

现代生物制药

工艺技术、质量监控、新药开发与制药设备
实务全书



现代生物制药工艺技术、质量监控、 新药开发与制药设备实务全书

金 雨 李康群 主编

第二册

当代中国音像出版社

第四篇

酶工程制药工艺技术

第一章 酶工程制药基础

第一节 酶的分类、组成、结构特点和作用机制

一、酶的分类

1961年国际生化联合会酶学委员会提出将酶分成6类。许多酶是由它的底物名称加上后缀“-ase”命名。因此脲酶(urease)是催化尿素(urea)水解的酶。果糖-1,6-二磷酸酶(fructose-1,6-diphosphatase)是水解果糖-1,6-二磷酸的酶。然而,有些酶(如胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶)的命名并未表示它的底物名称。有些酶有多种不同的名称。为了使酶的名称合理,国际上已公认一种酶的命名(enzyme nomenclature)系统,这个系统将所有的酶根据其反应催化的类型安置到6种主要类型的某一种中(表4-1-1)。此外每种酶各有一个独自的4个数字的分类编号,例如胰蛋白酶有一由国际生化联合会酶委员会公布的酶分类(用EC标示)编号为3.4.21.4,这里第一个数字“3”表示它是水解酶;第二个数字“4”表示它是蛋白酶水解肽键;第三个数字“21”表示它是丝氨酸蛋白酶,在活性部位上有一至关重要的丝氨酸残基;第四个数字“4”表示它是这一类型中被指认的第四个酶。作为对照,胰凝乳蛋白酶的EC编号为3.4.21.1;弹性蛋白酶编号为3.4.21.36。

表 4-1-1 酶的国际分类

分类	名称	反应催化的类型		实例
1	氧化还原酶	电子的转移	$A^- + B \rightarrow A + B^-$	醇脱氢酶

分类	名称	反应催化的类型		实例
2	转移酶	转移功能基团	$A-B + C \rightarrow A + B-C$	己糖激酶
3	水解酶	水解反应	$A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$	胰蛋白酶
4	裂合酶	键的断裂通常形成双键	$\begin{array}{c} A-B \rightarrow A=B + X-Y \\ \quad \\ X \quad Y \end{array}$	丙酮酸脱羧酶
5	异构酶	分子内基团的转移	$\begin{array}{c} A-B \rightarrow A-B \\ \quad \quad \quad \\ X \quad Y \quad Y \quad X \end{array}$	顺丁烯二酸异构酶
6	连接酶 或合成酶	键形成与 ATP 水解偶联	$A + B \rightarrow A-B$	丙酮酸羧化酶

1. 氧化还原酶 在体内参与产能、解毒和某些生理活性物质的合成。重要的有各种脱氢酶、氧化酶、过氧化物酶、氧合酶、细胞色素氧化酶等。

2. 转移酶 在体内将某基团从一个化合物转移到另一化合物,参与核酸、蛋白质、糖及脂肪的代谢和合成。重要的有一碳基转移酶、酮醛基转移酶、酰基转移酶、糖苷基转移酶、含氨基转移酶、磷酸基转移酶、含硫基团转移酶等。

3. 水解酶 在体内外起降解作用,也是人类应用最广的酶类。重要的有各种脂肪酶、糖苷酶、肽酶等。水解酶一般不需辅酶。

4. 裂合酶 这类酶可脱去底物上某一基团而留下双键,或可相反地在双键处加入某一基团。它们分别催化 C—C、C—O、C—N、C—S、C—X(F, Cl, Br, I)和 P—O 键。

5. 异构酶 此类酶为生物代谢需要而对某些物质进行分子异构化,分别进行外消旋、差向异构、顺反异构、醛酮异构、分子内转移、分子内裂解等。

6. 连接酶 (合成酶)这类酶关系很多生命物质的合成,其特点是需要三磷酸腺苷等高能磷酸酯作为结合能源,有的还需金属离子辅助因子。分别形成 C—O 键(与蛋白质合成有关)、C—S 键(与脂肪酸合成有关)、C—C 键和磷酸酯键。

二、酶的组成和结构特点

虽然少数有催化活性的 RNA 分子已经鉴定,但几乎所有的酶都是蛋白质,因而酶必然有四级空间结构形式,其中一级结构是指具有一定氨基酸顺序的多肽链的共价骨架,二级结构为在一级结构中相近的氨基酸残基间由氢键的相互作用而形成的带有螺旋、折叠、转角、卷曲等细微结构,三级结构系在二级结构基础上进一步进行分子盘曲以形成包括主侧链的专一性三维排列,四级结构是指低聚蛋白中各折叠多肽链在空间的专一性三维排列。具有低聚蛋白结构的酶(寡聚酶)必须具有正确的四级结构才有活性。具有活性的酶都是球蛋白,即被广泛折叠、结构紧密的多肽链,其氨基酸亲水基团在外表,而疏水基团向内。酶蛋白有 3 种组成形式:①单体酶,仅有一个活性部位的多肽链构成的酶,

