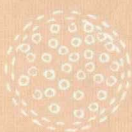
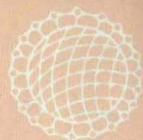




普通高等教育“十一五”国家级规划教材

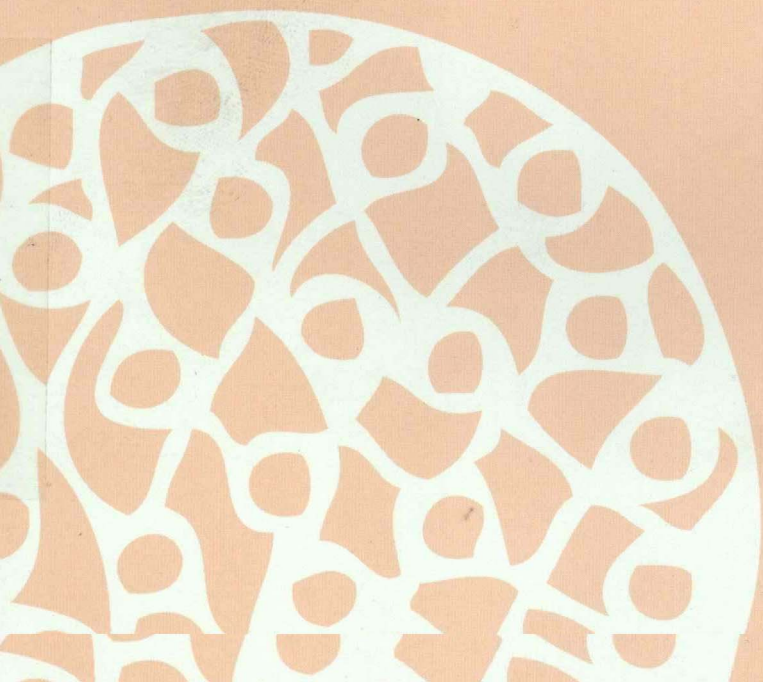


第2版

# 酶工程原理与技术

Principles and Technology of  
Enzyme Engineering

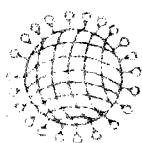
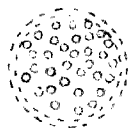
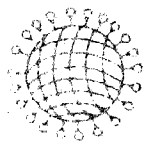
郭勇 主编



高等教育出版社  
HIGHER EDUCATION PRESS



普通高等教育“十一五”国家级规划教材



第2版

# 酶工程原理与技术

Meigongcheng Yuanli Yu Jishu

郭勇 主编

## 内容简介

本书是在第1版的基础上,根据国内外酶工程的最新研究进展和发展趋势,结合编者的教学、科研成果修改补充而成。

本书主要介绍酶的生产与应用的基本原理和基本技术。全书共3篇12章,第一章“绪论”,简明地介绍了酶的一些基本概念和酶工程的发展概况;第一篇“酶的生产”,讲述了酶生物合成的基本理论、酶的生物合成法生产、酶的提取与分离纯化等内容;第二篇“酶的改性”,讲述酶改性的基本理论、酶分子修饰、酶分子定向进化、酶固定化和酶非水相催化等内容;第三篇“酶的应用”,介绍酶应用的基本理论、酶反应器的应用和酶在各领域的应用等。

本书可作为高等院校生物技术、生物工程、生物化工、生物制药、发酵工程、生物科学等专业的酶工程课程教材使用,也可供相关领域的教学工作者、科学工作者和工程技术人员参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

酶工程原理与技术/郭勇主编. —2版. —北京:高等教育出版社,2010.11

ISBN 978-7-04-030259-2

I. ①酶… II. ①郭… III. ①酶-生物工程-高等学校-教材 IV. ①Q814

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第173375号

策划编辑 王莉 责任编辑 田 馨 封面设计 张志奇 责任绘图 尹 莉  
版式设计 范晓红 责任校对 王 超 责任印制 毛斯璐

出版发行 高等教育出版社  
社 址 北京市西城区德外大街4号  
邮政编码 100120

经 销 蓝色畅想图书发行有限公司  
印 刷 北京中科印刷有限公司

开 本 787×1092 1/16  
印 张 21  
字 数 500 000

购书热线 010-58581118  
咨询电话 400-810-0598  
网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.landaco.com>  
<http://www.landaco.com.cn>  
畅想教育 <http://www.widedu.com>

版 次 2005年9月第1版  
2010年11月第2版  
印 次 2010年11月第1次印刷  
定 价 30.50元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究  
物料号 30259-00

# ► 第1版前言

2003年5月全国高校生物科学与工程教学指导委员会委托高等教育出版社正式启动“生物技术和生物工程专业规划教材建设计划”,经过学科专家组的评审及教学指导委员会的复议,全国高校生物科学与工程教学指导委员会和全国高校生物工程与生物技术专业教学指导分委员会于2004年1月10日印发“生物技术和生物工程专业规划教材建设计划”立项评审结果的通知,酶工程项目得以立项,郭勇为项目负责人。

