



生命科学辅导丛书 **之**
名·师·点·拨·系·列

酶工程

郭 勇 编著

名师点拨系列



科学出版社
www.sciencep.com

生命科学辅导丛书之名师点拨系列

酶 工 程

郭 勇 编著

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是以郭勇编著、科学出版社出版的普通高等教育“十一五”国家级规划教材《酶工程》(第三版)为蓝本,以教学大纲为基础,吸纳学科最新进展,结合笔者长期的教学实践经验,以创新的框架、创新的表达方式编写而成的新型教学辅导书。

本书重点阐述酶工程的核心概念和知识要点,以帮助读者了解并掌握酶的生产与应用的基本概念、基本理论、基本技术及其最新进展。每章均提供一套精选的试题,并配以参考答案,以利于读者进行复习思考,进一步掌握和巩固所学知识。

本书共10章,分别为绪论,微生物发酵产酶,动植物细胞培养产酶,酶的提取与分离纯化,酶分子修饰,酶、细胞、原生质体固定化,酶非水相催化,酶定向进化,酶反应器,酶的应用。每章按照重点提示、核心概念、知识要点、试题精选、参考答案的框架编写,书末附有模拟试题。

本书可为高等院校生物工程、生物化工、生物技术、生物制药、发酵工程、酶工程、生物科学、食品科学与工程等专业的教师和学生进行酶工程的教学提供指导,也可供有关科学工作者和工程技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

酶工程/郭勇编著. —北京:科学出版社,2009

(生命科学辅导丛书之名师点拨系列)

ISBN 978-7-03-024439-0

I. 酶… II. 郭… III. 酶-生物工程-高等学校-教学参考资料
IV. Q814

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第058722号

责任编辑:王国栋 周 辉/责任校对:陈玉凤

责任印制:张克忠/封面设计:耕者设计工作室

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>

北京智力达印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年4月第一版 开本:B5(720×1000)

2009年4月第一次印刷 印张:17 1/4

印数:1—4 000 字数:336 000

定价:28.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新伟〉)

前 言

20 世纪 70 年代以来，酶工程作为生物工程的重要组成部分与生物工程的其他学科一起飞速发展，在理论研究和应用研究方面均取得了丰硕成果，逐步形成了酶工程学科。三十多年来不断得到充实与发展，在许多院校都成长为主干学科之一。

我国高等院校开设酶工程课程已经有二十多年的历史，1986 年华南理工大学在国内率先为大学本科学子开设酶工程课程，由郭勇负责编写出国内第一本“酶工程”讲义；1990 年 5 月高等学校发酵工程专业教材委员会全体委员会议决定，为了适应学科发展的要求，全国统编“酶工程”新教材，供有关专业的研究生和本科高年级学生作教材实用，由郭勇担任主编，伦世仪担任主审；1994 年国内第一部《酶工程》教材由中国轻工业出版社出版，在国内多所院校使用，10 年左右时间印刷发行 3 万多册；2004 年科学出版社出版的《酶工程》（第二版）是在 1994 年出版的《酶工程》的基础上，根据酶工程的最新进展和发展趋势，结合笔者的教学实践和科研成果重新编写而成，5 年来已经印刷发行 4 万多册，在全国众多院校中使用，取得良好的教学效果；2009 年普通高等教育“十一五”国家级规划教材《酶工程》（第三版）由科学出版社出版；在此期间，国内也出版了其他几本“酶工程”教材，学习酶工程课程的人数不断增加。

为了便于广大读者更好地掌握酶工程的基本概念、基本理论、基本技术和最新进展，特编写本书。本书是以郭勇编著、科学出版社出版的《酶工程》（第三版）为蓝本，以教学大纲为基础，吸纳学科最新进展，结合笔者长期的教学实践经验，以创新的框架、创新的表达方式编写而成的与时俱进的新型教学辅导书，期望本书的出版能为进行酶工程教学的教师和学生提供指导和帮助。

编写酶工程学习指导书，在基本框架和表达方式等方面都是一项新的尝试，能否满足读者的需要，达到预期的目的，还需要经过实践的检验。由于初次编写酶工程学习指导书，没有现成的模式可供参考，加上笔者水平所限，不当之处诚请专家、读者提出宝贵意见和建议。