分子质量为 13 ~ 35ku, 为数不多, 且都是水解酶; ②寡聚酶, 由若干相同或不同亚基结合而组成的酶, 亚基一般无活性, 必须相互结合才有活性, 分子质量为 35ku 以上到数百万单位; ③多酶复合体, 指多种酶进行连续反应的体系。前一个反应产物为后一反应的底物。仅有少部分酶是由单一蛋白质所组成, 而大部分酶则为复合蛋白质, 或称全酶, 是由蛋白质部分(酶蛋白)和非蛋白质部分所组成, 即酶蛋白本身无活性, 需要在辅因子存在下才有活性。辅因子可以是无机离子, 也可以是有机化合物, 它们都属于小分子化合物。有的酶仅需其中一种, 有的酶则二者都需要。约有 25% 的酶含有紧密结合的金属离子或在催化过程中需要金属离子, 包括铁、铜、锌、镁、钙、钾、钠等, 它们在维持酶的活性和完成酶的催化过程中起作用。有机辅因子可依其与酶蛋白结合的程度分为辅酶和辅基。前者为松散结合; 后者为紧密结合, 但有时把它们统称为辅酶。大多数辅酶为核苷酸和维生素或它们的衍生物(表 4-1-2)。它经常是生物体食物的必需成分, 因此当供应不足时, 即引起缺乏性疾病。上述 6 类酶中, 除水解酶和连接酶外, 其他酶在反应时都需要特定的辅酶。

表 4-1-2 某些通用辅酶, 它们的维生素前体和缺乏性疾病

辅酶	前体	缺乏性疾病	辅酶	前体	缺乏性疾病
辅酶 A	泛酸	皮炎	脱氧脂苷	钴胺素(维生素 B ₁₂)	恶性贫血症
FAD, FMN	核黄素(维生素 B ₂)	生长阻滞	胶原中脯氨酸羟化	维生素 C(抗坏血酸)	坏血病
NAD ⁺ , NADP ⁺	烟酸	糙皮病	作用的辅助底物		
焦磷酸硫胺素	硫胺素(维生素 B ₁)	脚气病	磷酸吡哆醛	吡哆醇(维生素 B ₆)	皮炎
四氢叶酸	叶酸	贫血症			

三、酶的作用机制

酶一般是通过其活性中心, 通常是其氨基酸侧链基团先与底物形成一个中间复合物, 然后再分解成产物, 并放出酶。酶的活性部位(active site)是它结合底物并将底物转化为产物的区域, 通常是整个酶分子相当小的一部分, 它是由在线性多肽链中可能相隔很远的氨基酸残基形成的三维实体。活性部位通常在酶的表面空隙或裂缝处, 形成促进底物结合的优越的非极性环境。在活性部位, 底物被多重的、弱的作用力结合(静电相互作用、氢键、范德华键、疏水相互作用), 在某些情况下被可逆的共价键结合。酶结合底物分子, 形成酶-底物复合物(enzyme-substrate complex)。酶活性部位的活性残基与底物分子结合, 首先将它转变为过渡态, 然后生成产物, 释放到溶液中。这时游离的酶与另一分子底物结合, 开始它的又一次循环。

已经提出有两种模型解释酶如何结合它的底物。1894年 Emil Fischer 提出锁和钥匙模型(lock - and - key model),底物的形状和酶的活性部位被认为彼此相适合,像钥匙插入它的锁中[图 4 - 1 - 1(a)],两种形状被认为是刚性的(rigid)和固定的(fixed),当正确组合在一起时,正好互相补充。诱导契合模型(induced - fit model)是 1958 年由 Daniel E. Koshland Jr. 提出的,底物的结合在酶的活性部位诱导出构象变化[图 4 - 1 - 1(b)]。此外,酶可以使底物变形,迫使其构象近似于它的过渡态。例如,葡萄糖与己糖激酶的结合,当葡萄糖刚刚与酶结合后,即诱导酶的结构产生一种构象变化,使活化部位与底物葡萄糖形成互补关系。不同的酶表现出两种不同的模型特征,某些是互补性的,某些是构象变化。

