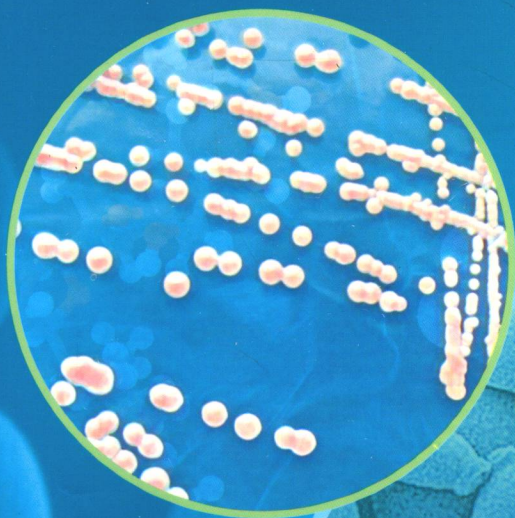


案例版

生物工程系列规划教材

# 酶工程

吴敬 殷幼平 主编



科学出版社

中国生物工程学会会刊

# 酶工程

第 25 卷 第 1 期 2007 年 1 月



中国生物工程学会会刊

Q814  
2013/

P2

阅 览

内 容 简 介

“案例版”生物工程系列规划教材

酶 工 程

吴 敬 殷 幼 平 主 编



科学出版社

北京

www.sciencep.com

北京

科学出版社发行

科学出版社

北京

## 内 容 简 介

本书由江南大学、重庆大学和南京工业大学从事酶工程教学的一线教师集体编写而成，以经典案例分析的方式论述了酶工程技术基础知识，将基础理论与酶工程的工业应用及科学研究相结合。全书共分八章——酶工程基础、酶的发酵生产、酶的提取与分离纯化、酶功能改造、酶与细胞的固定化、非水相酶催化、酶反应器及酶的应用。

本书可作为高等院校生物工程、生物技术、轻工业等相关专业本科生和研究生的教材和参考书，也可供广大教学、相关科研单位和企业的科技人员与工程技术人员学习和参考。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

酶工程/吴敬, 殷幼平主编. —北京: 科学出版社, 2013

ISBN 978-7-03-037003-7

I. ①酶… II. ①吴…②殷… III. ①酶工程 IV. ①Q814

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 045350 号

责任编辑: 席 慧 刘 丹 朱玉昆/责任校对: 朱光兰

责任印制: 阎 磊/封面设计: 迷底书装

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京华正印刷有限公司

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2013年3月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013年3月第一次印刷 印张: 17 3/4

字数: 451 000

定价: 36.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

## 《酶工程》编写委员会

主编：吴 敬 殷幼平

编委：（以姓氏汉语拼音排序）

蔡 恒 何冰芳 李兆丰 倪 晔 吴 斌 吴 敬  
吴剑荣 徐 岩 殷幼平 詹晓北 张荣珍 周小华

# 前 言

本书是科学出版社“案例版”生物工程系列规划教材之一。生物工程是由生物类学科与工程技术类学科交叉融合发展而成，被视为 21 世纪三大前沿学科之一。酶工程是生物工程领域的核心内容。

本书作为提高学生实际操作能力的教材，目标是培养学生掌握生物技术及其产业化的科学原理、工艺技术过程和工程设计等基础理论、基本技能和一定的工程化开发能力，培养能在生物技术与工程领域从事设计、生产、管理和新技术研究、新产品开发的工程技术人才。因此，本书在编写过程中简要论述相关基本原理，尽量避免与其他基础课程重复，将更多的篇幅用于案例分析，力求采用工程学的方法，将工程技术归纳为基本操作单元，以经典案例分析的方式重点论述各单元操作。在案例的组织上，每章有典型案例，章节内部穿插小案例；在案例的编写上，按照“问题的提出→解决思路→达到的目标”的程序进行，并且尽可能多地采用图表、流程图等形式；在案例的选择上，本着生物工程的一般特点，不过分突出某些高校在此专业上的特色，从而使本书有更好的适用性。

本书力求使学生通过案例的学习加深对理论知识的理解和掌握，提高学习兴趣，拓宽知识面，开阔思路，并提高理论知识的应用能力，为学生今后熟练掌握酶工程技术，从事科学研究及其应用于实际工作奠定坚实的基础。

