

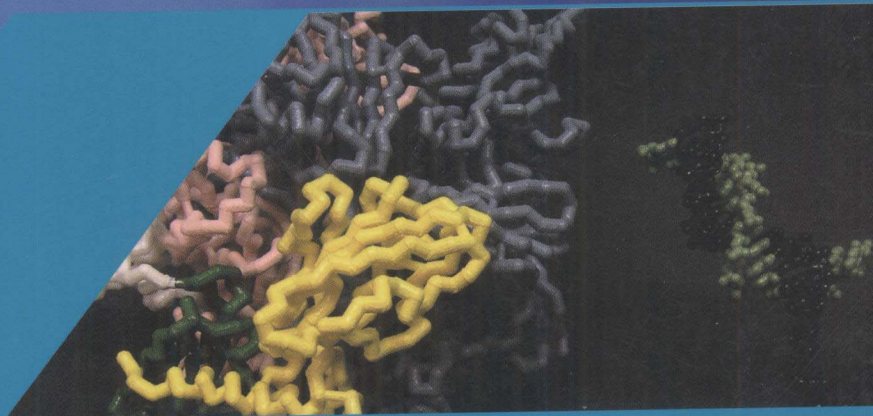


普通高等教育“十一五”国家级规划教材

ENZYMEE
ENGINEERING

酶工程

(第三版)



郭 勇 编著



科学出版社
www.sciencep.com

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

酶 工 程

(第三版)

郭 勇 编著

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是在1994年中国轻工业出版社出版的《酶工程》和2004年科学出版社出版的《酶工程》(第二版)的基础上,根据国内外酶工程的最新进展,结合笔者的教学实践和科研成果,修改补充而成的普通高等教育“十一五”国家级规划教材。

本书主要介绍酶的生产和应用的基本理论、基本技术及其最新进展和发展趋势,内容包括绪论、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、酶及细胞和原生质体固定化、酶非水相催化、酶定向进化、酶反应器、酶的应用共10章。章后复习思考题,书末附有中英文专业名词对照。

本书可供高等院校生物工程、生物化工、酶工程、发酵工程、生物技术、生物科学等专业的研究生和本科生作教材使用,也可供有关专业的教学工作者、科研工作者和工程技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

酶工程/郭勇编著. —3版. —北京:科学出版社,2009
(普通高等教育“十一五”国家级规划教材)
ISBN 978-7-03-025212-8

I. 酶… II. 郭… III. 酶-生物工程-高等学校-教材 IV. Q814

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第140949号

责任编辑:王国栋 单冉东 周 辉/责任校对:陈丽珠
责任印制:张克忠/封面设计:耕者封面设计工作室

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>

盛志印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1994年5月第一版 中国轻工业出版社

2004年8月第二版 开本:787×1092 1/16

2009年8月第三版 印张:19 1/4

2010年2月第十次印刷 字数:439 000

印数:6 001—16 000

定价:30.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

第三版前言

本书是在 1994 年中国轻工业出版社出版的《酶工程》和 2004 年科学出版社出版的《酶工程》(第二版)的基础上,根据国内外酶工程的最新进展和发展趋势,结合作者的教学实践和科研成果,修改补充而成的普通高等教育“十一五”国家级规划教材。

自从《酶工程》(第二版)出版以来,在国内 100 多所高等院校广泛使用,取得良好的教学效果。2006 年,《酶工程》(第三版)列入普通高等教育“十一五”国家级规划教材。为了高质量地完成编写任务,作者广泛收集国内外有关酶工程的文献资料,经过去粗取精、去伪存真,对《酶工程》(第二版)的内容作了较大的修改和补充。

近几年来,随着易错 PCR(error-prone PCR)、DNA 重排(DNA shuffling)、基因家族重排(gene family shuffling)等基因随机突变技术和各种高通量筛选(high-throughput screening)技术的发展,酶定向进化(directed evolution)技术已经成为生物科学与工程领域的研究热点之一。

酶定向进化是模拟自然进化过程(随机突变和自然选择),在体外进行基因的随机突变,建立突变基因文库,在人工控制条件的特殊环境中,定向选择获得酶的突变体的技术过程。酶定向进化技术具有适应面广、目的性强、效果显著等特点,可以在较短的时间内获得具有新的催化特性的酶突变体。定向进化可以显著提高酶活力,增强酶的稳定性,改变酶的底物专一性等,已经成为一种快速有效地改进酶的催化特性的手段。为此,本书新增“酶定向进化”一章,由原来的 9 章扩展为 10 章,同时对其他章节的内容也作了修改和补充。