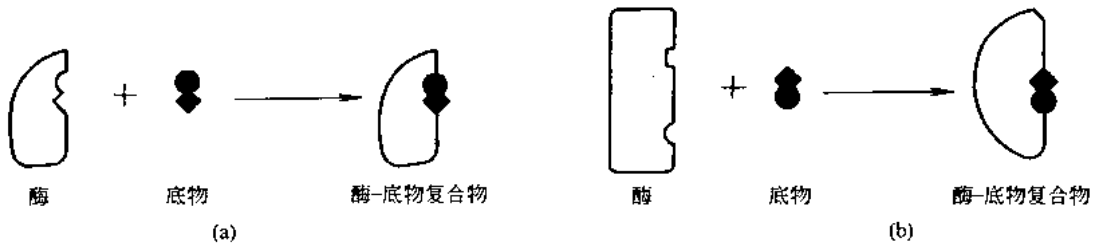


图 4 - 1 - 1 底物与酶的结合

氨基酸残基的性质和空间排布形成酶的活性部位,它决定哪种分子能成为酶的底物与之结合。底物专一性(substrate specificity)通常是由活性部位相关的少数氨基酸的变化所决定,这在 3 种消化酶(即胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶)中可清楚地看到。这 3 种酶属于丝氨酸蛋白酶(serine proteases)家族。“丝氨酸”的含义是因为它们在酶活性部位上有一个丝氨酸残基,它在催化进程中是至关重要的。“蛋白酶”的含义是它们催化蛋白质的肽键使之水解。3 种酶都断裂蛋白质底物的肽键,作用在某些氨基酸残基的羧基端。

胰蛋白酶切断带正电荷的 Lys(赖氨酸)或 Arg(精氨酸)残基的羧基侧,胰凝乳蛋白酶切断庞大的芳香的和疏水氨基酸残基的羧基侧,弹性蛋白酶切断具有小的、不带电荷侧链残基的羧基侧。它们不同的专一性由它们的底物 - 结合部位中氨基酸基团的性质所决定,它们与其作用的底物互补。如胰蛋白酶在它的底物 - 结合部位有带负电荷的 Asp(天冬氨酸)残基,它与底物侧链上带正电荷的 Lys 和 Arg 相互作用[图 4 - 1 - 2(a)]。胰凝乳蛋白酶在它的底物结合部位有带小侧链的氨基酸残基[如 Gly(甘氨酸)和 Ser(丝氨酸)],使底物的庞大侧链得以进入[图 4 - 1 - 2(b)]。相反,弹性蛋白酶有相对大的 Val(缬氨酸)和 Thr(苏氨酸)不带电荷的氨基酸侧链,凸出在它的底物结合部位中,阻止了除 Gly 和 Ala(丙氨酸)小侧链以外的所有其他氨基酸[4 - 1 - 2 图(c)]。

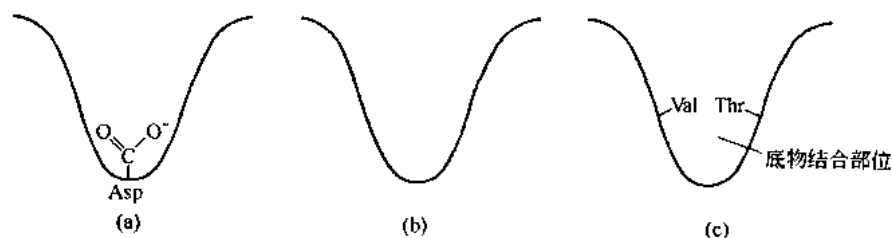


图 4-1-2 丝氨酸蛋白酶底物-结合部位的图形

(a)胰蛋白酶;(b)胰凝乳蛋白酶;(c)弹性蛋白酶

研究酶的催化作用,一般采用两种方法。一种方法是从非酶系统模式获得催化作用规律,其优点是反应简单,易于探究,而其缺点是非酶系统与酶系统不同,其实验结果不一定完全适合于阐明酶的催化作用。另一种方法是从酶的结构与功能研究中得到催化作用机理的证据。

根据两种方法的研究结果,据现在所知,酶的催化作用可能来自 5 个方面,即广义的酸碱催化、共价催化、邻近效应及定向效应、变形或张力以及活性中心为疏水区域。

1. 广义的酸碱催化

在酶反应中起到催化作用的酸与碱,在化学上应与非酶反应中酸与碱的催化作用相同。酸与碱,在狭义上常指能离解 H^+ 与 OH^- 的化合物。狭义的酸碱催化剂即是 H^+ 与 OH^- 。广义的酸碱是指能供给质子(H^+)与接受质子的物质。例如 $HA = A^- + H^+$ 。在狭义上 HA 是酸,因为它能离解 H^+ ,但在广义上,HA 也为酸,是由于它供给质子。在狭义上, A^- 既不是酸,也不是碱,但在广义上,它能接受质子,因此它就是碱。由此可见,在广义上酸与碱可以存在成相关的或共轭的对,如 CH_3COOH 为共轭酸,而 CH_3COO^- 则为共轭碱。

