26S rRNA 的前体,在没有蛋白质存在的情况下,能够进行内含子的自我剪接加工,形成成熟的 rRNA,证明 RNA 分子具有核糖核酸酶的催化功能,并将其称为核酶。1983 年 Altman 和 Pace 又分别报道,核糖核酸酶 P 对大肠杆菌 tRNA 前体的加工。他们发现核糖核酸酶 P 中的 RNA 组分,至少能够催化 6 种 tRNA 前体的加工,其结论也是 RNA 具有核糖核酸酶的活性。1984 年 Apirion 等人证明在没有蛋白质存在的情况下,噬菌体 T₄ RNA 能够实现自我断裂。1986 年 Cech 发现 L₁₉ RNA 既具有核糖核酸酶的催化活性,能使底物五聚胞苷酸 C₅ 降解为 C₄ 和 C₃,又具有 RNA 聚合酶的催化功能,使 C₅ 形成 C₆ 或更长的寡聚核苷酸片段。L₁₉ RNA 可以在反应以后恢复原状。它也表现出底物专一性,只作用于寡聚嘧啶核苷酸,对寡聚嘌呤核苷酸则不起作用。而且,对寡聚胞嘧啶核苷酸(C₆)的作用比对寡聚尿嘧啶核苷酸(U₆)的作用更快一些。对 L₁₉ RNA 的动力学研究证明,其催化行为符合蛋白质酶的米氏动力学规律。Cech 和 Altman 因此获得了 1989 年的诺贝尔化学奖。

1994 年 Breaker 利用体外选择技术,首次发现一个小的单链 DNA 分子同样能够催化 RNA 磷酸二酯键的水解。随后又发现 DNA 还具有连接酶的活性等。他将这些具有催化活性的 DNA 称为脱氧核酶。1995 年 Cuenoud 筛选到一些 DNA 序列,并发现这些 DNA 分子能够将自身 5' 羟基,与寡聚脱氧核苷酸活化的 3' 磷酸基相连接。由此,他们设计了一个由 47

个核苷酸组成的单链 DNA E_{47} ,并用实验方法证明这条单链 DNA 分子具有连接两个底物 DNA 小片段的催化活性。

上述研究成果改变了只有蛋白质才能有催化功能的传统观念,使人们对酶化学本质的认识向前大大推进了一步。同时,也为先有核酸,后有蛋白质,提供了进化的证据。

应该指出,与蛋白质本质的酶相比,核酶与脱氧核酶催化的反应种类要少得多,催化效率要低得多。这些事实充分证明,蛋白质和核酸(含脱氧核酸)这两类重要的生物大分子在长期进化过程中形成了不同的分工。生物催化的功能主要由蛋白质承担,而遗传、进化的功能则主要由 DNA 和 RNA 承担。

四、酶作为催化剂的共性

酶作为催化剂,具有一般催化剂的共性。1902 年 Ostwald 给催化剂下的定义:“一个可以改变化学反应速度,但不改变终点产物的物质称为催化剂。”Ostwald 的定义中涉及了增加反应速度和减慢反应速度两个方面。在科学实践中,人们为了应用上的方便,将增加反应速度的物质称为催化剂,而将减慢反应速度的物质称为抑制剂。

酶作为催化剂所具有的共性,主要表现在以下几个方面:

(1) 增加化学反应的速度,不改变化学反应的平衡点。例如,肽类化合物遇水时,肽键会发生自发的水解反应,该反应的速度非常缓慢,没有什么实际意义。但是,当有蛋白酶存在时,该反应则进行得十分迅速。

(2) 在化学反应前后本身数量不发生变化,用量少而催化效率高。因此,尽管细胞内酶的含量相对很低,但是,能够大大加快化学反应的速度。

(3) 降低化学反应的活化能。

(4) 在一定条件下会因中毒而丧失催化活性。酶与一般催化剂相比,更为脆弱,更容易丧失活性。一切能够使蛋白质发生变性的因素,如高温、强酸、强碱、变性剂等都能使酶发生破坏,而丧失活性。