郭 勇

2009 年 1 月

目 录

前言

第一章 绪论	1
【核心概念】	1
【知识要点】	1
一、酶的基本概念	1
二、酶工程的概念和主要内容	2
三、酶的催化特性	4
四、影响酶催化作用的主要因素	6
五、酶的分类与命名	11
六、酶的活力测定	17
七、酶的生产方法	19
【试题精选】	21
【参考答案】	23
第二章 微生物发酵产酶	25
【核心概念】	25
【知识要点】	25
一、酶发酵生产的概念和主要方式	25
二、酶生物合成的基本过程	27
三、微生物细胞中酶生物合成的调节	30
四、酶生物合成的模式	34
五、培养基	37
六、酶发酵工艺条件的控制	39
七、提高酶产率的措施	42
八、酶发酵动力学	45
九、固定化微生物细胞发酵产酶	50
十、固定化微生物原生质体发酵产酶	54
【试题精选】	55
【参考答案】	57
第三章 动植物细胞培养产酶	61
【核心概念】	61
【知识要点】	61

一、动植物细胞培养产酶的基本知识	61
二、动植物细胞中酶生物合成的调节	62
三、植物细胞的特性与培养特点	66
四、植物细胞培养工艺条件及其控制	68
五、植物细胞培养产酶的工艺过程	70
六、动物细胞的特性及培养特点	70
七、动物细胞培养的方式	71
八、动物细胞培养的工艺条件及其控制	73
九、动物细胞培养产酶的工艺过程	74
【试题精选】	76
【参考答案】	77
第四章 酶的提取与分离纯化	82
【核心概念】	82
【知识要点】	83
一、细胞破碎	83
二、提取	86
三、沉淀分离	87
四、离心分离	90
五、过滤与膜分离	92
六、层析分离	95
七、电泳分离	105
八、萃取分离	111
九、结晶	115
【试题精选】	116
【参考答案】	117
第五章 酶分子修饰	121
【核心概念】	121
【知识要点】	122
一、酶分子修饰的意义和作用	122
二、金属离子置换修饰	123
三、大分子结合修饰	124
四、侧链基团修饰	127
五、肽链有限水解修饰	130
六、核苷酸链剪切修饰	131
七、氨基酸置换修饰	132
八、核苷酸置换修饰	134

九、物理修饰·····	135
十、酶分子修饰的应用·····	136
【试题精选】·····	140
【参考答案】·····	141
第六章 酶、细胞、原生质体固定化·····	144
【核心概念】·····	144
【知识要点】·····	144
一、固定化技术的作用与意义·····	144
二、固定化方法·····	146
三、固定化酶的特性·····	150
四、固定化酶的应用·····	152
五、固定化微生物细胞的特点与应用·····	156
六、固定化原生质体的制备、特点与应用·····	158
【试题精选】·····	160
【参考答案】·····	161
第七章 酶非水相催化·····	166
【核心概念】·····	166
【知识要点】·····	166
一、酶非水相催化的概念与意义·····	166
二、酶非水相催化的主要内容和特点·····	167
三、水对有机介质中酶催化反应的影响·····	169
四、有机溶剂对有机介质中酶催化反应的影响·····	171
五、酶在有机介质中的底物特异性与选择性·····	173
六、有机介质中酶催化反应的影响因素及其控制·····	175
七、酶非水相催化的应用·····	177
【试题精选】·····	184
【参考答案】·····	185
第八章 酶定向进化·····	190
【核心概念】·····	190
【知识要点】·····	191
一、定向进化的概念和主要内容·····	191
二、酶定向进化的概念和基本过程·····	191
三、酶定向进化的特点·····	192
四、酶基因的体外随机突变方法·····	193
五、突变基因文库的构建·····	198
六、酶突变基因的定向选择·····	200

七、高通量筛选技术·····	201
八、酶定向进化技术的应用·····	206
【试题精选】·····	209
【参考答案】·····	210
第九章 酶反应器 ·····	214
【核心概念】·····	214
【知识要点】·····	214
一、酶反应器的类型和特点·····	214
二、酶反应器的选择·····	220
三、酶反应器的设计·····	223
四、酶反应器的操作条件及其调节控制·····	226
五、酶反应器操作的注意事项·····	229
【试题精选】·····	230
【参考答案】·····	232
第十章 酶的应用 ·····	235
【核心概念】·····	235
【知识要点】·····	235
一、酶应用的基本概念和理论基础·····	235
二、酶在医药领域的应用·····	236
三、酶在食品领域的应用·····	244
四、酶在食品添加剂生产方面的应用·····	250
五、酶在轻工化工领域的应用·····	252
六、酶在环保领域的应用·····	256
七、酶在生物技术领域的应用·····	258
【试题精选】·····	261
【参考答案】·····	262
附录 模拟试题 ·····	265