在广泛听取了有关专家教授意见的基础上,考虑到本教材要同时满足生物技术和生物工程等专业的教学要求,新教材必须同时兼顾理科和工科专业高年级学生和研究生需要,必须科学性、系统性和新颖性兼备。为此要在原有主要适用于生物工程专业的《酶工程》教材的基础上加强理论部分,做到理论与实际紧密结合,决定编写《酶工程原理与技术》新教材。

酶工程是酶的生产与应用的技术过程,其主要任务是通过预先设计,经过人工操作,获得所需的酶,并通过各种方法使酶充分发挥其催化功能。

酶工程的主要内容包括酶的生产、酶的改性和酶的应用三大部分。

酶的生产(enzyme production)是通过各种方法获得人们所需的酶的技术过程,酶的生产方法可以分为提取分离法、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原料中将酶提取出来,再与杂质分离而得到所需酶的生产方法,是酶生产中最早采用并沿用至今的方法。在用生物合成法和化学合成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而合成所需的酶的生产方法,是当今在酶的生产中最广泛应用的方法,其基本理论是酶的生物合成及其调节控制理论。

化学合成法是通过化学反应,将各种氨基酸或者核苷酸按照特定的顺序连接起来而得到所需酶的方法,由于要求所使用的氨基酸或者核苷酸单体有很高的纯度,合成过程复杂,成本高,至今仍未能工业化生产。

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。酶改性的基本理论主要是酶的结构及其与催化特性的关系。

酶是具有完整结构的生物大分子,酶的催化特性是由酶的特定的结构所决定的,酶的结构一旦改变,将使酶的特性和功能发生某些改变。

酶具有专一性强、催化效率高、作用条件温和等显著特点。在酶的应用过程中,人们也发现酶具有稳定性较差、酶活力较低、游离酶通常只能使用一次、酶往

往只能在水介质中进行催化等弱点。为了克服酶在使用过程中的不足之处,人们经过不断研究,开发出各种酶的特性改进技术,主要包括酶分子修饰技术、酶固定化技术以及酶非水相催化技术等。近几年来,相继出现的 DNA 重排(DNA shuffling)技术、高通量筛选(high throughput screening)技术,易错 PCR(error-prone PCR)技术等定向进化(directed evolution)技术等新技术,为酶催化特性的进一步改进提供了强有力的手段,进一步推动了酶工程的发展。

酶的应用(enzyme application)是在特定的条件下通过酶的催化作用,获得人们所需的产物、除去不良物质或者获得所需信息的技术过程。

酶应用的基本理论是酶的催化特性以及酶催化作用动力学。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、工业、农业、能源、环保和生物技术等领域广泛应用。在酶的应用过程中,必须选择并设计好酶反应器,控制好酶催化反应的各种条件,使酶充分发挥其催化功能,以达到预期的效果。

本书主要阐述酶的生产与应用的原理与方法,主要内容除了绪论以外,包括三篇十章。第一篇为酶的生产,包括酶生物合成的基本理论——酶的生物合成及其调节、酶的生物合成法生产、酶的提取与分离纯化等三章;第二篇为酶的改性,包括酶改性的基本理论——酶的结构及其与催化功能的关系、酶分子修饰、酶固定化和酶的非水相催化等四章;第三篇为酶的应用,包括酶应用的基本理论——酶的催化特性与反应动力学、酶反应器的应用、酶的应用领域等三章。

本书的第一、二、三、四、五、六、七、十、十一章由郭勇编写,第八、九章由徐岩编写,在编写过程中,得到许多专家、学者的指导和帮助,在此表示衷心的感谢。

本书可供高等院校生物技术、生物工程以及相关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。

编者  
2005年8月

## ► 第2版前言

自从《酶工程原理与技术》2005年由高等教育出版社出版以来,已经在国内高等院校生物技术、生物工程及有关专业广泛使用,取得良好教学效果。在此基础上,编者广泛收集国内外有关酶工程原理与技术的文献资料,根据国内外酶工程的最新进展和发展趋势,结合笔者的教学、科研成果,经过去粗取精、去伪存真的推敲过程,对该书的内容作了较大的修改和补充。

近十几年来,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,酶分子定向进化(enzyme molecule directed evolution)技术已经成为生物科学与工程领域的研究热点之一。酶分子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,通过定向选择获得酶的突变体的技术过程。酶分子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的催化效率、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催化特性的手段。为此,本书新增酶分子定向进化一章,由原来的11章扩展为12章,对其他章节的内容也作了修改和补充。

本书的第一、二、三、四、五、六、七、八、十一、十二章由郭勇编写,第九、十章由徐岩编写,在编写的过程中,得到有关专家、教授的热情关注和帮助,提供了不少的资料和宝贵意见,在此表示衷心感谢。