本书分为八章，第一章酶工程基础由江南大学李兆丰和吴敬编写，第二章酶的发酵生产由南京工业大学蔡恒编写，第三章酶的提取与分离纯化由江南大学张荣珍和徐岩编写，第四章酶功能改造由重庆大学殷幼平和周小华编写，第五章酶与细胞的固定化和第六章非水相酶催化由南京工业大学何冰芳和吴斌编写，第七章酶反应器由江南大学吴剑荣和詹晓北编写，第八章酶的应用由江南大学倪晔编写。

感谢上述同仁为本书所付出的宝贵时间和精力。由于编者编写时间和水平所限，本书疏漏和不足之处在所难免，敬请广大读者批评指正。

吴 敬

2012 年 10 月 30 日于江南大学

# 目 录

前言	
第一章 酶工程基础	1
第一节 酶工程概述	1
第二节 酶催化作用机制	4
第三节 酶促反应动力学和抑制作用	10
第四节 酶活力的影响因素	14
第五节 酶的多样性	18
第六节 总结与展望	20
思考题	21
主要参考文献	21
第二章 酶的发酵生产	22
第一节 微生物产酶菌种	22
第二节 产酶培养基及种子培养	30
第三节 酶发酵的工艺控制	33
第四节 酶合成的调节	43
第五节 提高发酵产酶的措施	45
思考题	49
主要参考文献	49
第三章 酶的提取与分离纯化	52
第一节 粗酶液的制备	52
第二节 酶的分离纯化	54
第三节 酶制剂工艺	76
思考题	82
主要参考文献	82
第四章 酶功能改造	84
第一节 酶基因工程改造的基本原理	84
第二节 酶的定点突变	87
第三节 酶分子的定向进化	92
第四节 酶的半理性设计	105
第五节 酶的化学修饰	109
思考题	121
主要参考文献	122
第五章 酶与细胞的固定化	125
第一节 酶的固定化	125





# 第一章 酶工程基础

## 第一节 酶工程概述

### 一、酶与酶工程

酶是由细胞产生的具有催化能力的蛋白质。对于生物体来说，新陈代谢是生命活动最重要的特征，而酶是调节一切代谢反应的物质，酶缺陷或者酶失活，有可能使代谢停止，生命也会因此而结束。因此，研究酶的理化性质及其作用机理，对于阐明生命现象的本质，掌握生命活动的规律，进而改造生命具有十分重要的意义。此外，现代生命科学的发展已经深入到分子水平，在酶分子水平上探讨酶与生命活动、代谢调节、疾病、生长发育等现象的关系将有助于加深人们对生命的理解，探究生命的起源与衍变。

人们真正认识到酶的存在始于19世纪。1833年，法国化学家 Payen 和 Person 将麦芽的水抽提液用乙醇沉淀得到了一种对热不稳定的活性物质，它可促进淀粉水解成可溶性糖，他们把这种物质称为淀粉酶（diastase）制剂。虽然现在已经获知当时得到的只是粗酶，含有很多杂蛋白质，但是由于采用了最简单的抽提、沉淀等提纯方法，他们得到了一种无细胞制剂，并指出了它的催化特性和不稳定性，开始触及酶的一些本质问题，因此有人认为 Payen 和 Person 首先发现了酶。1878年，德国科学家 Kuhne 首先把这类活性物质称为“Enzyme”，Enzyme 来自希腊文，原意为“在酵母中”，中文译为酶。1896年，德国科学家 Buehner 兄弟发现了用石英砂磨碎的酵母细胞及无细胞滤液能像酵母细胞一样将1分子葡萄糖转化成2分子乙醇和2分子二氧化碳，他们把这种能催化反应的蛋白质成分称为酒化酶（zymase）。他们的实验结果表明，酶能以溶解且有活性的状态从破碎细胞中分离出来，并能在体外催化反应。此项发现促进了对酶的分离及其理化性质的研究，也促进了对生命过程中有关酶系统的研究。

20世纪初，酶学研究得到了迅速发展。一方面，人们发现了更多的酶，并注意到某些酶的作用需要有小分子物质（辅酶）参与；另一方面，在物理、化学技术发展的辅助下，Michaelis 和 Menten 总结前人的工作经验，于1913年根据中间产物学说提出了酶促反应动力学原理——米氏学说。这一学说的提出，对酶反应机制的研究是一个重要突破。1926年，美国化学家 Sumner 从刀豆中得到脲酶结晶（这是第一个酶结晶），并证明这种结晶可以催化尿素水解产生二氧化碳和氨，并通过化学实验得出酶本身就是一种蛋白质的结论，但直到 Northrop 和 Kunitz 获得了胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶（糜蛋白酶）、胰蛋白酶结晶，并用相应方法证明其化学本质都是蛋白质（1930~1936），这个观点才被普遍接受。20世纪五六十年代，通过一系列观察发现酶具有一定水平的柔性，因而 Koshland 于1958年提出了诱导契