第一章 绪 论

重点提示：酶的基本概念（掌握），酶工程的主要内容（掌握），酶的催化特性（掌握），影响酶作用的主要因素（掌握），酶的分类和命名（熟悉），酶的活力测定（熟悉），酶的生产方法（熟悉）。

【核心概念】

(1) 酶 (enzyme)：酶是具有生物催化功能的生物大分子，按照分子中起催化作用的主要组分的不同，酶可以分为蛋白类酶和核酸类酶两大类。

(2) 酶工程 (enzyme engineering)：酶的生产与应用的技术过程。

(3) 酶的生产 (enzyme production)：通过各种方法获得人们所需的酶的技术过程。

(4) 酶的改性 (enzyme improving)：通过各种方法改进酶的催化特性的技术过程。

(5) 酶的应用 (enzyme application)：通过酶的催化作用获得人们所需的物质或者除去不良物质、获取所需信息的技术过程。

(6) 蛋白类酶 (proteozyme, protein enzyme, P 酶)：分子中起催化作用的主要组分为蛋白质的一类酶。

(7) 核酸类酶 (ribozyme, RNA enzyme, R 酶)：分子中起催化作用的主要组分为核糖核酸的一类酶。

(8) 酶的专一性 (enzyme specificity)：酶的专一性又称为酶的特异性，是指在一定的条件下，一种酶只能催化一种或一类结构相似的底物进行某种类型反应的特性。

(9) 酶的转换数 (enzyme turnover number)：酶的转换数 (K_{cat}) 又称为摩尔催化活性 (molar catalytic activity)，是指每个酶分子每分钟催化底物转化为产物的分子数，也即是每摩尔酶每分钟催化底物转化为产物的摩尔数。

【知识要点】

一、酶的基本概念

学习酶工程首先要运用历史唯物主义的观点，结合酶的发展历史和最新研究进展，掌握酶的基本概念。

人们对酶的认识经历了一个不断发展、逐步深入的过程，可以分为四个

阶段。

(1) 我们的祖先在几千年前就已经自发地利用酶的催化作用来制造食品和治疗疾病。我们的先人们不但创造了“酶”这个汉字，而且给出了“酶者，酒母也”这个比较确切的定义。

(2) 1833年，佩恩 (Payen) 和帕索兹 (Persoz) 从麦芽的水抽提物中用酒精沉淀得到一种可使淀粉水解生成可溶性糖的物质，称之为淀粉酶 (diastase)。在此后近一百年中，人们认识到“酶是生物体产生的具有生物催化功能的物质”，但是尚未搞清楚究竟是哪一类物质。

(3) 1926年，萨姆纳 (Sumner) 首次从刀豆提取液中分离纯化得到脲酶结晶，并证明它具有蛋白质的性质，后来对一系列酶的研究，都证实酶的化学本质是蛋白质。在此后的50多年中，人们普遍接受“酶是具有生物催化功能的蛋白质”这一概念。

(4) 1982年，切克 (Thomas Cech) 等人首次发现 ribozyme (核酸类酶) 以来，已经发现的 ribozyme 越来越多。现在知道的 ribozyme 具有自我剪接、自我剪切和催化分子间反应等多种功能；作用底物有 RNA、DNA、多糖、多肽、氨基酸酯等；研究表明，ribozyme 具有完整的空间结构和活性中心，有其独特的催化机制，具有很高的底物专一性，其反应动力学亦符合米氏方程的规律。可见，ribozyme 具有生物催化剂的所有特性，是一类由 RNA 组成的酶，由此引出酶是具有生物催化功能的生物大分子的新概念，按照酶分子中起催化作用的主要组分的不同，酶可以分为蛋白类酶和核酸类酶两大类。