虽然第2版的内容有较多的更新,但是由于酶工程原理与技术发展迅速,新理论、新技术不断涌现,加上笔者水平所限,不当之处诚请读者批评指正。

主 编

2010年2月于广州

## 郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

**反盗版举报电话：**(010) 58581897/58581896/58581879

**反盗版举报传真：**(010) 82086060

**E-mail：**dd@hep.com.cn

**通信地址：**北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

**邮 编：**100120

**购书请拨打电话：**(010)58581118

# 目 录

第一章 绪论 .....	1
第一节 酶的基本概念与发展历史 .....	1
第二节 酶的分类与命名 .....	3
第三节 酶的活力测定 .....	8
第四节 酶工程发展概况与前景 .....	11

## 第一篇 酶的生产

第二章 酶生物合成的基本理论——酶的生物合成及其调节 .....	17
第一节 RNA的生物合成——转录 .....	17
第二节 蛋白质的生物合成——翻译 .....	22
第三节 酶生物合成的调节 .....	28
第三章 酶的生物合成法生产 .....	36
第一节 产酶细胞的选择 .....	36
第二节 培养基的配制 .....	39
第三节 产酶工艺条件及其控制 .....	45
第四节 微生物发酵产酶 .....	49
第五节 植物细胞培养产酶 .....	64
第六节 动物细胞培养产酶 .....	67
第四章 酶的提取与分离纯化 .....	72
第一节 细胞破碎 .....	72
第二节 提取 .....	75
第三节 沉淀分离 .....	77
第四节 离心分离 .....	81
第五节 过滤与膜分离 .....	85
第六节 层析分离 .....	89
第七节 电泳分离 .....	101
第八节 萃取分离 .....	108
第九节 结晶 .....	114
第十节 浓缩与干燥 .....	115

## 第二篇 酶的改性

第五章 酶改性的基本理论——酶的结构及其与催化特性的关系 .....	121
第一节 酶的化学组成 .....	121



第二节 酶的化学结构 .....	126	<b>第八章 酶固定化</b> .....	174
第三节 酶的空间结构 .....	129	第一节 固定化方法 .....	175
第四节 酶的活性中心 .....	135	第二节 固定化酶的特性 .....	182
第五节 酶的结构与催化特性的关系 .....	137	第三节 固定化技术的应用 .....	183
<b>第六章 酶分子修饰</b> .....	140	<b>第九章 酶非水相催化</b> .....	195
第一节 酶分子的主链修饰 .....	140	第一节 酶非水相催化的研究概况 .....	195
第二节 酶分子的侧链基团修饰 .....	143	第二节 水对非水相介质中酶催化的影响 .....	196
第三节 酶的组成单位置换修饰 .....	151	第三节 非水相中酶催化的特性 .....	201
第四节 金属离子置换修饰 .....	154	第四节 非水相中酶催化反应的条件及其控制 .....	206
第五节 酶分子的物理修饰 .....	155	第五节 超临界流体中的酶催化反应 .....	216
<b>第七章 酶分子定向进化</b> .....	157	第六节 离子液中的酶催化反应 .....	218
第一节 酶基因的体外随机突变 .....	158		
第二节 酶突变基因的定向选择 .....	163		
第三节 酶分子定向进化的应用 .....	170		

### 第三篇 酶的应用

<b>第十章 酶应用的基本理论——酶的催化特性与反应动力学</b> .....	225	<b>第十二章 酶在各领域的应用</b> .....	266
第一节 酶的催化特性 .....	225	第一节 酶在医药领域的应用 .....	266
第二节 酶反应动力学 .....	231	第二节 酶在食品领域的应用 .....	281
<b>第十一章 酶反应器的应用</b> .....	248	第三节 酶在工业领域的应用 .....	292
第一节 酶反应器的分类与选型 .....	249	第四节 酶在农业领域的应用 .....	297
第二节 酶反应器的设计与应用 .....	258	第五节 酶在环保、能源领域的应用 .....	298
		第六节 酶在生物技术领域的应用 .....	301
<b>主要参考书目</b> .....	308		
<b>中英文名词对照</b> .....	309		
<b>索引</b> .....	316		

# 第一章 绪论

酶(enzyme)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不同,酶可以分为蛋白类酶(proteozyme, protein enzyme)和核酸类酶(ribozyme, RNA enzyme)两大类。分子中起催化作用的主要组分为蛋白质的酶称为蛋白类酶,分子中起催化作用的主要组分为核糖核酸的酶称为核酸类酶,也称核酶。

各种微生物、动物、植物细胞在适宜的条件下都可以合成多种多样的酶,因此,可以通过各种方法选育得到优良的细胞,在人工控制条件的生物反应器中进行生产,而获得各种所需的酶。

酶是具有特定结构的生物大分子,酶结构的改变将引起酶的某些催化特性的改变。通过各种方法改进酶的催化特性的技术过程,称为酶的改性(enzyme improving)。经过改性,可以提高酶的催化效率、增强酶的稳定性、改变酶的底物特异性、降低抗原性、改变选择性等,更有利于酶的应用。

