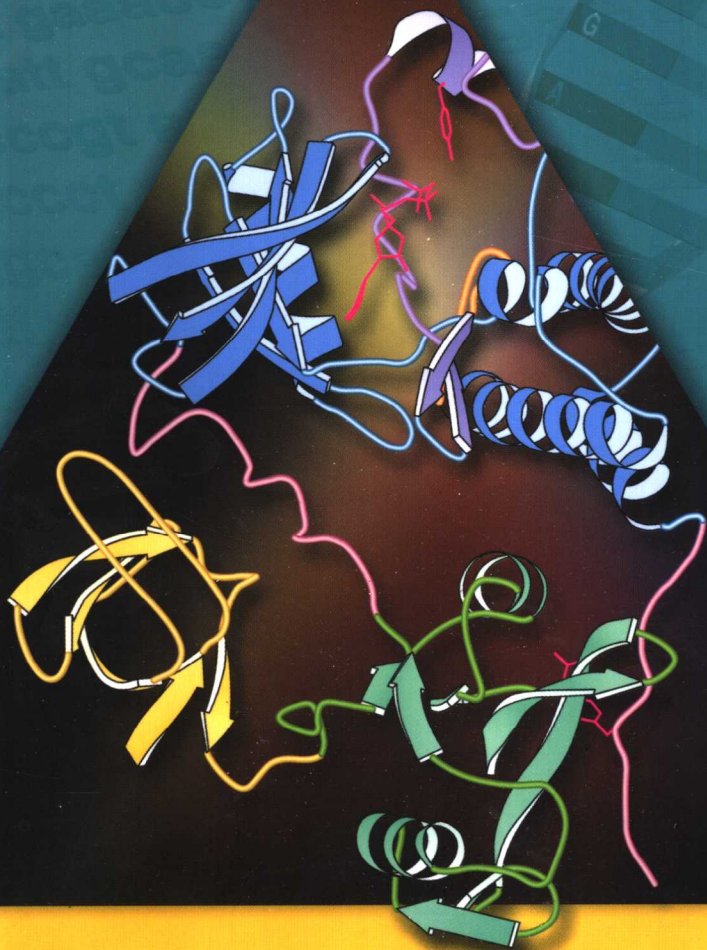


生物技术和生物工程专业规划教材

# 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

## 内容简介

本教材是根据教育部高校生物科学与工程教学指导委员会“生物技术与生物工程专业规划教材建设规划”立项编写而成。主要介绍酶的生产与应用的基本原理和基本技术。内容包括3篇11章,第一章为绪论,简明地介绍了酶的一些基本概念和酶工程的发展概况;第一篇为酶的生产,包括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3章;第二篇为酶的改性,包括酶改性的基本理论、酶分子修饰、酶固定化和酶的非水相催化等4章;第三篇为酶的应用,包括酶应用的基本理论、酶反应器的应用、酶的应用领域等3章。

本教材可供高等院校生物技术、生物工程、生物化工、生物制药、发酵工程、生物科学等专业的师生使用,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. —北京: 高等教育出版社, 2005. 9

ISBN 7-04-017690-4

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 (2005) 第 094657 号

策划编辑 王 莉      责任编辑 田 军      封面设计 张 楠      责任绘图 吴文信  
版式设计 胡志萍      责任校对 杨凤玲      责任印制 宋克学

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 100011  
总 机 010-58581000  
经 销 北京蓝色畅想图书发行有限公司  
印 刷 北京中科印刷有限公司

购书热线 010-58581118  
免费咨询 800-810-0598  
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>

开 本 787×1092 1/16  
印 张 20.25  
字 数 490 000

版 次 2005 年 9 月第 1 版  
印 次 2005 年 9 月第 1 次印刷  
定 价 26.50 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 17690-00

# 前 言

2003年5月教育部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,教育部高校生物科学与工程教学指导委员会于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的需要,必须科学性、系统性和先进性兼备。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的酶的生产方法,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酶的生产方法,是当今在酶的生产中应用最广泛的方法,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单体有很高的纯度,合成过程复杂,成本高,至今仍未能用于工业化生产。

酶的改性(enzyme improving)是通过各种方法使酶的催化特性得以改进的技术过程。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的非水相催化技术等。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或者除去不良物质的技术过程。