五、酶作为生物催化剂的特性

酶作为生物催化剂,具有其独特的性质。主要是:极高的催化效率,高度的专一性,温和的反应条件,精巧的调节和控制。现分述如下:

(一) 极高的催化效率

在相同的条件下,酶的参与能够使一个化学反应的反应速度大大加快。通常酶可以加快反应速度 10^{14} 倍,表现出极高的催化效率。一般说来,以分子比(molecular ratio)表示,酶催化反应的反应速度,比非催化反应的反应速度高 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍,比其他催化剂催化的反应的反应速度高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。以转换数(turnover number, k_{cat} ,每秒钟每个酶分子能催化底物发生变化的微摩尔数)表示,大部分酶为 10^3 ,最大可达 $10^5 \sim 10^7$ 。

但是,由于一些在通常条件下无法进行的反应,有了酶的存在就能迅速进行;由于酶催化反应、非催化反应以及其他催化剂催化的反应的反应历程不同,反应条件往往也不尽相同;因此,要将酶催化反应、非催化反应以及其他催化剂催化的反应做一个准确的、定量的比较,是非常困难的。通常只能估计出一个下限。

CO_2 的水合反应 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$,在生物体内是由碳酸酐酶催化的。如果没有

碳酸酐酶,这个反应就会很不完全。碳酸酐酶催化的反应是酶催化得最快的反应之一。每个碳酸酐酶分子,在 1s 内,能够使 10^5 个 CO_2 分子发生水合反应。酶催化的反应比非酶催化的反应要快 10^7 倍。由于这两种反应的历程不同,所以,上述估计可能只是一个下限。

尿素的水解反应在 100°C 时不受 pH 的影响,其一级反应速度常数为 $4.15 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$,活化能为 136.8 kJ/mol 。由脲酶催化的尿素的水解反应,在 20.8°C , pH9.0 时,一级速度常数为 $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$,活化能为 92 kJ/mol 。将非酶反应换算到 20.8°C ,其一级反应速度常数为 $3 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ 。因此,酶催化的反应比非酶催化的反应至少要快 10^{14} 倍。

这里列举几个在相同条件下进行的酶催化和非酶催化的反应的反应速度的差别:己糖激酶高 10^{10} 倍,磷酸化酶高 3×10^{11} 倍,乙醇脱氢酶高 2×10^8 倍。

近来,对酶催化反应和非酶催化反应进一步比较研究的结果证明,各种非酶催化反应的反应速度相差很大,可高达 10^{16} 倍,而各种酶催化反应的反应速度一般相差不大,最高只有 10^6 倍(表 1-2)。

表 1-2 酶反应与非酶反应的反应速度的比较

酶	非酶反应的半 反应时间 $t_{1/2}$	非酶反应的速度 常数 $k_{\text{non}}/\text{s}^{-1}$	非酶反应的 相对速度	酶反应的速度 常数 $k_{\text{enz}}/\text{s}^{-1}$	酶反应的 相对速度	酶反应与非酶 反应的反应速度 比较($k_{\text{non}}/k_{\text{enz}}$)
乳酸脱羧酶	7.8×10^7 年	2.8×10^{-16}	1	39	1	1.4×10^{17}
链球菌核酸酶	1.3×10^5 年	1.7×10^{-13}	6.0×10^2	95	2.4	5.6×10^{14}
胞嘧啶脱氨酶	6.9×10 年	3.2×10^{-10}	1.1×10^6	299	7.7	1.2×10^{12}
磷酸三酯酶	2.9 年	7.5×10^{-9}	2.7×10^7	2100	5.4×10	2.8×10^{11}
丙糖磷酸异构酶	1.9d	4.3×10^{-6}	1.5×10^{10}	4300	1.1×10^2	1.0×10^9
碳酸酐酶	5s	1.3×10^{-1}	4.6×10^{16}	1×10^6	2.6×10^5	7.7×10^6

(二) 高度的专一性

一般说来,酶对其作用的底物和所催化的反应表现出高度的专一性。这是酶与普通催化剂的最大区别之一。例如含有糖苷键、酯键和肽键的糖苷类、酯类和肽类,都能够被酸、碱催化而水解。但是,水解这些化合物的酶类却各不相同,不同的酶的专一性程度又很不相同。通常,可以将酶的专一性做如下分类:

1. 化学反应专一性

化学反应专一性指酶对所催化的反应的底物的化学键及组成该键的基团表现出不同程度的专一性。如以 A-B 为底物,则可依据酶对 A、B 与其连接键这三种组成部分专一性程度的不同,将化学反应专一性分为三类。

(1) 绝对专一性 这类酶要求底物的键和 A、B 都必须“绝对正确”,否则无作用。如脲酶只催化尿素的水解,过氧化氢酶只催化过氧化氢的分解等。

(2) 相对专一性 相对专一性又称基团专一性。这类酶除了要求有底物的化学键“正确”以外,还要求基团 A 和 B 中的一侧必须“正确”。如胰蛋白酶要求作用的肽键的羧基端必须是赖氨酸或精氨酸,而对肽键的氨基部分不严格要求。

(3) 键专一性 这类酶只要求连接 A 和 B 的键必须“正确”。例如,酯酶的作用键必须

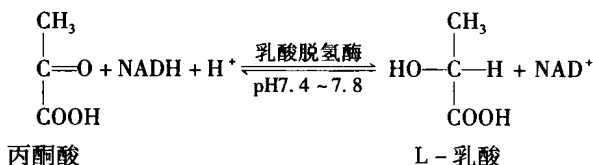
是酯键,而对构成酯键的有机酸和醇(或酚)则无严格要求。

2. 立体结构专一性

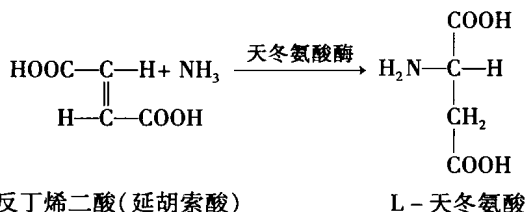
立体结构专一性指酶对所催化反应的底物的立体结构,表现出很高的专一性。可分为两类:

(1) 旋光异构专一性 这类酶只能作用于具有特定旋光异构体的底物。例如 L-氨基酸氧化酶只催化 L-氨基酸氧化,对 D-氨基酸无作用。精氨酸酶只催化 L-精氨酸水解,对 D-精氨酸则无效。

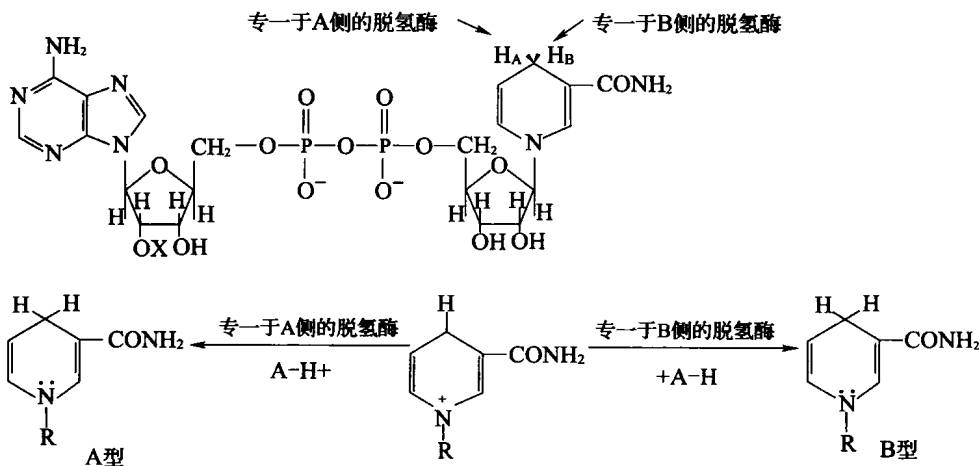
有些酶的底物分子没有不对称碳原子,但产物含有不对称碳原子,其反应产物只能得到一种旋光异构体。如丙酮酸受乳酸脱氢酶催化还原时,只生成 L-乳酸。



(2) 几何异构专一性 这类酶只能作用于顺反异构体中的一种,称为几何异构专一性。例如,天冬氨酸酶只催化反丁烯二酸(延胡索酸)与氨反应,生成 L-天冬氨酸,对顺丁烯二酸(马来酸)则无作用。