在适宜的条件下,酶不仅在生物体内,而且在生物体外也可以催化各种生化反应。因此,可以根据酶的催化特性和酶反应动力学的理论,将酶广泛应用于医药、食品、工业、农业、环保、能源和生物技术等各个领域。

酶的生产与应用的技术过程称为酶工程(enzyme engineering)。

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充分发挥其催化功能(catalytic function)。

酶工程的主要内容包括酶的生产(enzyme production)、酶的提取(enzyme extraction)与分离(isolation)纯化(purification)、酶分子修饰(enzyme molecule modification)、酶分子定向进化(enzyme molecule directed evolution)、酶固定化(enzyme immobilization)、酶非水相催化(enzyme catalysis in non-aqueous phase)、酶反应器(enzyme reactor)、酶的应用(enzyme application)等。

## 第一节 酶的基本概念与发展历史

人们对酶的催化作用和化学本质等基本概念的认识,是在长期的生产活动和科学研究中逐步发展的。

我国是文明古国,我们的祖先在几千年前就已经在食品生产和疾病治疗等领域不自觉地利用酶,例如,在夏禹时代就已经掌握了酿酒技术,在周朝就会制造饴糖、食酱等食品,在春秋战国时期就懂得用麴来治疗消化不良等。我们的祖先不但创造了“酶”这个汉字,而且给出了明确的定义“酶者,酒母也”,说明对酶

已经有了初步的认识。

然而,直到19世纪30年代,人们才开始认识酶的存在和作用。一百多年来,人们对酶基本概念的认识经历了一个不断发展、逐步深入的过程。

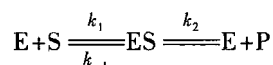
1833年,佩恩(Payen)和帕索兹(Persoz)从麦芽的水抽提物中用酒精沉淀得到一种可使淀粉水解生成可溶性糖的物质,称之为淀粉酶(diastrase),并指出了它的热不稳定性,初步触及了酶的一些本质问题。在此后近100年中,人们认识到“酶是生物体产生的具有生物催化功能的物质”,但是尚未搞清楚究竟是什么物质。

19世纪50年代,巴斯德(Pasteur)用酵母进行酒精发酵的研究,认识到在活酵母细胞内有一种可以将糖发酵生成酒精的物质。1878年库尼(Kühne)首次将酵母中进行酒精发酵的物质称为酶(enzyme),这个词来自希腊文,其意思是“在酵母中”。

1896年,巴克纳(Buchner)兄弟的研究结果表明,将酵母细胞破坏后获得的无细胞抽提液也能将糖发酵成酒精。这就表明酶在细胞外也可以在一定的条件下进行催化。

其后,不少科技工作者对酶的催化特性和催化作用理论进行了广泛的研究,其中,亨利(Henri)和米彻利斯(Michaelis)等人作出了卓越的贡献。

1902年,亨利根据蔗糖酶催化蔗糖水解的实验结果,提出中间产物学说,他认为底物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:

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

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,为此,萨姆纳获得1946年度的诺贝尔化学奖。在此后的50多年中,对一系列酶的研究,都证实酶的化学本质是蛋白质,于是人们普遍接受“酶是具有生物催化功能的蛋白质”这一概念。

1982年,切克(Cech)等人发现四膜虫(*Tetrahymena*)细胞的26S rRNA前体具有自我剪接功能(self-splicing),表明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(Altman)等人发现核糖核酸酶P(RNase P)的RNA部分(M1 RNA)具有核糖核酸酶P的催化活性,而该酶的蛋白质部分(C<sub>5</sub>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,被认为是最近二十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多年来的研究表明,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,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,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。由此引出酶的新概念,即“酶是具有生物催化功能的生物大分子”。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 酶的分类与命名

酶有蛋白类酶和核酸类酶两大类别,数量已达几千种。为了准确地识别某一种酶,以免发生混乱或误解,要求每一种酶都有准确的名称和明确的分类,为此,必须掌握酶的分类(enzyme classification)和酶的命名(enzyme nomenclature)原则。

蛋白类酶和核酸类酶的分类与命名的总原则是相同的,都是根据酶的作用底物(substrate)和催化反应的类型(reaction type)进行分类和命名。

由于蛋白类酶和核酸类酶具有不同的结构和催化特性,所以各自的分类和命名又有所区别,两者分类与命名的显著区别之一是蛋白类酶只能催化其它分子进行反应,而核酸类酶却可以催化酶分子本身也可以催化其它分子进行反应,由此,在核酸类酶的分类中出现了分子内催化核酸类酶、分子间催化核酸类酶、自我剪切酶、自我剪接酶等名称,这在蛋白类酶中是没有的。