综上所述，在不同的历史阶段，酶的概念有所不同。在当代，酶的概念应该是：酶是具有生物催化功能的生物大分子，按照分子中起催化作用的主要组分的不同，可以分为蛋白类酶和核酸类酶两大类。

在有些书中，酶的概念有所不同，读者只要按照历史唯物主义的观点，就可以辨别其确切与否。

二、酶工程的概念和主要内容

随着科学技术的发展，酶工程的概念和主要内容不断充实和完善，学习的时候要结合酶工程的发展概况，运用发展的观点加以理解和掌握。

(1) 从19世纪末期到20世纪中期，属酶工程的起步阶段，其内容只是包括酶的提取与分离，酶的应用两个方面。

1894年，日本的高峰让吉首先从米曲霉中制备得到高峰淀粉酶 (Taka-diastase)，用作消化剂，开创了近代酶的生产 and 应用的先例；1908年，德国的罗姆 (Rohm) 从动物胰脏中制得胰酶，用于皮革的软化；1908年，法国的波伊定 (Boidin) 制备得到细菌淀粉酶，用于纺织品的褪浆；1911年，华勒斯坦 (Wallerstein) 从木瓜中获得木瓜蛋白酶，用于啤酒的澄清；此后，酶的生产 and

应用逐步发展。然而,在半个世纪的时间里,都是停留在从动物、植物或微生物细胞中进行酶的提取、分离并加以应用的阶段。

(2) 20世纪40年代至60年代,酶的生产迅速发展,其研究开发的主要内容是利用微生物进行酶的发酵生产,通过发酵优化控制,获得大量所需的酶并进行酶的高效应用。

1949年,采用微生物液体深层培养方法进行细菌 α -淀粉酶的发酵生产,揭开了现代酶制剂工业的序幕。20世纪50年代以后,随着发酵工程技术的发展,许多酶制剂都采用微生物发酵方法生产。由于微生物种类繁多,生长繁殖迅速,在人工控制条件的生物反应器中进行生产,这就使酶的生产得以大规模发展。

1960年,法国的雅各(Jacob)和莫诺德(Monod)提出操纵子学说,阐明了酶生物合成的调节机制,使酶的生物合成可以按照人们的意愿加以调节控制,在酶的发酵生产中,依据操纵子学说,进行诱导和解除阻遏等调节控制,显著提高酶的产率。

(3) 20世纪70年代以来,酶工程全面迅速发展,先后发展起来的固定化酶、动植物细胞培养产酶、酶分子修饰、酶非水相催化和酶定向进化技术等已经成为酶工程的主要内容之一。

1969年,日本的千畑一郎首次在工业上应用固定化氨基酰化酶进行DL-氨基酸拆分而生产L-氨基酸。从此学者们开始用“酶工程”这个名词来代表酶的生产 and 应用的科学技术领域。1971年,在美国举行了第一届国际酶工程学术会议,会议的主题是酶固定化。此后,在固定化酶的基础上又发展了固定化细胞技术和固定化原生质体技术等,为胞外酶和胞内酶连续生产开辟崭新的途径。

20世纪80年代迅速发展起来的动、植物细胞培养技术,继微生物发酵生产酶之后,已成为酶生产的又一种途径。植物细胞和动物细胞都可以如同微生物细胞一样,在人工控制条件的生物反应器中进行培养,通过细胞的生命活动,得到人们所需的各种产物,其中包括各种酶。

20世纪80年代以来,酶分子修饰技术发展很快,通过酶分子修饰,可以提高酶的催化效率,增加酶的稳定性,消除或降低酶的抗原性等;酶分子修饰技术已经成为酶工程中具有重要意义和广阔应用前景的研究、开发领域。

1984年,克利巴诺夫(Klibanov)等人进行了有机介质中酶的催化作用的研究,改变了酶只能在水溶液中进行催化的传统观念。与水溶液中酶的催化相比,酶在有机介质中的催化具有提高非极性底物或产物的溶解度、进行在水溶液中无法进行的合成反应、减少产物对酶的反馈抑制作用、提高手性化合物不对称反应的对映体选择性等显著特点,具有重要的理论意义和应用前景。

20世纪90年代以来,随着易错PCR(error-prone PCR)技术、DNA重排(DNA shuffling)技术、基因家族重排(gene family shuffling)技术等体外基因随机突变技术以及各种高通量筛选(high-throughput screening)技术的发展,