为了进一步提高教学效果,适应多媒体教学的需要,在本书的基础上,由郑穗平、韩双艳编写制作了配套的教学课件。

本书的编写和出版得到华南理工大学和科学出版社领导的关怀和支持,并承蒙有关专家、教授的热情关怀和帮助,提供了不少资料和宝贵意见,在此表示衷心的感谢。

虽然第三版的内容有较多的更新,但是由于酶工程是一门迅速发展的学科,新技术、新工艺、新方法不断涌现,加上作者水平所限,不当之处诚请读者批评指正。

编著者

2009. 2

第二版前言

本书是在 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,结合作者的教学实践和科研成果重新编写而成。

自本书第一版以来,已经过 10 年的时间,在这期间,本书在华南理工大学、江南大学等几十所高等院校作为相关专业研究生和本科生的教材使用,取得良好的教学效果。

近 10 年来,酶工程作为生物工程的组成部分与生物学的其他领域(基因工程、细胞工程、发酵工程等)一起飞速发展,在理论研究和应用研究方面均取得了巨大成果。为了更全面、系统地反映酶的生产和应用的基本理论、基本技术及其最新进展和发展趋势,笔者对第一版内容进行了较大的修改和补充,由原来的 8 章扩展到现在的 9 章。新增加了动、植物细胞培养产酶和酶的非水相催化两章,由于酶反应动力学在酶学和生物化学中都有详细介绍,所以不再作为一章单独列出,而把与酶工程关系密切的有关反应动力学内容在第一章中作简明介绍。除了新增加的章节以外,对原有章节的内容也作了较大的修改和补充。

酶工程是酶的生产与应用的技术过程,其主要任务是通过人工操作,获得人们所需的酶,并通过各种方法使酶发挥其催化功能。

酶的生产方法主要有提取分离法、生物合成法和化学合成法等。提取分离法是采用各种生化分离技术从含酶的动物、植物的组织、器官、细胞或微生物细胞中将酶提取出来,再经过分离纯化得到所需的酶,是酶生产中最早采用的方法,至今仍在使用。酶的分离纯化在用其他方法生产酶的过程中以及在酶学研究过程中,也是必不可少的环节。生物合成法是在人工控制条件的生物反应器中,通过微生物细胞、植物细胞或动物细胞的生命活动合成所需酶的方法,是当今应用最广泛的方法,其中通过微生物的生命活动而获得所需酶的方法又称为发酵法,利用动、植物细胞培养可以生产得到有重要应用价值的各种酶,为酶的生产开辟了新的途径;化学合成法是采用化学方法合成所需的酶,由于要求所使用的氨基酸单体有很高的纯度,合成过程复杂,成本高,至今仍未工业化生产。但是化学合成方法在酶分子修饰的研究、开发方面具有重要的意义和使用价值。

酶是具有完整结构的生物大分子,具有专一性强、催化效率高、作用条件温和等显著特点,但是同时具有稳定性较差、酶活力较低、可能产生抗原性、通常游离酶只能一次性使用等弱点。为了在保持酶分子优点的同时克服酶分子在使用过程中的不足,开发了各种酶的特性改良技术,主要包括酶分子修饰技术、固定化技术以及酶非水相催化技术等。这些技术对酶的优化生产和高效应用起到促进作用,推动了酶工程的进一步发展。

酶的应用是酶工程的主要内容之一,通过酶的催化作用,可以得到人们所需要的物质或者将不需要的甚至有害的物质除去,以利于人体的健康、环境的保护、经济的发展和社会的进步。酶已经在医药、食品、轻工、化工、能源、环保等领域广泛应用。在酶的应用过程中,必须采用适宜的酶反应器,运用酶反应动力学的知识控制好酶催化反应的各种条