现把酶的分类归纳如图 1-1 所示。

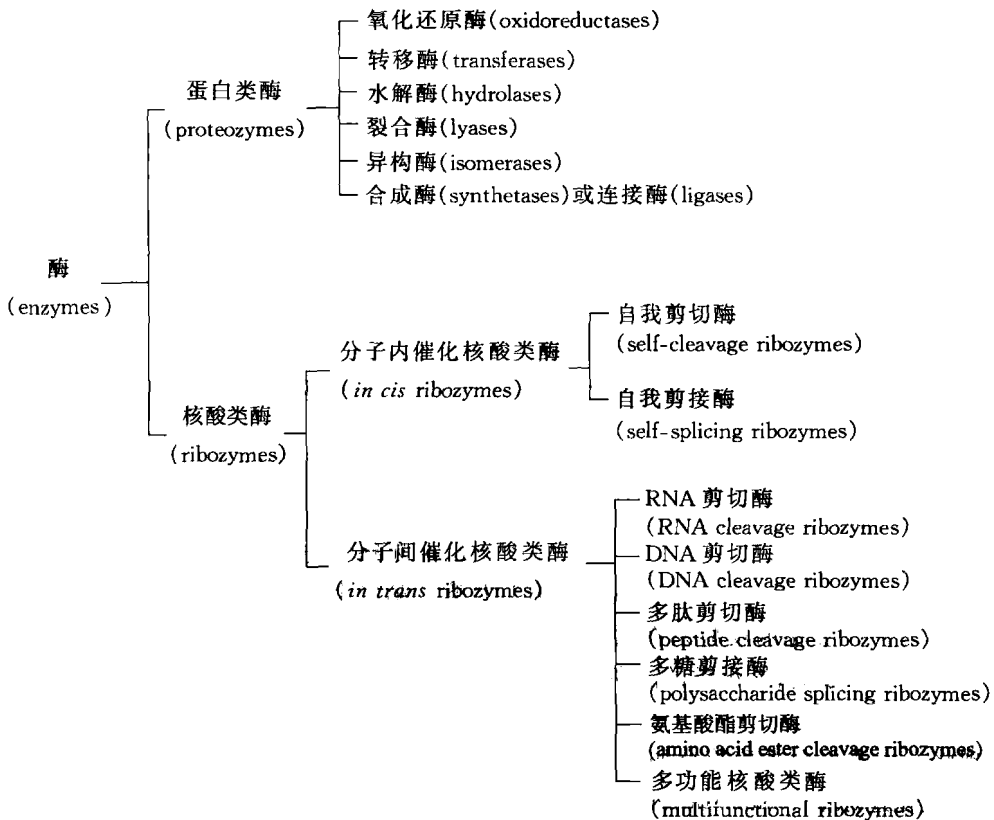


图 1-1 酶的分类

## 一、蛋白类酶的分类与命名

对于蛋白类酶的分类和命名,国际酶学委员会(International Commission on Enzymes, Enzyme Commission)于1961年提出了酶的分类与命名方案,此后不断得到补充和完善。

根据国际酶学委员会的建议,每一种具体的酶都有其推荐名和系统命名。

酶的推荐名一般由两部分组成:第一部分为底物名称,第二部分为催化反应的类型。后面加一个“酶”字(-ase)。不管酶催化的反应是正反应还是逆反应,都用同一个名称。例如,葡萄糖氧化酶(glucose oxidase),表明该酶的作用底物是葡萄糖,催化的反应类型属于氧化反应。

对于水解酶类,其催化的为水解反应,在命名时可以省去说明反应类型的“水解”字样,只在底物名称之后加上“酶”字即可。例如,淀粉酶、蛋白酶、乙酰胆碱酶等,必要时还可以再加上酶的来源或其特性,例如,木瓜蛋白酶、酸性磷酸酶等。

酶的系统名称(systematic name)包括了酶的作用底物、酶作用的基团及催化反应的类型。例如,上述葡萄糖氧化酶(即葡糖氧化酶)的系统命名为“ $\beta$ -D-葡萄糖:氧1-氧化还原酶”( $\beta$ -D-glucose:oxygen 1-oxidoreductase)。表明该酶所催化的反应以 $\beta$ -D-葡萄糖为脱氢的供体,氧为氢受体,催化作用在第一个碳原子基团上进行,所催化的反应属于氧化还原反应,是一种氧化还原酶。

蛋白类酶的分类原则为:

(1) 按照酶催化作用的类型,将蛋白类酶分为6大类。即第1大类,氧化还原酶;第2大类,转移酶;第3大类,水解酶;第4大类,裂合酶;第5大类,异构酶;第6大类,合成酶或连接酶。

(2) 每个大类中,按照酶作用的底物、化学键或基团的不同,分为若干亚类。

(3) 每一亚类中再分为若干小类。

(4) 每一小类中包含若干个具体的酶。

根据系统命名法,每一种具体的酶,除了有一个系统名称以外,还有一个系统编号。系统编号采用四码编号方法。第一个号码表示该酶属于6大类酶中的某一大类,第二个号码表示该酶属于该大类中的某一亚类,第三个号码表示属于亚类中的某一小类,第四个号码表示这一具体的酶在该小类中的序号。每个号码之间用圆点(.)分开。例如,上述葡萄糖氧化酶的系统编号为[EC 1.1.3.4]。其中,EC表示国际酶学委员会(Enzyme Commission),第一个号码“1”表示该酶属于氧化还原酶(第1大类),第二个号码“1”表示属氧化还原酶的第1亚类,该亚类所催化的反应系在供体的CH—OH基团上进行,第三个号码“3”表示该酶属第1亚类的第3小类,该小类的酶所催化的反应是以氧为氢受体,第四个号码“4”表示该酶在小类中的特定序号。