合学说,以解释酶的催化机制和专一性,同时也发现某些酶的催化活性的改变与生理条件的变化有关。1961年,Monod等提出了变构模型,定量解释了有些酶的活性可以通过结合小分子(效应物)进行调节,从而为认识细胞中许多酶反应的调控机制提供了基础。1969年,首次报道由氨基酸单体化学合成牛胰核糖核酸酶,虽然其纯度和活性较低,但是定性证明了酶与非生物催化剂之间具有相似的催化特性。

除了“经典”的蛋白酶以外,又相继发现一些其他的生物分子也具有催化活性。1982年,美国的Cech小组发现,四膜虫的rRNA(核糖体核糖核酸)前体能在完全没有蛋白质的情况下进行自我加工,催化得到成熟的rRNA产物。也就是说,这个RNA分子本身就具有催化活性。这对酶的化学本质是蛋白质的传统概念是个严重挑战,引出了酶并不一定是蛋白质的问题。后来,人们陆续发现更多的具有生物催化活性的RNA分子,统称为核酶(ribozyme)。1986年,Schultz和Learner两个小组同时报道了用事先设计好的过渡态类似物作半抗原,按标准单克隆抗体制备法获得了具有催化活性的抗体,即抗体酶(abzyme)。这一重要突破为酶的结构功能的探索和抗体与酶的联合应用提出了新的研究思路。

回顾酶的研究历程可知,对酶的研究一直是沿着理论与应用两个方向开展的。理论方面包括酶理化性质及催化性质的研究,其任务是要从分子水平更深入地揭示酶的结构和功能的关系、酶的催化机制与调节机制、酶和生命活动的关系,在基因水平上进行对酶的理性设计与改造。应用研究促进了酶工程概念的形成,其主要目标是通过将基因工程、分子生物学等技术成果应用于酶的生产改造以提高酶的产量及其催化活性,同时不断开发新型的固定化酶技术与酶反应器以提高酶的使用效率,最终形成高效、经济的酶工程产业。1808年,罗门等利用胰酶制皮革;1917年,法国人用枯草杆菌产生的淀粉酶作为纺织工业上的退浆剂;1949年,日本采用深层培养法生产 $\alpha$ -淀粉酶获得成功,使酶制剂的生产应用实现工业化;1959年,葡萄糖淀粉酶催化淀粉生产葡萄糖新工艺的研发成功,彻底废除了原来葡萄糖生产中需要高温高压的酸水解工艺,并使淀粉葡萄糖转化率从80%提高至100%,这项新工艺的成功大大促进了酶在工业中的应用;1966年,日本千铎一郎成功地进行了氨基酰化酶的固定化,并于1969年将其应用于工业上连续化拆分DL-氨基酸。20世纪70年代大规模开展了固定化细胞、辅酶共固定、增殖细胞固定、动植物细胞固定等研究,同时根据酶反应动力学理论,运用化学工程成果建立了多种类型的酶反应器,在这些基础上酶工程的发展日臻成熟。

## 二、酶工程简介

生物工程又称生物技术或生物工艺学,是20世纪70年代发展起来的一门综合性技术学科。它整合生物学、化学和工程学的技术,改造物种,分离改造生物体中的某些组分(如酶、蛋白质、核酸、细胞器),进而利用生物分子的某些特殊机能(如酶的催化功能、抗体的免疫功能)为工农业生产及医疗卫生服务。通常,生物工程主要分为发酵工程(微生物工程)、酶工程、基因工程和细胞工程4个分科,它们相互依存、相互促进。其中,酶工程是生物工程的重要组成部分,与其他三大工程尤其是发酵工程关系密切。

酶工程是随着酶学研究迅速发展,特别是酶的应用推广使酶学和工程学相互渗透结合而形成的一门新的技术科学,是酶学、微生物学的基本原理与化学工程有机结合而产生的边缘科学技术。它是在一定生物反应装置中利用酶的催化性质,将原料转化或加工成相应产品的

技术,是生物工程的重要组成部分,主要包括以下9个方面。

### (一) 酶的生产

酶制剂的来源有微生物、动物和植物,其中以微生物为主,一般选用优良的产酶菌株,通过培养发酵来生产酶。为了提高酶的产量,可以通过选育优良菌株、构建基因工程菌、优化发酵条件来实现。工业生产需要特殊性能的新型酶,如耐高温 $\alpha$ -淀粉酶、耐碱性蛋白酶和脂肪酶等,因此,需要筛选或者构建能生产特殊性能新型酶的菌株。