虽然酸离解时释放 H^+ ,但是 H^+ 是质子,实际上在水溶液中不会自由存在的。它常与溶剂结合成水化质子,即 H_3O^+ 。不过,在一般情况下,为了方便起见,仍把 H_3O^+ 看成 H^+ 。

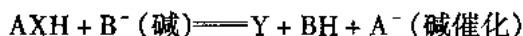
在酸的催化反应中, H^+ 与反应物结合。其结合物更有反应性,因而反应速度大为加快。



式中,X、Y 泛指两种不同的化合物。

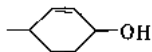
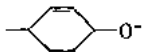
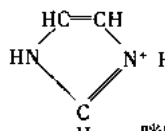
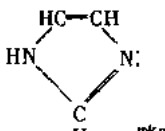
依同理,当碱为催化剂时,从反应物移去 H^+ ,反应速度也大为加快。许多反应中既受酸的催化,也受碱的催化,即是在反应中有质子的供给,也有质子的减移,例如 X 转变

为 Y 的反应主要靠酸与碱的催化。



酸碱催化剂是催化有机反应中普遍、有效的催化剂。它们在酶反应中的协调一致可能起到特别重要的作用。由于生物体内酸碱度偏于中性,在酶反应中起到催化作用的酸碱不是狭义的酸碱,而是广义的酸碱。在酶蛋白中可以作为广义酸碱的功能基团见表 4-1-3。

表 4-1-3 酶蛋白中作为广义酸碱功能基团

质子供体(广义酸)	质子受体(广义碱)	质子供体(广义酸)	质子受体(广义碱)
$-\text{COOH}$ $-\text{NH}_3^+$ 	$-\text{COO}^-$ $-\text{NH}_2$ 	$-\text{SH}$  咪唑基(酸)	$-\text{S}^-$  咪唑基(碱)

在所有的广义酸碱的功能基团中以组氨酸的咪唑基特别重要,其理由有以下两点:一是咪唑基在中性溶液条件下有一半以质子供体(广义酸)形式存在,另一半以质子受体(广义碱)形式存在。它可在酶的催化反应中发挥重要作用;二是咪唑基供给质子或接受质子的速度十分迅速,而且两者的速度几乎相等,因此咪唑基是酶的催化反应中最有效、最活泼的一个功能基团。

2. 共价催化

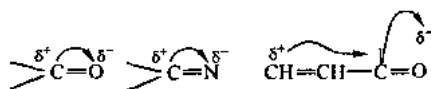
有一些酶反应可通过共价催化来提高反应速度。所谓共价催化就是底物与酶以共价方式形成中间物。这种中间物可以很快转变为活化能大为降低的转变态,从而提高催化反应速度。例如糜蛋白酶与乙酸对硝基苯酯可结合成为乙酰糜蛋白酶的复合中间物,同时生成对硝基苯酚。在复合中间物中乙酰基与酶的结合为共价形式。乙酰糜蛋白酶与水作用后,迅速生成乙酸并释放出糜蛋白酶。乙酰糜蛋白酶是共价结合的酶-底物(enzyme-substrate, ES)复合物。能形成共价 ES 复合物的酶还有一些,详见表 4-1-4。

表 4-1-4 某些酶-底物共价复合物

酶	与底物共价结合的酶功能基团	酶-底物共价复合物	酶	与底物共价结合的酶功能基团	酶-底物共价复合物
葡萄糖磷酸变位酶	丝氨酸的羟基	磷酸酶	葡萄糖-6-磷酸酶	组氨酸的咪唑基	磷酸酶
乙酰胆碱酯酶	丝氨酸的羟基	酰基酶	琥珀酰辅酶 A 合成酶	组氨酸的咪唑基	磷酸酶
糜蛋白酶	丝氨酸的羟基	酰基酶	转醛酶	赖氨酸的 ε-氨基	Schiff 碱

酶	与底物共价结合的酶功能基团	酶-底物共价复合物	酶	与底物共价结合的酶功能基团	酶-底物共价复合物
磷酸甘油醛脱氢酶	半胱氨酸的巯基	酰基酶	D-氨基酸氧化酶	赖氨酸的ε-氨基	Schiff碱
乙酰辅酶A-转酰基酶	半胱氨酸的巯基	酰基酶			