现将6大类蛋白类酶简介如下:

### 1. 氧化还原酶(oxidoreductase)

氧化还原酶是催化氧化还原反应的一类酶,其催化反应通式为:



被氧化的底物( $\text{AH}_2$ )为氢或电子供体,被还原的底物(B)为氢或电子受体。

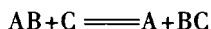
氧化还原酶系统命名时,将供体写在前面,受体写在后面,然后再加上氧化还原酶字样,

如醇:  $\text{NAD}^+$  氧化还原酶, 表明其氢供体是醇, 氢受体是  $\text{NAD}^+$ 。

氧化还原酶的推荐名采用“某供体脱氢酶”, 如谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase); 或“某受体还原酶”, 如硝酸还原酶 (nitrate reductase); 以氧作氢受体时, 则用“某受体氧化酶”的名称, 如胆固醇氧化酶 (cholesterol oxidase) 等。

## 2. 转移酶 (transferase)

转移酶是催化某基团从供体化合物转移到受体化合物上的一类酶, 其反应通式为:

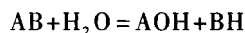


转移酶的系统命名是“供体: 受体某基团转移酶”, 例如, L-天冬氨酸: 2-酮戊二酸氨基转移酶, 表明该酶催化氨基从 L-天冬氨酸转移到 2-酮戊二酸。

转移酶的推荐名为“受体(或供体)某基团转移酶, 例如, 天冬氨酸氨基转移酶 (L-天冬氨酸 + 2-酮戊二酸  $\rightleftharpoons$  草酰乙酸 + L-谷氨酸) 等。

## 3. 水解酶 (hydrolase)

水解酶是催化各种化合物进行水解反应的一类酶, 其反应通式为:

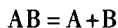


水解酶的系统命名是先写底物名称, 再写发生水解作用的化学键位置, 后面加上“水解酶”, 例如, 5'-核苷酸磷酸水解酶, 表明该酶催化反应的底物是 5'-核苷酸, 水解反应发生在磷酸酯键上。

水解酶的推荐名则在底物名称的后面加上一个酶字, 如 5'-核苷酸酶 (5'-核苷酸 +  $\text{H}_2\text{O}$   $\rightleftharpoons$  核苷 +  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 等。

## 4. 裂合酶 (lyase)

裂合酶是催化一个化合物裂解成为两个较小的化合物及其逆反应的一类酶, 其反应通式为:



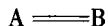
一般裂合酶在裂解反应方向只有一个底物, 而在缩合反应方向却有两个底物。催化底物裂解为产物后, 产生一个双键。

裂合酶的系统命名为“底物-裂解的基团-裂合酶”, 如草酸羧基-裂合酶 (推荐名为草酸脱羧酶), 表明该酶催化草酸在羧基位置发生裂解反应。

裂合酶的推荐名是在裂解底物名称后面加上“脱羧酶” (decarboxylase)、“醛缩酶” (aldolase)、“脱水酶” (dehydratase) 等, 在缩合反应方向更为重要时, 则用“合酶” (synthase) 这一名称, 如草酸脱羧酶 (草酸  $\rightleftharpoons$  甲酸 +  $\text{CO}_2$ )、苏氨酸醛缩酶 (L-苏氨酸  $\rightleftharpoons$  甘氨酸 + 乙醛)、丙二醇脱水酶 (丙二醇  $\rightleftharpoons$  丙醛 + 水)、乙酰乳酸合酶 (2-乙酰乳酸 +  $\text{CO}_2$   $\rightleftharpoons$  2-丙酮酸)。

## 5. 异构酶 (isomerase)

异构酶是催化分子内部基团位置或构象的转换的一类酶, 其反应通式为:



异构酶按照异构化的类型不同, 分为 6 个亚类。命名时分别在底物名称的后面加上异构酶 (isomerase)、消旋酶 (racemase)、变位酶 (mutase)、差向异构酶 (epimerase)、顺反异构酶 (cis-trans-isomerase) 等。例如, 葡萄糖异构酶 (D-葡萄糖  $\rightleftharpoons$  D-果糖), 丙氨酸消旋酶 (L-丙氨酸  $\rightleftharpoons$  D-丙氨酸), 磷酸甘油酸磷酸变位酶 (2-磷酸-D-甘油酸  $\rightleftharpoons$  3-磷酸-D-甘油酸)。

酸), 醛糖-1-差向异构酶( $\alpha$ -D-葡萄糖 $\rightleftharpoons$  $\beta$ -D-葡萄糖), 顺丁烯二酸顺反异构酶(顺丁烯二酸 $\rightleftharpoons$ 反丁烯二酸)等。