### (二) 酶的分离纯化

酶的分离纯化技术是当前生物技术“后处理工艺”的核心。采用各种分离纯化技术,可从微生物细胞及其发酵液或动、植物组织提取液及其细胞培养液中得到高活性的不同纯度的酶制剂。为了使酶制剂更广泛地应用于各个领域,必须提高酶制剂的活性、纯度和收率,需要研究开发新的分离纯化技术。

### (三) 酶和细胞固定化

采用各种固定化方法可对酶进行固定化,制备固定化酶。对固定化酶的酶学性质及应用条件加以研究可以提高酶的稳定性、重复使用酶制剂、扩大酶制剂的应用范围,全面提高酶的工业价值。固定化细胞是在固定化酶的基础上发展起来的一项技术,二者既有联系又有区别。用各种固定化方法对微生物细胞、动物细胞和植物细胞进行固定化,制成固定化细胞。研究固定化细胞的酶学性质,扩展固定化细胞的应用范围,是当今酶工程的一个热门课题。

### (四) 酶修饰及分子改造

为了克服酶自身性质上的一些不足,可采用各种修饰方法对酶的结构进行改造,以改善天然酶的性质,如高稳定性、无抗原性、蛋白酶水解抗性等,甚至创造出新的催化活性,扩大酶的应用范围,从而提高酶的应用价值。

酶修饰及分子改造可以从以下两个方面进行。

(1) 用蛋白质工程技术,如定向进化、定点突变等对酶分子的结构进行改造,以期获得一级结构和空间结构较为合理的具有优良特性的突变酶或新酶。例如,在洗衣粉中添加枯草芽孢杆菌蛋白酶可加强其去污能力,但这种酶在漂白剂的作用下易失去活性,利用蛋白质工程技术替换酶蛋白分子的某些氨基酸,可大大提高酶的抗氧化能力,从而使其可与漂白剂同时使用。

(2) 用化学修饰法对酶分子中侧链基团进行化学修饰,以改变酶的理化性质,最后达到改变酶催化性质的目的。这类酶修饰在酶学基础研究和医药研发上特别有用。

### (五) 非水相催化

在非水相中,酶分子受到非水相介质的影响,其催化特性与在水相中有着较大的不同。目前,研究最多的非水相介质是有机溶剂。在有机介质中,酶能够基本保持其整体结构和活性中心的空间构象,因此能够最大限度地发挥其催化功能。酶的非水相催化还包括气相介质中的酶催化、超临界介质中的酶催化、离子液介质中的酶催化等。

## (六) 酶传感器

酶传感器又称酶电极。酶传感器是一种生物传感器,它是由感受器(如固定化酶)和换能器(如离子选择性电极)所组成的一种分析装置,可用于测定混合溶液中某种物质的浓度。

## (七) 酶反应器

酶反应器是根据酶的催化特性而设计的反应设备。其设计目标是提高生产效率、降低成本、减少耗能与污染,以获得最佳的经济效益和社会效益。酶反应器的种类有搅拌罐型反应器、固定床反应器、流化床反应器、膜反应器、鼓泡式反应器等。

## (八) 抗体酶、人工酶和模拟酶

抗体酶是一类具有催化活性的抗体,是抗体的高度专一性与酶的高效催化能力巧妙结合的产物。人工酶是指人工合成的具有催化活性的多肽或蛋白质。据1977年Dhar等报道,人工合成的Glu-Phe-Ala-Glu-Glu-Ala-Ser-Phe八肽具有溶菌酶的活性,其活性为天然溶菌酶的50%。近年来,合成了一些具有催化功能,但相比酶结构简单得多的非蛋白质分子,这些分子可以模拟酶对底物的结合和催化过程,既具备酶的高效催化性,又能够克服酶的不稳定性,这种物质称为模拟酶。

## (九) 酶技术的应用

研究与开发酶制剂在食品、医药、发酵、纺织、制革、化学分析、氨基酸合成、有机酸合成、半合成抗生素合成、能源开发及环境工程等方面的应用。

# 第二节 酶催化作用机制

## 一、酶的催化特性

### (一) 酶具有非常高的催化效率

酶的催化效率是指在最适条件下,1分子酶在单位时间内所能催化的底物分子数,以分子活性来表示。分子活性高表示它能催化的反应进行得快,大多数酶的分子活性约为每分钟1000,个别可达百万以上。在温和条件下,酶通常比无机催化剂的催化效率高得多。但酶不能改变化学反应的平衡点,酶的作用是缩短了到达平衡所需的时间,但平衡常数不变。