共价催化的常见型式是酶的催化基团中亲核原子对底物的亲电子原子的攻击。它们类似亲核试剂与亲电试剂。所谓亲电试剂就是一种试剂具有强烈亲和电子的原子中心。带正电离子如 Mg^{2+} 与 NH_4^+ 是亲电子的, 含有 $-C=O$ 及 $-C=N-$ 基团的化合物也是亲电子的, 其中 $-C=O$ 的 O 及 $-C=N-$ 的 N 都有吸引电子的倾向, 因而使得邻近的 C 原子缺乏电子。为了表示这种状态, 可以 δ^+ 表示, 而吸引电子的 O 与 N 则可以 δ^- 表示。其电子移动的方向则以从 δ^+ 至 δ^- 的弯曲箭头线表示, 如下式:



所谓亲核试剂就是一种试剂具有强烈供给电子的原子中心。如 $H-\overset{H}{\underset{|}{N}}:$ 的 N:

$\overset{H}{\underset{|}{O}}:$ 的 O:, $\overset{O}{\underset{|}{C=O^-}}$ 的 O: 及 $\overset{H}{\underset{|}{S}}$ 的 S:。酶的催化基团如丝氨酸的 $-OH$ 基团, 半胱氨酸的 $-SH$ 基团及组氨酸的 $-CH-N=CH-$ 基团。

亲核催化剂之所以能发挥催化作用是由于它能供给底物一对电子。这种倾向是催化反应速度的部分或全部决定因素。由于给予电子, 催化剂就可与底物共价结合, 而这种共价结合的中间物可以很快地分解, 结果反应速度大大加快。

亲电催化剂正好与亲核催化剂相反, 它从底物移去电子的步骤才是反应速度的决定因素。事实上, 亲电步骤与亲核步骤常常相互在一起发生的。当催化剂为亲核催化剂时, 它就会进攻底物中的亲电核心。反之亦然。在酶促反应中, 酶的亲核基团对底物的亲电核心起作用要比酶的亲电基团对底物的亲核中心起作用的可能性大得多。

3. 邻近效应及定向效应

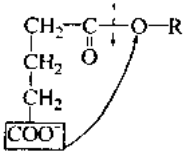
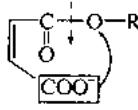
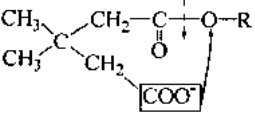
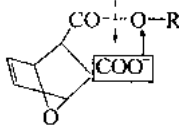
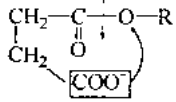
化学反应速度与反应物浓度成正比例。假使在反应系统的局部, 底物浓度增高, 则反应速度也相应增高; 如果溶液中底物分子进入酶的活性中心, 则活性中心区域内底物浓度可以大为提高。例如某底物在溶液中浓度为 0.001 mol/L , 而在酶活性中心的浓度竟达到 100 mol/L , 即其浓度比溶液中浓度高 10^5 倍, 也就是反应速度可大为提高。

底物分子进入酶的活性中心, 除因浓度增高因素使反应速度增快外, 还有特殊的邻近效应及定位效应。所谓邻近效应, 就是底物的反应基团与酶的催化基团越靠近, 其反

第四篇 酶工程制药工艺技术

应速度越快。以双羧酸的单苯基酯的分子内催化为例,当—COO—与酯键相靠较远时,酯水解相对速度为1,而两者相隔很近时,酯水解速度可增加53000倍,详见表4-1-5。

表4-1-5 双羧酸的单苯基酯的分子构造与酯水解的相对速度关系

酯	酯水解的相对速度	酯	酯水解的相对速度
	1		1000
	20		5300
	230		

严格来讲,仅仅靠近还不能解释反应速度的提高。要使邻近效应达到提高反应速度的效果,必须是既靠近又定向,即酶与底物的结合达到最有利于形成转变态,使反应加速(图4-1-3)。有人认为,这种加速效应可能使反应增加 10^8 倍。要使酶既与底物靠近,又与底物定向,就要求底物必须为酶的最适宜底物。当特异底物与酶结合时,酶蛋白发生一定构象变化,与底物发生诱导契合。