#### 6. 连接酶(ligase)或合成酶(synthetase)

连接酶是伴随着 ATP 等核苷三磷酸的水解, 催化两个分子进行连接反应的酶, 其反应通式为:



连接酶的系统命名是在两个底物的名称后面加上“连接酶”, 如天冬氨酸: 氨连接酶(推荐名为天冬酰胺合成酶)(L-天冬氨酸+氨+ATP $\rightleftharpoons$ L-天冬酰胺+ADP+Pi)。

连接酶的推荐名则是在合成产物名称之后加上“合成酶”, 如谷氨酰胺合成酶(L-谷氨酸+氨+ATP $\rightleftharpoons$ L-谷氨酰胺+AMP+Pi)。

## 二、核酸类酶(R 酶)的分类

核酸类酶的分类和命名还没有统一的原则和规定, 通常可以按照酶的作用底物、酶催化反应的类型和酶的结构特点的不同进行分类。

根据酶催化的底物是其本身 RNA 分子还是其它分子, 可以将核酸类酶分为分子内催化(*in cis*, 也称为自我催化)和分子间催化(*in trans*)两类。

根据酶催化反应的类型, 可以将核酸类酶分为剪切酶、剪接酶和多功能酶等三类。

根据核酸类酶的结构特点不同, 可分为锤头形核酸类酶、发夹形核酸类酶、含 I 型 IVS 的核酸类酶、含 II 型 IVS 的核酸类酶等。

本书对核酸类酶采用下列分类原则:

① 根据酶作用的底物是其本身 RNA 分子还是其它分子, 将核酸类酶分为分子内催化核酸类酶和分子间催化核酸类酶两大类。

② 在每个大类中, 根据酶的催化类型不同, 将核酸类酶分为若干亚类。据此, 分子内催化的核酸类酶分为自我剪切酶、自我剪接酶两个亚类; 分子间催化的核酸类酶可以分为 RNA 剪切酶、DNA 剪切酶、氨基酸酯剪切酶、多肽剪切酶、多糖剪接酶等亚类。

现根据现有资料, 将核酸类酶的初步分类简介如下:

### 1. 分子内催化核酸类酶

分子内催化核酸类酶是指催化本身 RNA 分子进行反应的一类核酸类酶。由于这类核酸类酶是催化分子内反应, 所以冠以“自我”(self)字样。

该大类酶包括自我剪切酶和自我剪接酶两个亚类。

(1) 自我剪切酶(self-cleavage ribozyme): 是在一定条件下催化本身 RNA 分子进行剪切反应的核酸类酶。它们都是 RNA 的前体, 可以在一定条件下进行自我催化使 RNA 前体生成成熟的 RNA 分子和另一个 RNA 片段。

1984 年, 阿比利安(Apirion)发现 T4 噬菌体 RNA 前体是一种自我剪切酶, 可以将含有 215 个核苷酸(nt)的 RNA 前体自我剪切成为含 139 个核苷酸的成熟 RNA 和另一个 76 个核苷酸的片段。

此外, 丁型肝炎病毒(HDV) RNA 前体、链孢霉线粒体 RNA 前体、紫花苜蓿条纹病毒(vLTSV)的正链和负链 RNA 前体、烟草环斑病毒(sTRSV) RNA 前体、鳄梨白斑病类病毒(ASEV) RNA 前体等均属于自我剪切酶。

(2) 自我剪接酶(self-splicing ribozyme):是在一定条件下催化本身 RNA 分子同时进行剪切和连接反应的核酸类酶。

自我剪接酶都是 RNA 前体,它可以同时催化 RNA 前体本身的剪切和连接两种类型的反应。根据其结构特点和催化特性的不同,自我剪接酶又可以分为含 I 型 IVS 的核酸类酶和含 II 型 IVS 的核酸类酶。

I 型 IVS 均与四膜虫 rRNA 前体的间隔系列(IVS)的结构相似,在催化 rRNA 前体的自我剪接时,需要鸟苷(或 5'-鸟苷酸)及镁离子( $Mg^{2+}$ )参与。

II 型 IVS 则与细胞核 mRNA 前体的 IVS 相似,在催化 mRNA 前体的自我剪接时,需要镁离子参与,但不需要鸟苷或鸟苷酸。

举例如表 1-1。

表 1-1 一些自我剪接酶的结构特点和催化特性

核酸类酶	鸟苷或 5'-鸟苷酸	$Mg^{2+}$	环状结构	套环结构
四膜虫 26S rRNA 前体	+	+	+	
红色面包霉菌细胞色素 b mRNA 前体	+	+	+	
酵母核糖体大亚基 rRNA 前体	+	+	+	
酵母细胞色素 b mRNA 前体	+	+	+	
大肠杆菌 T4 噬菌体 dTMP 合成酶 mRNA 前体	+	+	+	
酵母核糖体大亚基 rRNA 前体	+	+	+	
酵母脱辅基细胞色素 b mRNA 前体		+		+
酵母细胞色素氧化酶 mRNA 前体		+		+
酵母细胞色素 c 氧化酶 mRNA 前体		+		+