### (二) 酶的高度专一性

酶的专一性(也称特异性)是指一种酶只能催化特定的底物进行特定的反应。催化的高度专一性是酶最重要的特性,是其与化学催化剂的最主要区别之一,也是酶反应工程优越于一般的化学反应工程的原因所在。酶的专一性是生命活动必需的,在复杂的酶体系中,若没有催化反应的专一性,则生物体内的新陈代谢就会发生紊乱,最终导致生物体的凋亡。例如,氨酰-tRNA合成酶的高度专一性保证了生物系统为了维持其遗传稳定性所需蛋白质合

成的高度精确性。不同的酶专一性往往不同,一般来说,酶的专一性有3个方面。

### 1. 底物专一性

酶只能催化某一种特定底物或只能与某一类特定底物发生反应,按严格程度的不同分为绝对专一性和相对专一性。

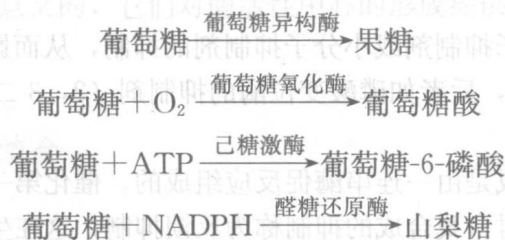
绝对专一性是指一种酶只能催化一种物质进行一种反应。例如,脲酶只能催化尿素分解,而对尿素的氯或甲基取代物  $\text{H}_2\text{NCONHCl}$  和  $\text{H}_2\text{NCONHCH}_3$  则不起作用。琥珀酸脱氢酶仅催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸(反丁烯二酸),而对其它同系物(丙二酸、戊二酸)不仅不起作用,反被抑制。

相对专一性是指一种酶能催化一类结构相似的物质进行某种相同类型的反应。其中有些酶只作用于一定的键而对键两侧的基团无严格要求,称为键专一性,如酯酶催化酯键水解,

对  $\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}'$  中的 R 与 R' 基团无严格要求,既能催化甘油酯类、简单酯类,也能催化丙酰、丁酰胆碱或乙酰胆碱的水解,只是不同的酯类水解速度不同。而有些酶除了要求一定的化学键外,对键两侧的基团也有不同程度的要求,这种特异性称为基团专一性。以各类蛋白酶为例,胰蛋白酶水解的键必须是碱性氨基酸的羧基形成的肽键、酯键或酰胺键;胰凝乳蛋白酶则要求被水解的键有芳香氨基酸或其他疏水氨基酸的羧基参与;弹性蛋白酶能专一水解丙氨酸、甘氨酸及丝氨酸等短脂肪链氨基酸的羧基形成的肽键;胃蛋白酶只作用于芳香氨基酸的氨基和酸性氨基酸及蛋氨酸羧基形成的肽键。

### 2. 反应专一性

指某一种酶只催化某一类反应。例如,同样以葡萄糖为底物,不同酶催化不同的反应,得到不同的产物,如下所示:



### 3. 立体专一性

立体专一性主要是考虑底物空间构象的专一性。酶的立体专一性相当普遍,可以说几乎所有酶均具有立体专一性。立体专一性又可分为光学异构专一性和几何异构专一性。

光学异构专一性又称 DL 立体异构专一性。旋光物质有 D 型和 L 型之分。凡是只能催化两个对映体中的一个,而不能催化另一个的特异性,称为 DL 立体异构专一性。例如,精氨酸酶只水解 L-精氨酸,不能水解 D-精氨酸。

几何异构专一性又称顺反立体特异性。含双键物质有顺反两种异构体,如顺丁烯二酸(马来酸)和反丁烯二酸(延胡索酸),延胡索酸水合酶只能催化反丁烯二酸水合生成苹果酸,或催化其逆反应,而对顺丁烯二酸及其水合物均无作用。

## (三) 酶活性的可调节性

酶作为生物催化剂,与化学催化剂相比,还有一个特点是其活性的可调节性。主要有下

列 7 种方式。

### 1. 酶浓度的调节

酶浓度的调节主要有两种方式：一种是诱导或阻遏酶的合成；一种是调节酶的降解。例如，当环境中没有乳糖时， $\beta$ -半乳糖苷酶的合成处于被阻遏状态，当乳糖存在时，去除了阻遏作用，酶受乳糖的诱导而合成。