(3) 前手性专一性 近年来,人们发现,大多数脱氢酶对尼克酰胺核苷酸辅酶[NAD(P)⁺或NAD(P)H]中的尼克酰胺环第四位碳原子(C-4)上的两个氢表现特殊的立体结构专一性,称为前手性(prochirality)专一性,又称潜手性专一性。虽然尼克酰胺环上的 C-4 既非不对称碳原子,也无顺反异构特征,但脱氢酶却都能专一地识别并作用于该碳原子上两个氢中的一个。以尼克酰胺核苷酸为辅酶的脱氢酶可以因此分为 A、B 两型。



应该指出,酶高度的专一性还表现在某些酶能及时地修正其在催化过程中产生的错误。例如,DNA 聚合酶 I 能识别并除去错配的核苷酸,从而保证了 DNA 复制时核苷酸的错误掺入率在 10^{-8} 以下。与此类似,氨基酰-tRNA 合成酶也能自动地消除其在催化过程中错误活化的氨基酸,从而使蛋白质合成时氨基酸的错误掺入率低于 10^{-4} 。

(三) 温和的反应条件

通常,酶能够在非常温和的反应条件下催化一个化学反应的发生。酶催化的反应几乎都是在常温、常压、中性 pH 等条件下进行的。例如,氨的合成反应,在工业上由氮和氢在高温($700 \sim 900\text{K}$, 约 500°C), 高压($10 \sim 90\text{MPa}$) 下,利用铁和其他微量金属作催化剂才能完成,称为 Fritz Haber 法。而在植物体内,该反应能够在常温(25°C)、常压和中性 pH 下,由复杂的固氮酶系统(nitrogenase system)催化。

(四) 精巧的调节和控制

与普通催化剂不同,酶作为生物催化剂,受到完善、精巧的调控机制的调控,使生物体内的化学反应得以精确、有序地进行,以确保顺利完成各种生命活动。酶的调控方式主要有以下几种:

1. 酶浓度的调控

酶浓度的调控方式主要有两种:一种是诱导或抑制酶的合成;另一种是调控酶的降解。例如, β -半乳糖苷酶的合成,平时处于被阻遏状态。当乳糖或诱导物异丙基- β -D-硫代半乳糖苷存在时,它们便和阻遏物结合,使阻遏物与 DNA 的结合能力下降 1 000 倍。从而解除了阻遏物对酶合成的抑制,因而使 β -半乳糖苷酶的合成大大增加。动物肝脏的精氨酸氧化酶是调控酶降解的实例。当动物饥饿时,由于精氨酸氧化酶的降解受到抑制,从而使精氨酸氧化酶的浓度大大提高。

2. 激素调控

激素调控也与生物合成有关,但调控方式却不相同。乳糖合成酶由催化亚基和修饰亚基组成。催化亚基本身不能合成乳糖,但能够催化半乳糖以共价键方式连接到蛋白质上形成糖蛋白。两种亚基结合后,改变了催化亚基的专一性,因而能够催化半乳糖和葡萄糖反应生成乳糖。妊娠时,修饰亚基开始在乳腺内生成。分娩时,激素含量发生急剧变化,从而使修饰亚基大量生成,并和催化亚基结合,因此,能够大量合成乳糖。

3. 共价修饰调控

共价修饰调控方式是通过酶的催化作用来实现的。在一个酶分子上以共价键方式引入一个基团,从而改变酶的活性。而引入的基团又可以被第三种酶催化而除去。如磷酸化酶的磷酸化和去磷酸化,大肠杆菌谷氨酰胺合成酶的腺苷酸化和去腺苷酸化,都是用这种方式来调控酶的活性的。

4. 激活剂和抑制剂的调控

酶的活性常常受到各种化合物的调控。抑制剂的抑制,从而使酶的活性大大降低。大分子的、蛋白质性质的抑制剂,能够抑制胰脏胰蛋白酶的活性。小分子抑制剂可以是有些反应的产物。如二磷酸甘油酸变位酶催化 1,3-二磷酸甘油酸发生变位作用,生成 2,3-二磷酸甘油酸。产物 2,3-二磷酸甘油酸也是这个酶的抑制剂。当产物堆积时,酶活性受到抑制,进而对该反应起到了调控作用。