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,以利于人体健康、环境保护、经济发展和社会进步。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3篇10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3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4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3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,也可供相关领域的教学工作者、科学工作者和工程技术人员参考。

编 者  
2005年8月

## 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

**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：**100011

**购书请拨打电话：**(010)58581118

# 目 录

第一章 绪论 .....	1	第三节 酶的活力测定 .....	8
第一节 酶的基本概念 .....	1	第四节 酶工程发展概况与前景 .....	11
第二节 酶的分类与命名 .....	2		

## 第一篇 酶的生产

第二章 酶生物合成的基本理论		第四章 酶的提取与分离纯化 .....	72
——酶的生物合成及其调节 .....	18	第一节 细胞破碎 .....	72
第一节 RNA 的生物合成——转录 .....	18	第二节 酶的提取 .....	75
第二节 蛋白质的生物合成——翻译 .....	23	第三节 沉淀分离 .....	77
第三节 酶生物合成的调节 .....	29	第四节 离心分离 .....	81
第三章 酶的生物合成法生产 .....	36	第五节 过滤与膜分离 .....	85
第一节 细胞的选择 .....	36	第六节 层析分离 .....	89
第二节 培养基的配制 .....	38	第七节 电泳分离 .....	102
第三节 产酶工艺条件及其调节控制 .....	45	第八节 萃取分离 .....	108
第四节 微生物发酵产酶 .....	49	第九节 结晶 .....	114
第五节 植物细胞培养产酶 .....	63	第十节 浓缩与干燥 .....	116
第六节 动物细胞培养产酶 .....	67		

## 第二篇 酶的改性

第五章 酶改性的基本理论		第五节 酶分子的物理修饰 .....	154
——酶的结构及其与催化特性		第七章 酶固定化 .....	155
的关系 .....	121	第一节 固定化方法 .....	156
第一节 酶的化学组成 .....	121	第二节 固定化酶的特性 .....	163
第二节 酶的化学结构 .....	125	第三节 固定化技术的应用 .....	164
第三节 酶的空间结构 .....	128	第八章 酶的非水相催化 .....	175
第四节 酶的活性中心 .....	133	第一节 酶非水相催化的研究概况 .....	175
第五节 酶的结构与催化特性的关系 .....	135	第二节 水对非水相介质中酶催化	
第六章 酶分子修饰 .....	138	的影响 .....	176
第一节 酶分子的主链修饰 .....	138	第三节 非水相中酶催化的特性 .....	181
第二节 酶分子的侧链基团修饰 .....	141	第四节 非水相中酶催化反应的条	
第三节 酶的组成单位置换修饰 .....	149	件及其控制 .....	187
第四节 金属离子置换修饰 .....	153		

## 第三篇 酶 的 应 用

<b>第九章 酶应用的基本理论</b>	
——酶的催化特性与反应动力学	
力学	201
第一节 酶的催化特性	201
第二节 酶反应动力学	207
<b>第十章 酶反应器的应用</b>	226
第一节 酶反应器的分类与选型	227
第二节 酶反应器的设计与应用	236
<b>第十一章 酶的应用领域</b>	244
第一节 酶在医药领域的应用	244
第二节 酶在食品领域的应用	260
第三节 酶在工业领域的应用	271
第四节 酶在农业领域的应用	276
第五节 酶在环保、能源领域的应用	277
第六节 酶在生物技术领域的应用	280
<b>主要参考书目</b>	287
<b>中英文名词对照</b>	288
<b>索引</b>	301

# 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, P 酶)和核酸类酶(ribozyme, R 酶,核酶)两大类。

各种细胞在适宜的条件下都可以合成各种各样的酶,据此,可以通过各种方法选育得到优良的微生物、动物或植物细胞,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。通过各种方法使酶的催化特性得以改进的技术过程,称为酶的改性(enzyme improving)。经过改性,酶可以提高酶活力,增加稳定性,降低抗原性,改变选择性,更有利于酶的应用。

在适宜的条件下,酶可催化各种生化反应。据此,可以根据酶的催化特性和酶反应动力学的理论,将酶应用于医药、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。

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),酶固定化(enzyme immobilization),酶的非水相催化(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