件,使酶的催化作用达到预定的效果。

本书可供高等院校生物工程、酶工程、发酵工程、生物技术、生物化工等专业的师生作为教材使用。也可供有关专业的教学工作者、科学工作者和工程技术人员参考使用。

虽然第二版的内容有较多的更新,但是由于酶工程发展迅速,新的技术和方法不断涌现,加上编者水平所限,不当之处,诚请读者指正。

编著者

2004.3

第一版前言

根据 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,新编《酶工程》,供发酵工程和相关专业的研究生或本科高年级学生作为教材使用。由郭勇负责主编,伦世仪担任主审。

本书的第一、二、三、四、五、八章由郭勇编写,第六、七章由莫开国编写。

在编写过程中,得到华南理工大学、无锡轻工业学院及各有关院校领导的关怀和支持,保证了编写工作的顺利进行。并承蒙有关专家、教授的热情支持和帮助,提供了不少的资料和宝贵意见,谨致衷心感谢。

由于酶工程是一门新兴的、发展神速的学科,往往书未印出,某些方面又有了新的进展。加上编者水平所限,不当之处,诚请读者批评指正。

编者

1993

目 录

第三版前言	
第二版前言	
第一版前言	

第一章 绪论	1
第一节 酶的基本概念与发展历史	1
第二节 酶催化作用的特点	3
第三节 影响酶催化作用的因素	5
第四节 酶的分类与命名	10
第五节 酶的活力测定	16
第六节 酶的生产方法	20
第七节 酶工程发展概况	22
复习思考题	25
第二章 微生物发酵产酶	26
第一节 微生物细胞中酶生物合成的调节	27
第二节 产酶微生物的特点	39
第三节 发酵工艺条件及其控制	43
第四节 酶发酵动力学	52
第五节 固定化微生物细胞发酵产酶	56
第六节 固定化微生物原生质体发酵产酶	62
复习思考题	63
第三章 动植物细胞培养产酶	64
第一节 动植物细胞中酶生物合成的调节	64
第二节 植物细胞培养产酶	67
第三节 动物细胞培养产酶	77
复习思考题	84
第四章 酶的提取与分离纯化	85
第一节 细胞破碎	85
第二节 提取	88
第三节 沉淀分离	91
第四节 离心分离	94
第五节 过滤与膜分离	99
第六节 层析分离	103

第七节 电泳分离·····	119
第八节 萃取分离·····	126
第九节 结晶·····	132
第十节 浓缩与干燥·····	134
复习思考题·····	135
第五章 酶分子修饰·····	136
第一节 金属离子置换修饰·····	136
第二节 大分子结合修饰·····	138
第三节 侧链基团修饰·····	141
第四节 肽链有限水解修饰·····	146
第五节 核苷酸链剪切修饰·····	147
第六节 氨基酸置换修饰·····	148
第七节 核苷酸置换修饰·····	150
第八节 物理修饰·····	151
第九节 酶分子修饰的应用·····	152
复习思考题·····	157
第六章 酶、细胞、原生质体固定化·····	158
第一节 酶固定化·····	159
第二节 细胞固定化·····	169
第三节 原生质体固定化·····	178
复习思考题·····	181
第七章 酶非水相催化·····	182
第一节 酶非水相催化的主要内容·····	182
第二节 有机介质中水和有机溶剂对酶催化反应的影响·····	183
第三节 酶在有机介质中的催化特性·····	188
第四节 有机介质中酶催化反应的条件及其控制·····	191
第五节 酶非水相催化的应用·····	197
复习思考题·····	204
第八章 酶定向进化·····	205
第一节 酶定向进化的特点·····	206
第二节 酶基因的随机突变·····	207
第三节 酶突变基因的定向选择·····	212
第四节 酶定向进化的应用·····	221
复习思考题·····	223
第九章 酶反应器·····	224
第一节 酶反应器的类型·····	224
第二节 酶反应器的选择·····	229
第三节 酶反应器的设计·····	233

第四节 酶反应器的操作·····	236
复习思考题·····	240
第十章 酶的应用·····	241
第一节 酶在医药方面的应用·····	241
第二节 酶在食品方面的应用·····	259
第三节 酶在轻工、化工方面的应用·····	271
第四节 酶在环境保护方面的应用·····	278
第五节 酶在生物技术方面的应用·····	280
复习思考题·····	286
主要参考书目·····	287
中英文专业名词对照·····	288

第一章 绪 论

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,自然界中天然存在的酶可以分为蛋白类酶(proteozyme, protein enzyme, P 酶)和核酸类酶(ribozyme, RNA enzyme, R 酶)两大类别。