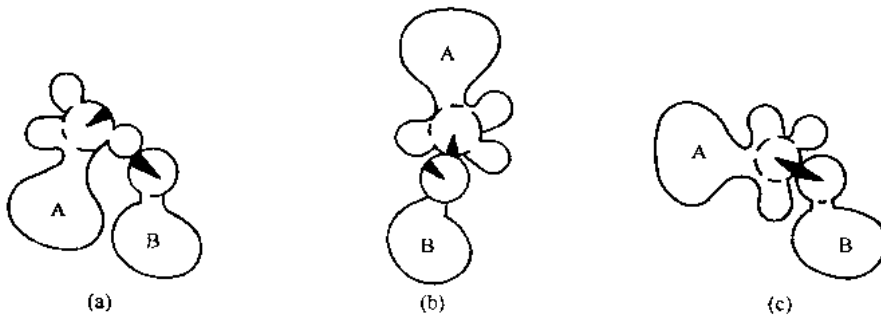


图4-1-3 底物与酶的临近效应的3种情形

(a)不靠近、不定向;(b)靠近,不定向;(c)靠近,又定向

4. 变形或张力

酶使底物分子中的敏感键发生变形或张力,从而使底物的敏感键更易于破裂,详见

图 4-1-4。

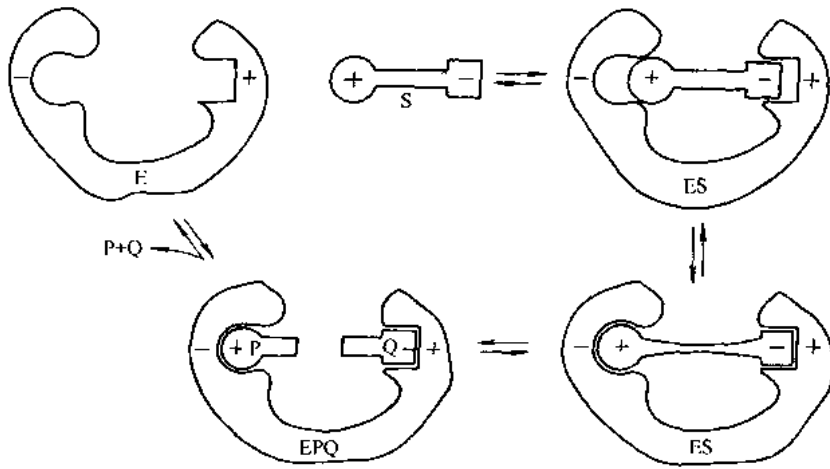
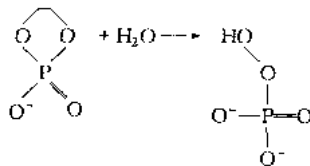


图 4-1-4 变形或张力示意

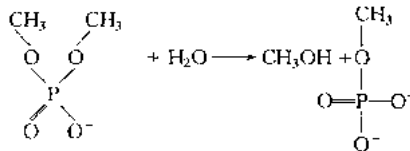
E—酶; S—底物; P, Q—产物

下面是在非酶系统中存在变形或张力加速反应速度的实例。

化合物 I



化合物 II



化合物 I 的水解反应速度快,而化合物 II 水解反应速度小,这是因为前者的反应物中的环状结构存在张力,而后者的反应物却无环状结构,两者反应速度常数的比值为 10^8 ,这表明,张力或变形可使反应速度常数增加 10^8 倍。

5. 酶的活性中心为疏水区域

酶的活性中心常为酶分子的凹穴。此处常为非极性或疏水性的氨基酸残基。疏水区域的特点是介电常数低,并排出极性高的水分子。这使得底物分子的反应键和酶的催化基团之间易发生反应,有助于加速酶催化反应。

第二节 酶作为催化剂的显著特点

酶与化学催化剂比较具有显著的特性。最重要的有三方面,高催化效率、强专一性及酶活性可以调控。

一、催化能力

酶加快反应速度可高达 10^{17} 倍(如 OMP 脱羧酶)。但酶催化反应速度和在相同 pH 及温度条件下非酶催化反应速度的可直接比较的例子很少,这是因为非酶催化的反应速度太低,不易观察。对那些可比较的反应,可发现反应速度大大加速,如乙酰胆碱酯酶接近 10^{13} 倍,丙糖磷酸异构酶为 10^9 倍,分支酸变位酶为 1.9×10^6 倍,四膜虫核酶接近 10^{11} 倍(表 4-1-6)。在其他可比较的反应中,酶促反应速度相当高,而反应温度可能很低。酶催化的最适条件几乎都为温和的温度和非极端 pH。以固氮酶为例, NH_3 的合成在植物中通常是 25°C 和中性 pH 下由固氮酶催化完成,酶是由两个解离的蛋白质组分组成的一个复杂的系统,其中一个含金属铁,另一个含铁和钼,反应需消耗一些 ATP 分子,精确的计量关系还未知。但工业上由氮和氢合成氨时,需在温度 $700 \sim 900\text{K}$, 压力 $10 \sim 90\text{MPa}$ 下,还要有铁及其他微量金属氧化物作催化剂才能完全反应。