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不断发展的。

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



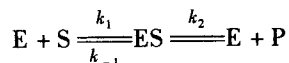
水解生成可溶性糖的物质,称之为淀粉酶(diastrase),并指出了它的热不稳定性,初步触及了酶的一些本质问题。在此后近 100 年中,人们认识到“酶是生物体产生的具有生物催化功能的物质”,但是尚未搞清楚究竟是什么物质。

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(Kuhne)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(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(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:

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

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。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(*Tetrahynena*)细胞的 26S rRNA 前体具有自我剪接(self-splicing)功能,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 20 多年来生物学领域最令人鼓舞的发现之一。为此,Cech 和 Altman 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,数量已达几千种。为了准确地识别某一种酶,避免发生混乱或误解,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他分子进行反应,而核酸类酶却可以催化酶分子本身也可以催化其他分子进行反应,由此,在核酸类酶的分类中出现了分子内催化 R 酶、分子间催化 R 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。

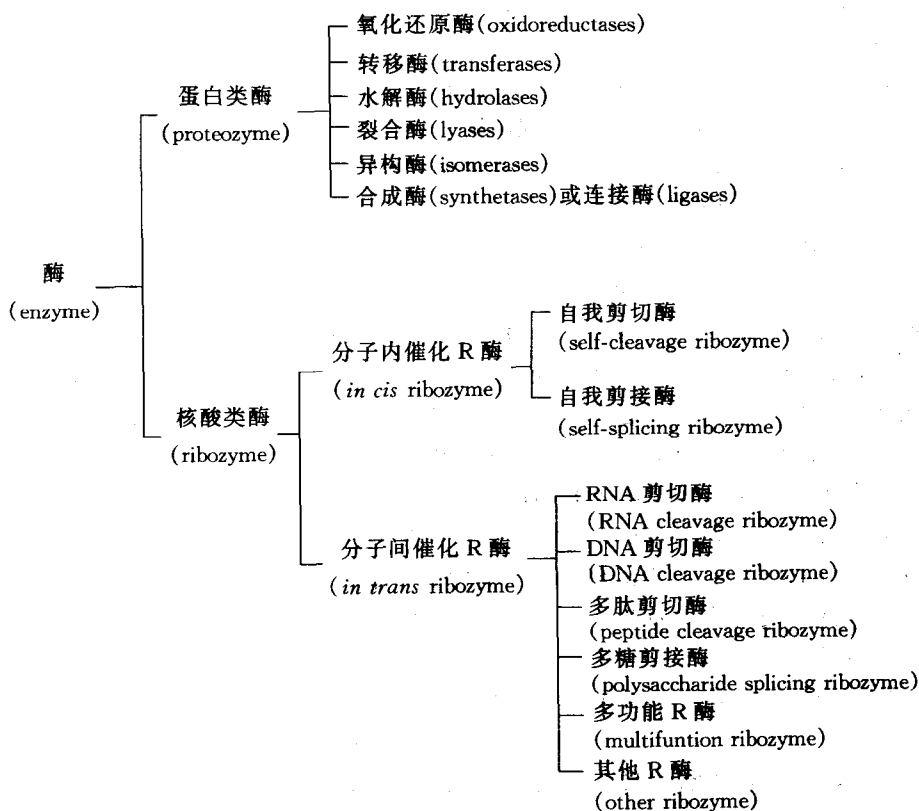


图 1-1 酶的分类

### 一、蛋白类酶(P 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 of Enzymes)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”(-ase)字。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, 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 (P 酶) 的分类原则为:

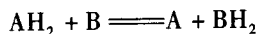
- ① 按照酶催化作用的类型, 将蛋白类酶分为 6 大类。即第 1 大类, 氧化还原酶; 第 2 大类, 转移酶; 第 3 大类, 水解酶; 第 4 大类, 裂合酶; 第 5 大类, 异构酶; 第 6 大类, 合成酶或连接酶。
- ② 每个大类中, 按照酶作用的底物、化学键或基团的不同, 分为若干亚类。
- ③ 每一亚类中再分为若干小类。
- ④ 每一小类中包含若干个具体的酶。

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; 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

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:



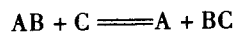
被氧化的底物 ( $AH_2$ ) 为氢或电子供体, 被还原的底物 (B) 为氢或电子受体。

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

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

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:



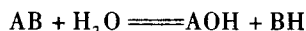
转移酶的系统命名是“供体: 受体某基团转移酶”。例如, L-天冬氨酸: 2-酮戊二酸氨基转移酶, 表明该酶催化氨基从 L-天冬氨酸转移到 2-酮戊二酸。

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 —— 草酰乙酸 + L - 谷氨酸) 等。

### 3. 水解酶

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 + H<sub>2</sub>O —— 核苷 + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)等。

### 4. 裂合酶

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,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 —— 甲酸 + CO<sub>2</sub>),苏氨酸醛缩酶(L - 苏氨酸 —— 甘氨酸 + 乙醛),丙二醇脱水酶(丙二醇 —— 丙醛 + 水),乙酰乳酸合酶(2 - 乙酰乳酸 + CO<sub>2</sub> —— 2 - 丙酮酸)。

### 5. 异构酶

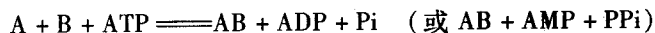
异构酶是催化分子内部基团位置或构象转换的一类酶。其反应通式为：



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)、表异构酶(epimerase)、顺反异构酶(cis-trans-isomerase)等。例如,葡萄糖异构酶(D - 葡萄糖 —— D - 果糖),丙氨酸消旋酶(L - 丙氨酸 —— D - 丙氨酸),磷酸甘油酸磷酸变位酶(2 - 磷酸 - D - 甘油酸 —— 3 - 磷酸 - D - 甘油酸),醛糖1 - 表异构酶(α - D - 葡萄糖 —— β - D - 葡萄糖),顺丁烯二酸顺反异构酶(顺丁烯二酸 —— 反丁烯二酸)等。

### 6. 连接酶或合成酶

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 —— 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 —— L - 谷氨酰胺 + ADP + Pi)。

## 二、核酸类酶(R 酶)的分类

由于核酸类酶的研究历史不长,对于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 分子还是其他分子,可以将 R 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 R 酶分为剪切酶、剪接酶和多功能酶等三类。

根据 R 酶的结构特点不同,可分为锤头型 R 酶,发夹型 R 酶,含 I 型 IVS 的 R 酶,含 II 型 IVS 的 R 酶等。

本书对 R 酶采用下列分类原则:

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

② 在每个大类中,根据酶的催化类型不同,将 R 酶分为若干亚类。据此,分子内催化的 R 酶可以分为自我剪切酶、自我剪接酶两个亚类;分子间催化的 R 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。

根据现有资料,将 R 酶的初步分类简介如下:

### 1. 分子内催化 R 酶

分子内催化 R 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 R 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和自我剪接两个亚类。

(1) 自我剪切酶:自我剪切酶是在一定条件下催化本身 RNA 分子进行剪切反应的 R 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 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:自我剪接酶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 R 酶。它们都是 RNA 前体,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 R 酶和含 II 型 IVS 的 R 酶。

I 型 IVS 均与四膜虫 rRNA 前体的间插序列(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  $Mg^{2+}$  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

R 酶	鸟苷或 5' - 鸟苷酸	Mg <sup>2+</sup>	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 R 酶

分子间催化 R 酶是催化其他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 剪切酶是催化其他 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 Mg<sup>2+</sup> 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 剪切酶是催化 DNA 分子进行剪切反应的 R 酶。

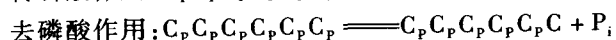
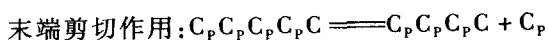
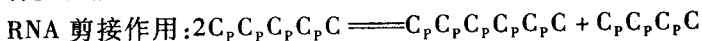
1990 年,发现核酸类酶除了以 RNA 为底物以外,有些 R 酶还可以 DNA 为底物,在一定条件下催化 DNA 分子进行剪切反应。

(3) 多肽剪切酶:多肽剪切酶是 1992 年发现的催化多肽剪接作用的核酸类酶。

(4) 多糖剪接酶:多糖剪接酶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 - α - 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 R 酶:多功能 R 酶是催化其他分子进行多种反应的核酸类酶。例如,L-19 IVS 是一种多功能 R 酶,能够催化其他 RNA 分子进行下列多种类型的反应:



由于蛋白类酶和核酸类酶的组成和结构不同,命名和分类原则有所区别,为了便于区分两大类别的酶,有时催化的反应类型相同或相似,在蛋白类酶和核酸类酶中的命名却有所不同。例如,催化大分子水解生成较小分子的酶,在核酸类酶中属于剪切酶,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度表示。在外界条件相同的情况下,反应初速度越大,意味着酶活力越高。

酶催化反应速度,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:

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt}$$

#### 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内保存备用。

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他选用的温度;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保持恒定是采用一定浓度和一定pH的缓冲溶液。有些酶催化反应,要求一定浓度的激活剂等条件,应适量添加。

3. 在一定的条件下,将一定量的酶液和底物溶液混合均匀,适时记下反应开始的时间。

4. 反应到一定的时间,取出适量的反应液,运用各种生化检测技术,测定产物的生成量或底物的减少量。为了准确地反映酶催化反应的结果,应尽量采用快速、简便的方法,立即测出结果。若不能即时测出结果,则要及时终止反应,然后再测定。

终止酶反应的方法很多。常用的有:①反应时间一到,立即取出适量反应液,置于沸水浴中,加热使酶失活;②加入适宜的酶变性剂,如三氯醋酸等,使酶变性失活;③加入酸或碱溶液,使反应液的pH迅速远离催化反应的最适pH,而使反应终止;④将取出的反应液立即置于低温冰箱、冰粒堆或冰盐溶液中,使反应液的温度迅速降低至10℃以下,而终止反应。在实际使用时,要根据酶的特性、反应底物和产物的性质,以及酶活力测定的方法等加以选择。

测定反应液中底物的减少或产物的生成量,可采用化学检测、光学检测、气体检测等生化检

测技术。例如,用化学滴定法测定糖化酶水解淀粉生成的葡萄糖的量;用分光光度法测定碱性磷酸酶水解硝基酚磷酸(NPP)生成的对硝基酚的量;用华勃氏呼吸仪测定谷氨酸脱羧酶裂解谷氨酸生成的二氧化碳的量,等等。一种酶可以有多种测定方法,要根据实际情况选用。

## 二、酶活力单位

酶活力单位是人们定义的一种酶量单位,酶活力单位数的高低是衡量酶活力高低的一个指标。

1961年国际生物化学与分子生物学联合会规定:在特定条件下(温度可采用25℃,pH等条件均采用最适条件),每1min催化1μmol的底物转化为产物的酶量定义为1个酶活力单位。这个单位称为国际单位(IU)。由于这个规定没有法律效力,所以现在世界各地实际使用的酶活力单位的定义各不相同。由于测定方法和使用习惯不一样,相同的一种酶往往有多种不同的酶活力单位。在酶的研究和使用过程中,务必注意酶活力单位的定义。

国际上另一个常用的酶活力单位是卡特(Kat)。其定义为:在特定条件下,每秒催化1mol底物转化为产物的酶量定义为1Kat。

上述两种酶活力单位之间可以互相换算,即:

$$1 \text{ Kat} = 1 \text{ mol/s} = 60 \text{ mol/min} = 60 \times 10^6 \mu\text{mol/min} = 6 \times 10^7 \text{ IU}$$

为了比较酶制剂的纯度和活力的高低,常常采用比活力(specific activity)这个概念。酶的比活力是酶纯度的一个指标,是指在特定条件下,单位质量(mg)蛋白质或RNA所具有的酶活力单位数:

$$\text{酶比活力} = \text{酶活力(单位)}/\text{mg(蛋白或RNA)}$$

## 三、酶的转换数与催化周期

酶的转换数(turnover number) $K_p$ ,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的分子数。即是每摩尔酶每分钟催化底物转化为产物的摩尔数。是酶催化效率的一个指标。通常用每微摩尔酶的酶活力单位数表示。单位为 $\text{min}^{-1}$ 。

$$K_p = \frac{\text{底物转化摩尔数(mol)}}{\text{酶摩尔数} \cdot \text{分钟(mol} \cdot \text{min)}} = \frac{\text{酶活力单位数(IU)}}{\text{酶微摩尔数}(\mu\text{mol})}$$