各种动物、植物、微生物细胞在适宜的条件下都可以合成各种各样的酶。因此,人们可以采用适宜的细胞,在人工控制条件的生物反应器中生产各种所需的酶。

在一定的条件下,酶可催化各种生化反应。酶的催化作用具有催化效率高、专一性强和作用条件温和等显著特点,所以酶在医药、食品、轻工、化工、环保、能源和生物工程等领域应用广泛。

在酶的应用过程中,针对其存在的活力不够高、稳定性较差等不足之处,发展了各种酶改性技术,使酶的催化特性进行改进,以更加适应应用的要求。

酶的生产、改性与应用的技术过程称为酶工程。

酶的生产(enzyme production)是指通过各种方法获得人们所需的酶的技术过程,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、酶固定化、酶非水相催化和酶定向进化等。

酶的应用(enzyme application)是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。

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。

酶工程的主要任务是经过预先设计,通过人工操作获得人们所需的酶,并通过各种方法使酶的催化特性得以改进,充分发挥其催化功能。

第一节 酶的基本概念与发展历史

我们的祖先在几千年前就已经不自觉地利用酶的催化作用来制造食品和治疗疾病。据文献记载,我国在 4000 多年前的夏禹时代就已经掌握了酿酒技术,在 3000 多年前的周朝,就会制造饴糖、食酱等食品,在 2500 多年前的春秋战国时期,就懂得用麴来治疗消化不良等疾病。我们的先人不但创造了“酶”这个汉字,而且给出了“酶者,酒母也”这个比较确切的定义。

然而,人们从 19 世纪 30 年代开始才真正认识到酶的存在和作用。100 多年来,人们对酶的认识经历了一个不断发展、逐步深入的过程。

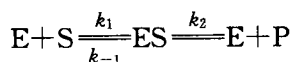
1833 年,佩恩(Payen)和帕索兹(Persoz)从麦芽的水抽提物中用乙醇沉淀得到一种

可使淀粉水解生成可溶性糖的物质,称之为淀粉酶(diastrase)。并指出了它的热不稳定性,初步触及了酶的一些本质问题。

19世纪中叶,巴斯德(Pasteur)对酵母的乙醇发酵进行了大量研究,认为在活酵母细胞内有一种可以将糖发酵生成乙醇的物质。1878年昆尼(Kuhne)首次将酵母中进行乙醇发酵的物质称为酶(enzyme),这个词来自希腊文,意思是“在酵母中”。

1896年,巴克纳(Buchner)兄弟发现酵母的无细胞抽提液也能将糖发酵成乙醇。这就表明不仅在细胞内,在细胞外酶也可以在一定的条件下进行催化作用。此后,不少科技工作者对酶的催化特性和催化作用的理论进行了广泛的研究。

1902年,亨利(Henri)根据蔗糖酶催化蔗糖水解的实验结果,提出中间产物学说,他认为在底物转化成产物之前,必须首先与酶形成中间复合物,然后再转变为产物,并重新释放出游离的酶。即:



1913年,米彻利斯(Michaelis)和曼吞(Menten)根据中间产物学说,推导出酶催化反应的基本动力学方程——米氏方程:

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

在这近100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”,但是尚未弄清究竟是哪一类物质。1920年,德国化学家威尔斯塔特(Willstater)将过氧化物酶纯化12000倍,得到的酶活性很高,但是检测不到蛋白质,所以认为酶不是蛋白质,这是由当时的检测技术较为落后所致。

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,人们普遍接受了“酶是具有生物催化功能的蛋白质”这一概念。

1960年,雅各(Jacob)和莫诺德(Monod)提出操纵子学说,阐明了酶生物合成的基本调节机制。

1982年,切克(Thomas Cech)等发现四膜虫(*Tetrahymena*)细胞的26S rRNA前体具有自我剪接功能(self-splicing)。该RNA前体约有6400个核苷酸,含有1个内含子(intron)或称为间隔序列(intervening sequence, IVS)和2个外显子(exon),在成熟过程中,通过自我催化作用,将间隔序列切除,并使2个外显子连接成成熟的RNA,这个过程称为剪接。这种剪接不需要蛋白质存在,但必须有鸟苷或5'-GMP和镁离子参与。切克将之称为自我剪接反应,认为RNA亦具有催化活性,并将这种具有催化活性的RNA称为核酸类酶。