表 4-1-6 天然酶催化能力举例

酶	非催化半寿期 $t_{1/2\text{uncat}}$	专一性因子 $(k_{\text{cat}} \cdot K_m^{-1}) / (\text{s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$	反应加速倍数 $k_{\text{cat}} / k_{\text{uncat}}$
OMP 脱羧酶	7.8×10^7 年	5.6×10^7	1.4×10^{17}
乙酰胆碱酯酶	约 3 年	$> 10^8$	约 10^{13}
丙糖磷酸异构酶	1.9d	2.4×10^8	1.0×10^9
分支酸变位酶	7.4h	1.1×10^6	1.9×10^6
四膜虫核酶	约 430 年	1.5×10^6	约 10^{11}

注: k_{cat} 为催化反应速度; K_m 为米氏常数; k_{uncat} 为非酶催化反应速度。

二、专一性

大多数酶对所作用的底物和催化的反应都是高度专一的。不同的酶专一性程度不同,有些酶专一性很低(键专一性),如肽酶、磷酸(酯)酶、酯酶,可以作用很多底物,只要

求化学键相同。例如它们可分别作用肽、磷酸酯、羧酸酯。生物分子降解中常见到低专一性的酶,而在合成中则很少见到,这是因为前者是起降解作用,低专一性可能更为经济。具有中等程度专一性的为基团专一性,如己糖激酶可以催化很多己醛糖的磷酸化。大多数酶呈绝对或几乎绝对的专一性,它们只催化一种底物进行快速反应,如脲酶只催化尿素的反应或以很低的速度催化结构非常相似的类似物。

基团专一性和绝对专一性对低分子量的底物来说容易理解。对大分子底物而言,由于酶的活性中心只与大分子的一部分相互作用,因此情形有点不同,限制性核酸内切酶一般可识别 DNA 上 4~6 对碱基,然后切除双链间的磷酸二酯键,一般切成黏性末端。现已知道有 400 多种不同专一性的这类酶,虽然酶对含有合适序列的任何 DNA 分子或片段都能作用,但每一个酶的活性中心接触底物的特定区域具有绝对的专一性。

酶的另一个显著特点就是催化反应的立体专一性。以 NAD^+ 和 NADP^+ 为辅因子的脱氢酶为例,用适当标记的底物做实验,发现脱氢酶催化底物上的氢转移到尼克酰胺环特异的一面,称为 A 型脱氢酶和 B 型脱氢酶(图 4-1-5)。几乎所有的脱氢酶作用时都需要 NAD^+ 或 NADP^+ 。对那些已知立体结构的脱氢酶,如肝乙醇脱氢酶、乳酸脱氢酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶,其专一性机制已经搞清。在酶催化反应中,还存在潜手性例子,虽然底物本身不具有手性,但反应却是立体专一性的。以延胡索酸水合酶催化延胡索酸生成苹果酸为例,在 $^3\text{H}_2\text{O}$ 溶液中, ^3H 以立体专一性方式加入到底物上(图 4-1-6)。

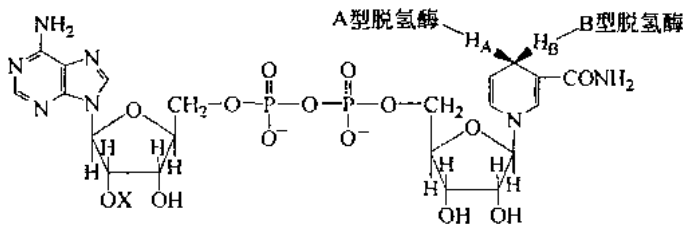


图 4-1-5 需要 NAD^+ 和 NADP^+ 酶的立体专一性

还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH), $\text{X}-\text{H}$;

还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH), X -磷酸

A 型脱氢酶—乙醇脱氢酶(NAD^+), 乳酸脱氢酶(NAD^+), 苹果酸脱氢酶(NAD^+),

莽草酸脱氢酶(NADP^+), 细胞色素 b_5 还原酶(NAD^+),

乙酰载体蛋白还原酶(NADP^+); B 型脱氢酶—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NAD^+),

3-羟丁酸还原酶(NAD^+), 葡萄糖脱氢酶(NAD^+),

高丝氨酸脱氢酶(NADP^+), 甘油-3-磷酸脱氢酶(NAD^+), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(NADP^+)