## 2. 分子间催化核酸类酶

分子间催化核酸类酶是催化其它分子进行反应的核酸类酶。根据所作用的底物分子的不同,可以分为如下若干亚类:

(1) RNA 剪切酶(RNA cleavage ribozyme):是催化其它 RNA 分子进行剪切反应的核酸类酶。例如,1983 年,S. Altman 发现大肠杆菌核糖核酸酶 P(RNase P)的核酸组分 M1 RNA 在高浓度镁离子存在的条件下,可催化 tRNA 前体的剪切反应,除去部分 RNA 片段,而成为成熟的 tRNA 分子。许多原核生物的核糖核酸酶 P 中的 RNA(RNase P-RNA)也具有剪切 tRNA 前体,生成成熟 tRNA 的功能。

(2) DNA 剪切酶(DNA cleavage ribozyme):是催化 DNA 分子进行剪切反应的核酸类酶。1990 年,发现核酸类酶除了以 RNA 为底物以外,有些核酸类酶还可以 DNA 为底物,在一定条件下催化 DNA 分子进行剪切反应。

(3) 多肽剪切酶(polypeptide cleavage ribozyme):是 1992 年发现的催化多肽的剪接作用的核酸类酶。

(4) 多糖剪接酶(polysaccharide splicing ribozyme):是催化多糖分子进行剪切和连接反



应的核酸类酶。例如,兔肌 1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖分支酶[ EC 2.4.1.18 ]是一种催化直链葡聚糖转化为支链葡聚糖的糖链转移酶,分子中含有蛋白质和 RNA。其 RNA 组分由 31 个核苷酸组成,单独具有分支酶的催化功能,即该 RNA 可以催化糖链的剪切和连接反应。

(5) 多功能核酸类酶(multifunctional ribozyme):是催化其它分子进行多种反应的核酸类酶。例如,L-19 IVS 是一种多功能核酸类酶,能够催化其它 RNA 分子进行下列多种类型的反应:

RNA 剪接作用:  $2 \text{ CpCpCpCpC} \rightleftharpoons \text{CpCpCpCpCpC} + \text{CpCpCpC}$

末端剪切作用:  $\text{CpCpCpCpC} \rightleftharpoons \text{CpCpCpC} + \text{Cp}$

限制性内切作用:  $\cdots \text{CpUpCpUpCpN} \cdots \rightleftharpoons \cdots \text{CpUpCpUp} + \text{GpN} \cdots$

转磷酸作用:  $\text{CpCpCpCpCpCp} + \text{UpCpU} \rightleftharpoons \text{CpCpCpCpCpC} + \text{UpCpUp}$

去磷酸作用:  $\text{CpCpCpCpCpCp} \rightleftharpoons \text{CpCpCpCpCpC} + \text{Pi}$

由于蛋白类酶和核酸类酶的组成和结构不同,命名和分类原则也有所区别。有时两大类别的酶催化的反应类型相同或相似,为了便于区分而命以不同的名称,例如催化大分子水解生成较小分子的酶,在核酸类酶中的属于剪切酶,在蛋白类酶中则属于水解酶。

### 第三节 酶的活力测定

酶的活力测定是采用各种检测手段,确定酶量多少的技术过程,是酶的研究、生产和应用过程中不可缺少的环节。

酶活力(enzyme activity)的大小可以用一定条件下酶所催化的反应初速率表示。在外界条件相同的情况下,反应速率越大,意味着酶活力越高。

酶催化反应速率,通常用单位时间( $t$ )内底物(S)的减少量或产物(P)的增加量表示,即:

$$v = - \frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

#### 一、酶活力测定方法

酶活力测定的方法有化学测定法、光学测定法、气体测定法等。不管采用哪一种方法对酶活力进行测定,其总的要求是快速、简便、准确。

酶活力测定通常包括两个阶段:第一阶段是将酶与反应底物混合均匀,在一定条件下反应一段时间;第二阶段是测定反应液中底物或产物的变化量。

酶活力测定的基本步骤如下:

1. 根据酶催化的专一性,选择适宜的底物,并配制成一定浓度的底物溶液。所使用的底物必须均匀一致,达到酶催化反应所要求的纯度。在测定酶活力时,所使用的底物溶液一般要求新鲜配制,有些反应所需的底物溶液也可预先配制后置于冰箱保存备用。

2. 根据酶的动力学性质,确定酶催化反应的温度、pH、底物浓度、激活剂浓度等反应条件。温度可以选择在室温(25℃)、体温(37℃)、酶反应最适温度或其它选用的温度;pH 应是酶催化反应的最适 pH;底物浓度应该大于  $5K_m$  等。反应条件一旦确定,在整个反应过程中应尽量保持恒定不变。故此,反应应该在恒温槽中进行,pH 的保持恒定需采用一定浓度