### 2. 激素调节

激素调节与生物合成有关。例如，乳糖合成酶有两个亚基，催化亚基和修饰亚基。催化亚基本身不能合成乳糖，但可以催化半乳糖以共价键的方式连接到蛋白质上形成糖蛋白。修饰亚基和催化亚基结合后，改变了催化亚基的专一性，可以催化半乳糖和葡萄糖反应生成乳糖。修饰亚基的水平是由激素控制的。妊娠阶段，在乳腺生成和分娩的过程中激素水平急剧变化，导致修饰亚基大量合成，并和催化亚基结合，催化生成乳糖补充乳汁。

### 3. 共价修饰调节

在一种酶分子上，共价地引入一个基团从而改变它的活性，引入的基团又可以被其他酶催化除去，从而恢复原先的活性。例如，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属于共价修饰调节。

### 4. 限制性蛋白酶水解作用调节

限制性蛋白酶水解是一种高特异性的共价修饰调节系统。细胞内合成的新生肽大都以无活性的前体形式存在，只有生理需要时，才通过限制性水解作用使前体转变为具有生物活性的蛋白质或酶，从而启动和激活各种生理功能，如酶原激活、血液凝固、补体激活等。除了参与酶活性调控外，限制性蛋白酶水解作用还起着切除、修饰、加工多肽链的作用，因而具有重要的生物学意义。

### 5. 抑制剂的调节

酶的活性会受到大分子抑制剂或小分子抑制剂的抑制，从而影响其活力。前者如胰脏的胰蛋白酶抑制剂（抑肽酶），后者如磷酸变位酶的抑制剂（2, 3-二磷酸甘油酸）。

### 6. 反馈调节

许多小分子物质的合成是由一连串酶促反应组成的。催化第一步反应的酶，往往可以被其终端产物所抑制，这种对自我合成的抑制称为反馈抑制，这在生物合成中是较为常见的现象。例如，异亮氨酸可抑制其合成代谢通路中的第一个酶——苏氨酸脱氨酶的催化活性，当异亮氨酸的浓度降低到一定水平时，抑制作用解除，合成反应又重新开始。

### 7. 金属离子和其他小分子化合物的调节

很多金属离子对酶的活性均有一定的激活或者抑制效应。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，这一类酶有 L-高丝氨酸脱氨酶、丙酮酸激酶、天冬氨酸激酶和酵母丙酮酸羧化酶。另一些酶需要  $Na^+$  活化， $K^+$  起抑制作用，如肠中的蔗糖酶可被  $Na^+$  激活。二价金属离子（如  $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  等）往往也是一些酶具有活性的必需离子。小分子化合物同样也会影响到某些酶的催化活性。

## （四）酶促反应条件温和

酶促反应一般要求在常温、常压、接近中性酸碱度等温和的条件下进行。酶是生物大分子，对环境的变化非常敏感，高温、强酸、强碱、重金属等都可引起蛋白质的变性，使酶丧

失活性。同时，酶也常因温度、pH 的轻微改变而使其活性发生改变。

### (五) 酶的催化活性与辅酶、辅基和金属离子有关

有些酶是复合蛋白质，其中的小分子物质辅酶、辅基及金属离子与酶的催化活性密切相关。若将它们除去，酶就会失去活性。

## 二、酶的功能部位

酶是生物大分子，其催化作用有赖于酶分子的一级结构及空间结构的完整。酶分子的变性或亚基解聚均可导致酶活性的丧失。酶蛋白上只有少数氨基酸残基参与酶对底物的结合和催化，这些氨基酸残基虽然在一级结构上并不紧密相邻，可能相距很远，甚至可能在不同的肽链上，但由于肽链的折叠与盘绕使它们在空间结构上彼此靠近，形成具有一定空间结构的呈裂缝状的功能区域，称为酶的活性中心，又称活性部位。从功能上可以将活性中心分为两个部位，一是与底物结合的结合部位，决定酶对底物的专一性；二是催化底物发生键的断裂及新键形成的催化部位，决定酶促反应的类型。胰凝乳蛋白酶活性中心由 Ile16、His57、Asp102、Asp194 和 Ser195 构成。以酶原形式存在时，它们分散在一条肽链的不同区域，但酶原经水解激活后，形成 A、B、C 三条肽链，前三个残基在 B 链，后两个在 C 链，依靠肽链间的各种非共价作用力及二硫键，三条肽链经过折叠，使这些一级结构互相远离的基团相互靠近形成活性中心。