酶定向进化 (enzyme directed evolution) 技术已经发展成为改进酶催化特性的强有力手段。酶的定向进化是一种快速有效地改进酶的催化特性 (底物特异性、酶催化活性、稳定性、对映体选择性等) 的手段, 通过酶的定向进化, 有可能获得具有优良特性的新酶分子, 酶定向进化已经成为酶工程研究的热点之一。

在了解酶工程发展概况的基础上, 就容易理解和掌握酶工程的基本概念和主要内容。

酶工程是酶的生产与应用的技术过程。

酶的生产 (enzyme production) 是指通过各种方法获得人们所需酶的技术过程, 主要包括微生物发酵产酶, 动植物培养产酶和酶的提取与分离纯化等。

酶的应用 (enzyme application) 是通过酶的催化作用获得所需产物或者除去不良物质、获取所需信息的技术过程, 主要包括酶反应器的选择与设计以及酶在各个领域的应用等。

在酶的生产和应用过程中, 人们发现酶具有稳定性较差、催化效率不够高、游离酶通常只能使用一次等弱点, 为此研究、开发了各种酶的改性技术, 以促进酶的优质生产和高效应用。

酶的改性 (enzyme improving) 是通过各种方法改进酶的催化特性的技术过程, 主要包括酶分子修饰 (enzyme molecule modification)、酶固定化 (enzyme immobilization)、酶非水相催化 (enzyme catalysis in non-aqueous phase)、酶定向进化 (enzyme directed evolution) 等。

综上所述, 酶工程的主要内容包括: 微生物细胞发酵产酶, 动植物细胞培养产酶, 酶的提取与分离纯化, 酶分子修饰, 酶、细胞、原生质体固定化、酶非水相催化、酶定向进化、酶反应器和酶的应用等。

三、酶的催化特性

酶的催化特性是酶在各个领域广泛应用的理论基础之一, 学习时应根据酶与非酶催化剂在进行催化时的主要不同点, 理解和掌握酶的催化特性。

酶是生物催化剂, 与非酶催化剂相比, 具有不同的催化特性, 主要表现在专一性、催化效率和作用条件等方面。

(一) 酶催化作用的专一性

酶催化作用的专一性是酶的最重要的特性之一, 也是酶与其他非酶催化剂的最主要的不同之处。细胞中有秩序的物质代谢规律, 是依靠酶的专一性来实现的, 在酶的应用过程中, 也是依据酶的专一性来进行底物的选择。

酶的专一性是指在一定的条件下, 一种酶只能催化一种或一类结构相似的底物进行某种类型反应的特性。

酶的专一性按其严格程度的不同, 可以分为绝对专一性和相对专一性两大类。

1. 绝对专一性

一种酶只能催化一种底物进行一种反应，这种高度的专一性称为绝对专一性。当酶作用的底物含有不对称碳原子时，酶只能作用于异构体的一种。这种绝对专一性称为立体异构专一性。例如，乳酸脱氢酶 [EC 1.1.1.27] 催化丙酮酸进行加氢反应生成 L-乳酸，而 D-乳酸脱氢酶 [EC 1.1.1.28] 却只能催化丙酮酸加氢生成 D-乳酸。

绝对专一性的另一个典型例子是天冬氨酸氨裂合酶 [EC 4.3.1.1]，此酶仅作用于 L-天冬氨酸，经过脱氨基作用生成延胡索酸（反丁烯二酸）及其逆反应，而对 D-天冬氨酸和马来酸（顺丁烯二酸）都一概不作用。

核酸类酶也同样具有绝对专一性，如四膜虫 26S rRNA 前体等催化自我剪接反应的 R 酶，只能催化其本身 RNA 分子进行反应，而对于其他分子一概不作用。

再如 L-19 IVS 是含有 395 个核苷酸的核酸类酶，该酶催化底物 GGCCUCUAAAAA 与鸟苷酸 (G) 反应生成产物 GGCCUCU + GAAAAA，但是对寡核苷酸 GGCCUGUAAAAA 以及 GGCCGCUAAAAA 等一概不作用。