1983年,阿尔特曼(Sidney Altman)等发现核糖核酸酶P(RNase P)的RNA部分M1 RNA具有核糖核酸酶P的催化活性,可以在高浓度镁离子存在的条件下,单独催化tRNA前体从5'端切除某些核苷酸片段而成为成熟的tRNA。而该酶的蛋白质部分C₂蛋白却没有酶活性。

RNA具有生物催化活性这一发现,改变了有关酶的概念,被认为是最近20多年来生

物科学领域最令人鼓舞的发现之一。为此,切克和阿尔特曼共同获得 1989 年度的诺贝尔化学奖。

20 多年来,新发现的核酸类酶越来越多。现在知道的核酸类酶具有自我剪接、自我剪切和催化分子间反应等多种功能,作用底物有 RNA、DNA、糖类、氨基酸酯等。研究表明,核酸类酶具有完整的空间结构和活性中心,有其独特的催化机制和很高的底物专一性,其反应动力学亦符合米氏方程的规律。可见,核酸类酶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。蛋白类酶分子中起催化作用的主要组分是蛋白质,核酸类酶分子中起催化作用的主要组分是核糖核酸(RNA)。

第二节 酶催化作用的特点

酶是生物催化剂,与非酶催化剂相比,具有专一性强、催化效率高和作用条件温和等显著特点。

一、酶催化作用的专一性强

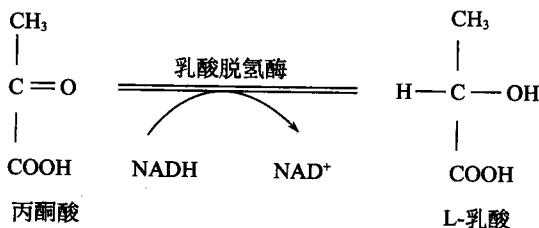
酶催化作用的专一性是酶的最重要的特性之一,也是酶与其他非酶催化剂的最主要的不同之处。细胞中有秩序的物质代谢规律,就是依靠酶的专一性来实现的。酶的专一性也是酶在各个领域广泛应用的重要基础。

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。

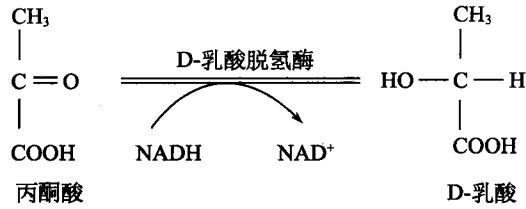
酶的专一性按其严格程度的不同,可以分为绝对专一性和相对专一性两大类。

1. 绝对专一性

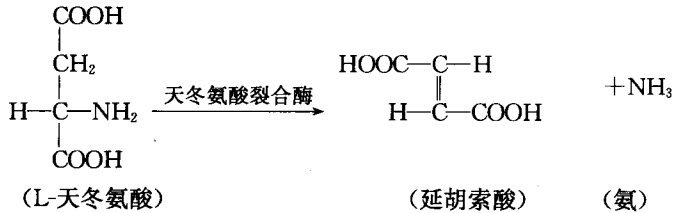
一种酶只能催化一种底物进行一种反应,这种高度的专一性称为绝对专一性。当酶作用的底物含有不对称碳原子时,酶只能作用于异构体的一种,这种绝对专一性称为立体异构专一性。例如,乳酸脱氢酶 [EC 1.1.1.27] 催化丙酮酸进行加氢反应生成 L-乳酸:



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。例如，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。

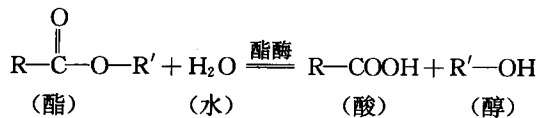
再如 L-19 IVS 是含有 395 个核苷酸的核酸类酶，该酶催化底物 GGCCUCUAAAAA 与鸟苷酸(G)反应，生成产物 GGCCUCU+GAAAAA。但是对寡核苷酸 GGCCUGUAAAAA 及 GGCCGCUAAAAA 等一概不作用。

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。例如，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-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。