活性中心的基团都是必需基团，但必需基团还包括那些在活性中心以外的、维持酶的空间构象所必需的基团。如果酶的某些基团经化学修饰，如氧化、还原、酰化、烷化后使酶的活性丧失，则这些基团就称为酶的必需基团。酶分子其他部分的作用对于酶催化来说，可能是次要的，但绝不是毫无意义的，它们对酶活性中心的形成提供了结构基础。

## 三、酶的作用机制

### (一) 酶与底物分子的结合

#### 1. 中间产物学说

酶如何使反应的活化能降低而体现出极高的催化效率，比较圆满的解释是中间产物学说。该学说认为，酶在催化底物发生变化之前，首先与底物结合成一个不稳定的中间产物（也称为中间络合物）；由于底物与酶的结合导致底物分子内的某些化学键发生不同程度的变化，呈不稳定状态，也就是活化状态，使反应的活化能降低。然后，经过原子间的重新键合，中间产物便转变为酶与产物。这一过程，可用下面的反应式说明



式中，S 表示底物；E 表示酶；ES 表示中间产物；P 表示产物。

底物和酶结合后为反应创设了一条完全不同的新途径，其过渡态能量要比没有酶催化的条件下低很多。图 1-1 表明了酶促反应与非酶促反应所需活化能大小的不同。

#### 2. “锁钥”学说

有学者认为酶和底物结合时，底物分子或其部分像钥匙那样，专一地楔入到酶的活性中心，底物的结构必须和酶活性中心的结构相吻合，也就是说底物分子进行化学反应的部位与

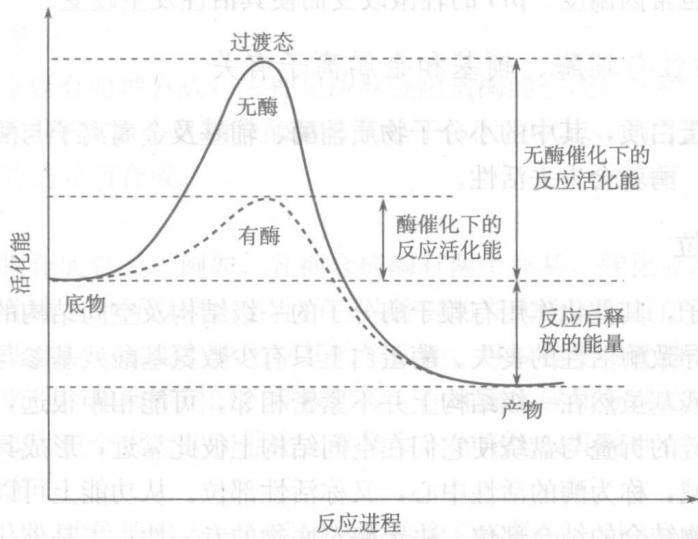


图 1-1 酶促反应与非酶促反应的活化能

酶分子上活性中心的必需基团间具有严格互补的关系，二者才能紧密结合形成中间络合物。这就是 1890 年由 Fischer 提出的“锁钥”学说 (lock and key theory) (图 1-2A)。