2. 相对专一性

一种酶能够催化一类结构相似的底物进行某种相同类型的反应，这种专一性称为相对专一性。

相对专一性又可分为键专一性和基团专一性。

键专一性的酶能够作用于具有相同化学键的一类底物。如，酯酶可催化所有含酯键的酯类物质水解生成醇和酸。

基团专一性的酶则要求底物含有某一相同的基团。如胰蛋白酶 [EC 3.4.31.4] 选择性地水解含有赖氨酰-或精氨酰-的羰基的肽键，所以，凡是含有赖氨酰-或精氨酰-羰基肽键的物质，不管是酰胺、酯或多肽、蛋白质都能被该酶水解。

再如核酸类酶 M1 RNA（核糖核酸酶 P 的 RNA 部分），催化 tRNA 前体 5' 端的成熟。要求底物核糖核酸的 3' 端部分是一个 tRNA，而对其 5' 端部分的核苷酸链的顺序和长度没有要求，催化反应的产物为一个成熟的 tRNA 分子和一个低聚核苷酸。

(二) 酶的催化效率

酶催化效率的高低可以用酶的转换数 K_{cat} 来表示，酶催化的转换数是指每个酶分子每分钟催化底物转化为产物的分子数，也即是每摩尔酶每分钟催化底物转化为产物的摩尔数。酶的转换数一般为 10^3 min^{-1} 左右，如 β -半乳糖苷酶的转换数为 $12.5 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ ，碳酸酐酶的转换数最高，达到 $3.6 \times 10^7 \text{ min}^{-1}$ 。

酶的催化效率比非酶催化反应的催化效率高 $10^7 \sim 10^{13}$ ，例如，过氧化氢

(H_2O_2) 可以在铁粒子和过氧化氢酶的催化作用下分解成为氧和水 ($2\text{H}_2\text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)，在一定条件下，1 mol 铁离子每分钟可催化 10^{-5} mol 过氧化氢分解；在相同条件下，1 mol 过氧化氢酶每分钟却可以催化 10^5 mol 的过氧化氢分解，过氧化氢酶的催化效率是铁离子的 10^{10} 倍。

酶催化效率之所以这么高，是由于酶催化反应可以使反应所需的活化能显著降低，例如，双氧水 (H_2O_2) 分解为水和原子氧的反应，无催化剂存在时，所需的活化能为 75.24 kJ/mol，以钨为催化剂时，催化所需的活化能为 48.94 kJ/mol，而在过氧化氢酶的催化作用下，活化能仅为 8.36 kJ/mol。

酶的催化效率虽然比非酶催化的效率高，然而并非所有酶的催化效率都高，有些酶的催化效率往往达不到人们的要求。为此需要通过酶的改性 (enzyme improving) 措施，以进一步提高酶的催化效率。例如采用酶分子修饰、酶固定化、酶定向进化等技术都可显著提高酶的催化效率。

(三) 酶催化作用的条件

酶催化作用与非酶催化作用的另一个显著差别是酶催化作用的条件。

酶的催化作用一般都在常温、常压、pH 近乎中性的条件下进行，例如，一般酶作用的适宜温度范围为 $25\sim 40^\circ\text{C}$ ，在 60°C 以上酶容易变性失活，一般酶作用的适宜 pH 范围为 pH 5~9，低于 2 或者高于 11 酶往往容易变性失活。与之相反，一般非酶催化作用往往需要高温、高压和极端 pH 条件。因此，采用酶作为催化剂，有利于节省能源、减少设备投资、优化工作环境和劳动条件。

究其原因，一是由于酶催化作用所需的活化能较低，例如，过氧化氢酶催化双氧水 (H_2O_2) 分解为水和原子氧的反应，所需的活化能 (8.36 kJ/mol) 仅为以钨为催化剂时所需活化能 (48.94 kJ/mol) 的 17%。

二是由于酶是具有生物催化功能的生物大分子，在高温、高压、过高或过低 pH 等较激烈的反应条件下，稳定性较差，往往会引起酶的变性失活，而失去其催化功能。为此，需要通过酶的改性技术，以增强酶的稳定性。采用酶分子修饰、酶固定化、酶非水相催化、酶定向进化等改性技术都可显著提高酶的热稳定性，例如，通过易错 PCR 技术进行定向进化，使枯草杆菌蛋白酶 E 在 60% 的二甲基甲酰胺 (DMF) 中进行非水相催化的热稳定性显著提高，最适作用温度提高 17°C ，在 65°C 的半衰期 ($t_{1/2}$) 延长 50~200 倍。