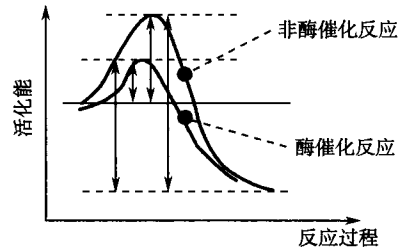
二、酶催化作用的效率高

酶的另一个显著特点是酶催化作用的效率高。酶催化的转换数(每个酶分子每分钟催化底物转化的分子数)一般为 $10^3/\text{min}$ 左右,如 β -半乳糖苷酶的转换数为 $12.5 \times 10^3/\text{min}$,碳酸酐酶的转换数最高,达到 $3.6 \times 10^7/\text{min}$ 。

酶的催化效率比非酶催化反应的效率高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。例如,过氧化氢(H_2O_2)可在铁离子或过氧化氢酶的催化作用下分解成为氧和水($2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)。在一定条件下,1mol 铁离子每分钟可催化 10^{-5} mol 过氧化氢分解;在相同条件下,1mol 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。

酶催化反应的效率之所以这么高,是由于酶可以使反应所需的活化能显著降低。

底物分子要发生反应,首先要吸收一定的能量成为活化分子。活化分子进行有效碰撞才能发生反应,形成产物。在一定的温度条件下,1mol 的初态分子转化为活化分子所需的自由能称为活化能,其单位为焦耳/摩尔(J/mol)。酶催化和非酶催化反应所需的活化能有显著差别,如图 1-1 所示。



从图中可以看到,酶催化反应比非酶催化反应所需的活化能要低得多。

例如,过氧化氢(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 75.24kJ/mol ;以钨为催化剂时,所需的活化能为 48.94kJ/mol ,而在过氧化氢酶的催化作用下,活化能仅为 8.36kJ/mol 。

三、酶催化作用的条件温和

酶催化作用与非酶催化作用的另一个显著差别是前者的条件温和。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。与之相反,一般非酶催化作用往往需要高温、高压和极端的 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,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 等极端条件下,大多数酶会变性失活而失去其催化功能。

第三节 影响酶催化作用的因素

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。在其他条件不变的情况下,酶催化反应速度与底物浓度的关系如图 1-2 所示。

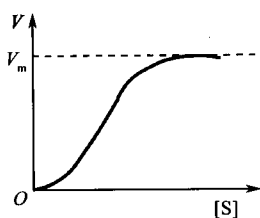


图 1-2 底物浓度与酶催化反应速度的关系

从图中可以看到,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,反应速度的上升与底物浓度不再成正比,而是逐步趋向平衡。

为了解析这一现象,不少人进行了研究,1913年,米彻利斯和曼吞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; V_m 为最大反应速度; K_m 为米氏常数,是酶催化反应速度等于最大反应速度一般时的底物浓度。

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。

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 1-3 所示。它们之间的关系可以用下式表示:

$$V = k[E]$$

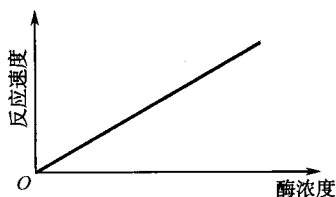


图 1-3 酶浓度与反应速度的关系

三、温度的影响

每一种酶的催化反应都有其适宜的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 1-4 所示。

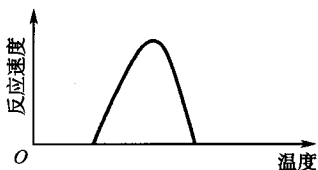


图 1-4 温度与反应速度的关系

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 $1\sim 2$ 倍。

另一方面,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

面综合的结果为,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。每一种酶都有其各自的适宜 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 1-5 所示。pH 过高或过低,都可引起酶的变性失活。因此,在酶催化反应过程中,必须控制好 pH 条件。

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。

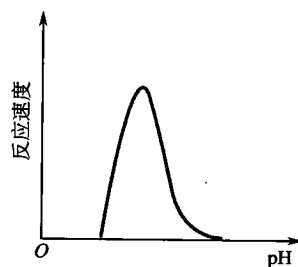


图 1-5 pH 与反应速度的关系

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,其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。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(维生素 C)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。有些酶抑制剂是一类有重要应用价值的药物,如胰蛋白酶抑制剂治疗胰腺炎,胆碱酯酶抑制剂治疗血管疾病等。

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制不同,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。