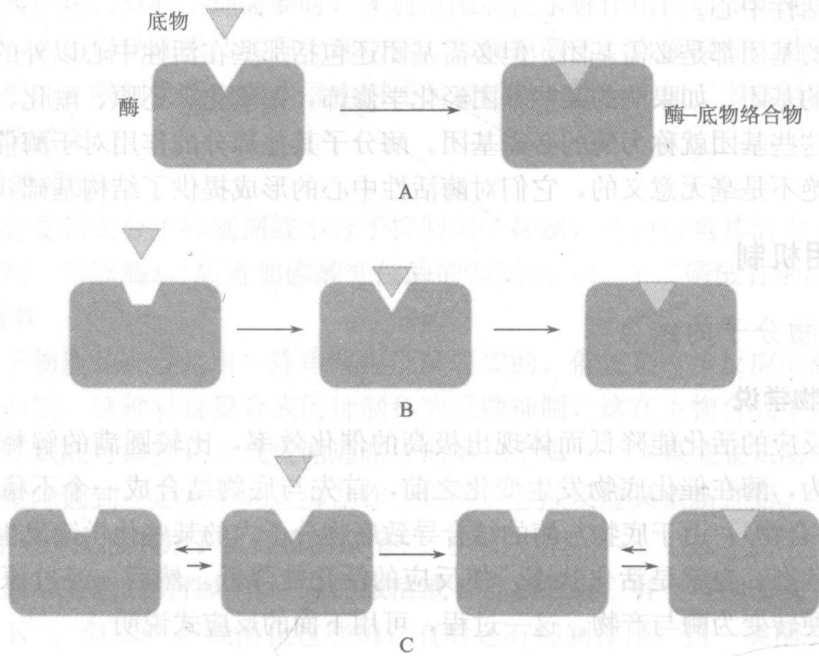


图 1-2 三种酶催化机制模式图

A. “锁钥”模式；B. 诱导契合模式；C. 群体移动模式

从图 1-2A 可看出，酶和底物的紧密结合决定了酶的立体专一性。“锁钥”学说虽然说明了酶与底物结合成中间产物的可能性及酶对底物的专一性，但有些问题是这种理论所不能解释的。例如，对于可逆反应，酶常常能催化正逆两个方向反应，该学说很难解释酶活性中心的结构与底物和产物的结构都非常吻合，因此其把酶的结构看成固定不变是不切实



实际的。

### 3. 诱导契合学说

研究证明,当底物与酶相遇时,可诱导酶的构象发生相应的变化,使活性中心的基团达到正确的排列和定向,从而使酶和底物契合而形成中间络合物并引起底物发生反应,这就是诱导契合学说(图 1-2B 和图 1-3)。诱导是双向的,既有底物对酶的诱导,又有酶对底物的诱导。

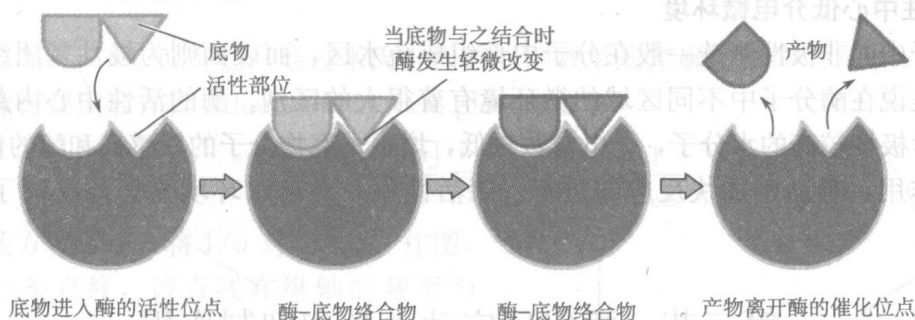


图 1-3 酶的诱导契合模式

### 4. 群体移动模式

这一模式是近年来提出的一种新的酶与底物的结合模式,其试图解释在一些反应中所发现的底物结合前后,酶构象有较大变化的现象(图 1-2C),而这是用诱导契合模式无法解释的。其基于的假设是,酶在溶液中同时存在不同构象,一种构象(构象 A)为适合底物结合的构象,而另一种(构象 B)则不适合,这两种构象之间保持着动态平衡。在没有底物存在的情况下,构象 B 占主导地位;当加入底物后,随着底物不断与构象 A 结合,溶液中构象 A 含量下降,两种构象之间的平衡被打破,导致构象 B 不断地转化为构象 A。

## (二) 与酶的高催化效率有关的因素

### 1. 邻近与定向效应

酶受底物诱导发生构象变化,使底物与酶的活性中心契合。对于双分子反应来说,两个底物若能集中在酶活性中心,彼此靠近并有一定的取向,就大大提高了酶活性部位上底物的有效浓度,使分子间的反应变成了近似于分子内的反应,从而增加了反应速率。

### 2. 底物分子敏感键扭曲变形

酶活性中心的结构有一种可适应性,当专一性底物与活性中心结合时,可以诱导酶分子构象的变化,使反应所需要的酶的结合基团与催化基团正确地排列和定位,并使催化基团能够临近待断裂的化学键。与此同时,变化的酶分子又使底物分子的敏感键产生“张力”,甚至“变形”,从而促进酶-底物络合物进入过渡态,降低了反应活化能,加速了酶促反应。

### 3. 酸碱催化

酸碱催化作用一般是指构成酶活性中心的极性基团,在底物的变化中起质子供体或受体的作用。例如,羰基的水化,羧酸酯或磷酸酯的水解,各种分子的重排及许多取代反应都存在此种作用。可以提供质子或接受质子而起酸碱催化作用的功能基团有:谷氨酸、天冬氨酸侧链上的羧基,丝氨酸、酪氨酸中的羟基,半胱氨酸中的巯基,赖氨酸侧链上的氨基,精氨