四、影响酶催化作用的主要因素

根据酶动力学 (enzyme kinetics) 的基本知识，掌握底物浓度、酶浓度、温度、pH、激活剂、抑制剂等因素对酶催化作用的影响。

酶的催化作用受到底物浓度、酶浓度、温度、pH、激活剂浓度、抑制剂浓度等诸多因素的影响。在酶的应用过程中，必须控制好各种环境条件，以充分发

挥酶的催化功能。

(一) 底物浓度的影响

底物浓度是决定酶催化反应速度的主要因素，酶催化反应速度与底物浓度有密切关系，在底物浓度较低的情况下，酶催化反应速度与底物浓度成正比，反应速度随着底物浓度的增加而加快，当底物浓度达到一定的数值时，反应速度的上升不再与底物浓度成正比，而是逐步趋向平衡，如图 1-1 所示。

为了解析这一现象，不少人进行了研究，1913 年，米彻利斯 (Michaelis) 和 曼吞 (Menton) 在前人研究的基础上，推导出著名的米氏方程。

$$V = \frac{V_m S}{K_m + S}$$

式中：V 为反应速度；
S 为底物浓度；
 K_m 为米氏常数；
 V_m 为最大反应速度。

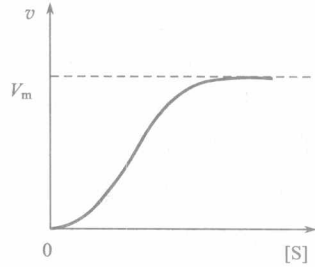


图 1-1 底物浓度与酶催化反应速度的关系

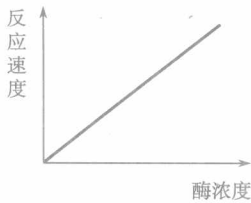


图 1-2 酶浓度与反应速度的关系

这一酶催化反应的基本动力学方程阐明了底物浓度与酶催化反应速度之间的定量关系。

有些酶在底物浓度过高时，反应速度反而下降，这是由于高浓度底物引起的抑制作用。例如，乙醇脱氢酶受到高浓度底物乙醇的抑制等。

(二) 酶浓度的影响

在底物浓度足够高的条件下，酶催化反应速度与酶浓度成正比，如图 1-2 所示。它们之间的关系可以用下式表示：

$$V = k[E]$$

(三) 温度的影响

每一种酶的催化反应都有其适宜温度范围和最适温度。在适宜温度范围内，酶才能够进行催化反应；在最适温度条件下，酶的催化反应速度达到最大。如图 1-3 所示。

一方面，在其他条件相同的情况下，温度每升高 10°C ，化学反应速度增加 1~2 倍；另一方

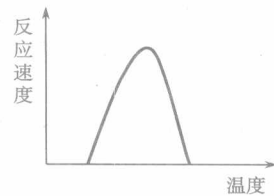


图 1-3 温度与反应速度的关系

面，酶是生物大分子，当温度升高时，酶的活性会受到影响，甚至引起变性而丧失其催化活性。这两个方面综合的结果，在某一特定温度的条件下，酶催化反应速度达到最大。这就是最适温度。超过最适温度，反应速度逐步降低，一般酶在60℃以上容易变性失活。但也有一些酶的热稳定性较高，例如，在聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）中广泛使用的 *Taq* 聚合酶（*Taq* polymerase）在95℃仍然可以稳定地进行催化。耐高温 α -淀粉酶在90℃甚至更高的温度条件下，仍然正常地发挥其催化功能。添加酶的作用底物或者某些稳定剂，可以适当提高酶的热稳定性。

（四）pH 的影响

酶的催化作用与反应液的 pH 有很大关系。每一种酶都有各自的适宜 pH 范围和最适 pH。只有在适宜 pH 范围内，酶才能显示其催化活性。在最适 pH 条件下，酶催化反应速度达到最大。如图 1-4 所示。