一般酶的转换数在 $10^3 \text{ min}^{-1}$ 左右,碳酸酐酶的转换数最高,达到 $3.6 \times 10^7 \text{ min}^{-1}$ 。

转换数的倒数称为酶的催化周期。催化周期是指酶进行一次催化所需的时间。单位为毫秒(ms)或微秒(μs),即

$$T = \frac{1}{K_p}$$

例如,上述碳酸酐酶的催化周期  $T = \frac{1 \times 60 \times 10^6 \mu\text{s}}{3.6 \times 10^7} = 1.7 \mu\text{s}$

## 四、固定化酶的活力测定

与水不溶性载体结合,在一定的空间范围内起催化作用的酶称为固定化酶(immobilized enzyme)。固定化酶由于受到载体的影响,酶分子与底物的接触、催化等特性与游离酶有所不同,



故其测定方法亦有些区别。

现将固定化酶活力的常用测定方法介绍如下：

### 1. 振荡测定法

将一定重量的固定化酶,置于一定形状一定大小的容器中,加入一定量的底物溶液,在特定的条件下,一边振荡,一边进行催化反应。在预定的时间,取出一定量的反应液进行酶活力测定。

固定化酶反应液的测定方法与游离酶反应液的测定方法完全相同。

在固定化酶反应过程中,振荡方式和速度对酶反应速度有很大影响。在振荡速度不高时,反应速度随振荡速度的增加而升高,在达到一定速度后,反应速度不再升高。若振荡速度过高,则可能破坏固定化酶的结构,缩短固定化酶的使用寿命。所以,在测定固定化酶的活力时,要在一定的振荡速度下进行,速度的变化对反应速度有明显的影响。此外,底物浓度、pH、反应温度、激活剂浓度、抑制剂浓度、反应时间等条件可以与游离酶活力测定时的条件相同。也可以根据固定化酶的特性不同而选择适宜的条件。最好在与固定化酶应用的工艺条件相同的条件下进行活力测定。

### 2. 酶柱测定法

将一定量的固定化酶装进具有恒温装置的反应柱中制成酶柱,在适宜的条件下让底物溶液以一定的流速流过酶柱,收集流出的反应液。然后测定反应液中底物的消耗量或产物的生成量。测定方法与游离酶反应液的测定方法相同。

在固定化酶反应过程中,底物溶液的流速对反应速度有很大的影响。在不同的流速条件下,反应速度不同。在某一适宜的流速条件下,反应速度达到最大。所以,测定固定化酶的活力要在恒定的流速条件下进行。而且酶柱的形状和径高比都对反应速度有明显的影响,必须固定不变。此外,底物浓度、pH、反应温度、激活剂和抑制剂浓度、离子强度等条件可以与游离酶活力测定的条件相同,也可以选用固定化酶反应的最适条件,最好与实际应用时的工艺条件相同。

### 3. 连续测定法

利用连续分光光度法等测定方法可以对固定化酶反应液进行连续测定,从而测定固定化酶的酶活力。测定时,可将振荡反应器中的反应液连续引到连续测定仪(如双束紫外分光光度计等)的流动比色杯中进行连续分光测定。或者让固定化酶柱流出的反应液连续流经流动比色杯进行连续分光测定。固定化酶活力的连续测定,可以及时并准确地知道某一时刻的酶活力变化情况,对利用固定化酶进行连续生产和自动控制有重大意义。

### 4. 固定化酶的比活力测定

游离酶的比活力可以用每毫克(mg)酶蛋白或酶 RNA 所具有的酶活力单位数表示。在固定化酶中,一般采用每克(g)干固定化酶所具有的酶活力单位数表示。在测定固定化酶的比活力时,可先用湿固定化酶测定其酶活力,再在一定的条件下干燥,称取固定化酶的干重,然后计算出固定化酶的比活力。也可以称取一定量的干固定化酶,让它在一定条件下充分溶胀后,进行酶活力测定,再计算出固定化酶的比活力。

对于酶膜、酶管、酶板等固定化酶,其比活力则可以用单位面积的酶活力单位表示。即:比活力 = 酶活力单位/cm<sup>2</sup>

### 5. 酶结合效率与酶活力回收率的测定

酶在进行固定化时,并非所有的酶都成为固定化酶,而总是有一部分酶没有与载体结合在一