5. 前馈和反馈调控

前馈(feedforward)和反馈(feedback)这两个术语都来自电子工程学。它们被借用来表示反应底物和反应产物对反应过程的影响。

反应底物使反应过程加快称为正前馈;反之,则称为负前馈。在糖原合成中,6-磷酸葡萄糖既是反应的底物,又是糖原合成酶的变构激活剂,因此可以促进糖原的合成,这就是一种正前馈调控。乙酰辅酶 A 既是合成丙二酸单酰辅酶 A 的底物,又是催化该反应的乙酰辅酶 A 的变构抑制剂,可以防止丙二酸单酰辅酶 A 的过量合成。这是负前馈的实例。

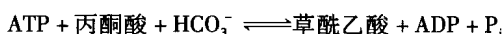
反应产物使反应过程加快称为正反馈;反之,则称为负反馈。磷酸烯醇式丙酮酸通过羧化反应,可以生成草酰乙酸。草酰乙酸既是反应产物,又能对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶产生激活作用,促进草酰乙酸的生成,这是一种正反馈。在葡萄糖的磷酸化反应中,6-磷酸葡萄糖既是反应产物,又是催化此反应的己糖激酶的变构抑制剂,可以防止 6-磷酸葡萄糖的过量生成,这是负反馈的实例。

由于生物体内前馈和反馈调控的巧妙配合,使由酶催化的各种生物化学反应和复杂的代谢过程得以有序、平衡地进行。

6. 金属离子和某些小分子化合物的调控

某些酶常常需要金属离子活化。如有一些酶需要 K^+ 活化, NH_4^+ 往往可以代替 K^+ ,但 Na^+ 不能活化这些酶,有时还有抑制作用。这类酶有 L-高丝氨酸脱氢酶、丙酮酸激酶、天冬氨酸激酶和酵母丙酮酸羧化酶。而另一些酶需要 Na^+ 活化, K^+ 起抑制作用,如肠中的蔗糖酶可受 Na^+ 激活,2 价金属离子如 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 往往也是一些酶表现活力所必需的,它们的调节作用还不很清楚,可能和维持酶分子一定的三级、四级结构有关,有的则和底物的结合和催化反应有关。这些离子的浓度变化都会影响有关的酶活力。

丙酮酸羧化酶催化如下反应:



这一反应是丙酮酸合成葡萄糖途径中的限速步骤。丙酮酸的浓度影响酶的活力,而丙酮酸的浓度是由 NAD^+ 和 $NADH$ 的比值决定的, NAD^+ 和 $NADH$ 的总量在体内差不多是恒定的。如果 $NADH$ 的浓度相对地提高,丙酮酸的浓度就要降低。

7. 产能反应和需能反应的调控

生物体内很多代谢反应受到能量状态的调控。ATP 是能量的共同载体;ADP、AMP 是磷酸受体。ATP、ADP 和 AMP 广泛参与各种能量代谢。它们既能通过质量作用定律而调节能量代谢反应,又是很多重要调节酶的变构效应物。例如,在糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化代谢途径中,ATP 是变构作用的抑制效应物,而 ADP 和 AMP 是变构作用的激活效应物。在正常情况下,ATP、ADP 和 AMP 的含量大体上维持恒定。当生物体内需要大量 ATP 时,ATP 会迅速分解成 ADP 和 P_i 。ADP 和 P_i 是变构作用的激活效应物,它们浓度的增加,又能自动增加电子传递和氧化磷酸化速度,从而加速由 ADP 合成 ATP 的速度。最终是三者的含量仍然在大体上维持恒定。反之,情况也是如此。因此,ATP 与 ADP 和 P_i 对生物体内的能量代谢反应有很大的影响。

Atkinson 建议用能荷(energy charge)来表示能量代谢反应的状态,进而能够表示某些酶活性变化的关系。能荷的定义如下:

$$\text{能荷} = \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$