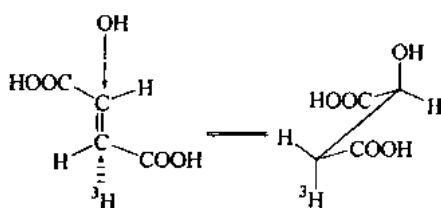
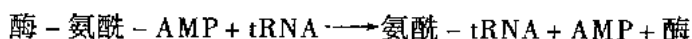
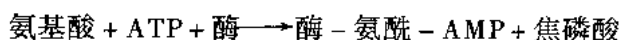


图 4-1-6 延胡索酸转化为苹果酸时³H 以立体专一性方式进行反应

近年来,人们更加认识到酶专一性在蛋白质合成和 DNA 复制时的重要意义。生物体内 DNA 复制的错误比率非常低,在聚合核苷酸时,只有 $10^{-10} \sim 10^{-8}$ 的错误,转录 DNA 且转译 mRNA 为蛋白质的整个过程中氨基酸的参入错误的比率只有 10^{-4} 。从结构相似的氨基酸和氨酰 - tRNA 合成酶之间的相互作用的能量差异来看,酶的专一性远比预计的要高,这是由于酶存在着校读功能。这里简要介绍一下氨酰 - tRNA 合成酶作用机制的要点。氨酰 - tRNA 合成酶催化的 tRNA 转运过程包括以下两个步骤。



式中,ATP 为腺苷三磷酸,AMP 为腺苷一磷酸。

酶需要识别专一性的氨基酸和 tRNA,后者因分子较大,与酶接触位点多,因而可准确识别。而氨基酸分子很小,准确选择较难,跟踪反应第一、第二步,发现形成氨酰 - 腺苷酸中间物时会发生明显错误,但氨酰 - tRNA 合成却不会出错,错误的氨酰 - 腺苷酸会被水解。有证据表明酶分子上存在着与合成部位不同的校读部位,它可以水解错配的氨基酸。DNA 复制过程也有类似的情形,DNA 聚合酶 III 在校读 DNA 复制时同样具有外切核酸酶的活力,以保证 DNA 准确的复制。

三、调节性

生命现象表现了它内部反应历程的有序性。这种有序性是受多方面因素调节和控制的,而酶活性的控制又是代谢调节作用的主要方式。酶活性的调节控制主要有下列 7 种方式。

1. 酶浓度的调节

酶浓度的调节主要有两种方式:一种是诱导或抑制酶的合成;一种是调节酶的降解。例如,在分解代谢中, β -半乳糖苷酶的合成,平时是处于被阻遏状态,当乳糖存在时,抵消了阻遏作用,于是酶受乳糖的诱导而合成。

2. 激素调节

激素调节也和生物合成有关,但调节方式有所不同。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。妊娠时,修饰亚基在乳腺生成,分娩时,由于激素水平急剧的变化,修饰亚基大量合成,它和催化亚基结合,大量合成乳糖。

3. 共价修饰调节

共价修饰这种调节方式本身又是通过酶催化进行的。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第三种酶催化除去。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就是以这种方式调节它们的活性。

4. 限制性蛋白水解作用与酶活力调控

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,一旦生理需要,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,从而启动和激活以下各种生理功能,如酶原激活、血液凝固、补体激活等。除了参与酶活性调控外,还起着切除、修饰、加工等作用,因而具有重要的生物学意义。

酶原激活是指体内合成的非活化的酶前体,在适当条件下,受到 H^+ 或特异的蛋白酶限制性水解,切去某段肽或断开酶原分子上某个肽键而转变为活性的酶。如胰蛋白酶原在小肠里被其他蛋白水解酶限制性地切去一个六肽,活化成为胰蛋白酶。

血液凝固是由体内十几种蛋白质因子参加的级联式酶促激活反应,其中大部分为限制性蛋白水解酶。在凝血过程中首先由蛋白质因子(称为因子 Xa 的蛋白酶)激活凝血酶原,生成活性凝血酶;并由它再催化可溶性的纤维蛋白原,转变成不稳定的可溶性纤维蛋白,聚集成网状细丝,以网住血液的各种成分。在凝血酶作用下,收缩成血块,使破损的血管封闭而修复。

补体是一类血浆蛋白,和免疫球蛋白一样发挥防御功能。免疫球蛋白对外来异物有“识别”结合作用和激活补体作用。补体是一组蛋白酶(由 11 种蛋白组分组成),通常以非活性前体形式存在于血清中,一旦接受到 Ig(免疫球蛋白)传来的抗原入侵信号,被限制性蛋白酶水解而激活补体组分,最终形成“攻膜复合物”执行其功能。

5. 抑制剂的调节

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

6. 反馈调节