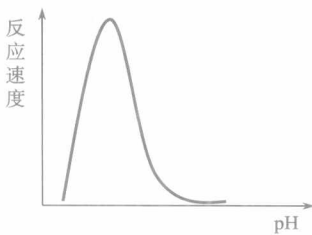


图 1-4 pH 与反应速度的关系

pH 过高或过低，都可能引起酶的变性失活。因此，在酶催化反应过程中，都必须控制好 pH。

pH 之所以影响酶的催化作用主要是由于在不同的 pH 条件下，酶分子和底物分子中基团的解离状态发生改变，从而影响酶分子的构象以及酶与底物的结合能力和催化能力。在极端的 pH 条件下，酶分子的空间结构发生改变，从而引起酶的变性失活。

（五）抑制剂的影响

能够使酶的催化活性降低或者丧失的物质称为酶的抑制剂。

有些抑制剂是细胞正常代谢的产物，它可以作为某一种酶的抑制剂，在细胞的代谢调节中起作用。例如，色氨酸抑制色氨酸合成途径中催化第一步反应的酶（邻氨基苯甲酸合成酶）的催化活性，从而调节色氨酸的生物合成等。大多数抑制剂是外源物质，主要的外源抑制剂有各种无机离子、小分子有机物和蛋白质等。例如，银（ Ag^+ ）、汞（ Hg^{2+} ）、铅（ Pb^{2+} ）等重金属离子对许多酶均有抑制作用，抗坏血酸（Vc）抑制蔗糖酶的活性，胰蛋白酶抑制剂抑制胰蛋白酶的活性等等。有些酶抑制剂是一类有重要应用价值的药物，例如，胰蛋白酶抑制剂治疗胰腺炎等。

在抑制剂的作用下，酶的催化活性降低甚至丧失，从而影响酶的催化功能。

抑制剂有可逆性抑制剂和不可逆抑制剂之分。

不可逆抑制剂与酶分子结合后，抑制剂难于除去，酶活性不能恢复。

可逆性抑制剂与酶的结合是可逆的，只要将抑制剂除去，酶活性即可恢复。根据可逆性抑制作用的机理不同，酶的可逆性抑制作用可以分为竞争性抑制、非竞争性抑制和反竞争性抑制三种。

1. 竞争性抑制

竞争性抑制 (competitive inhibition) 是指抑制剂和底物竞争与酶分子结合而引起的抑制作用。

竞争性抑制剂与酶作用底物的结构相似。它与酶分子结合以后，底物分子就不能与酶分子结合，从而对酶的催化起到抑制作用。例如，丙二酸是琥珀酸的结构类似物。它们可以竞争琥珀酸脱氢酶分子上的结合位点，而琥珀酸脱氢酶只能催化琥珀酸脱氢，所以丙二酸是琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制剂。

竞争性抑制的效果强弱与竞争性抑制剂的浓度、底物浓度以及抑制剂和底物与酶的亲合力大小有关。随着底物浓度增加，酶的抑制作用减弱。

竞争性抑制的特点是酶催化反应的最大反应速度 V_m 不变，而米氏常数 K_m 增大 (图 1-5)。

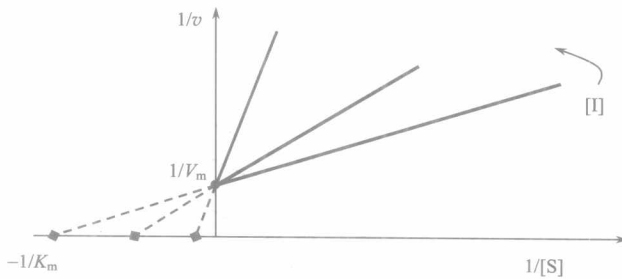


图 1-5 线性竞争性抑制的 K_m 和 V_m 变化

2. 非竞争性抑制

非竞争性抑制 (noncompetitive inhibition) 是指抑制剂与底物分别与酶分子上的不同位点结合，而引起酶活性降低的抑制作用。

由于非竞争性抑制剂是与酶的活性中心以外的位点结合，所以，抑制剂的分子结构可能与底物分子的结构毫不相关。增加底物浓度也不能使非竞争性抑制作用逆转。

非竞争性抑制的特点是最大反应速度 V_m 减小，而米氏常数 K_m 不变。如图 1-6 所示。

3. 反竞争性抑制

在底物与酶分子结合生成中间复合物后，抑制剂再与中间复合物结合而引起的抑制作用称为反竞争性抑制 (uncompetitive inhibition)。