

《分子生物学基础》专题讲座之二

酶作用机理与动力学

曾 心 礼

华中农学院水产系生理生化教研室

一九八二年四月

目 录

I、引言

- 一、现代酶学研究的主要内容与趋向..... 1
- 二、酶的特殊性质..... 4
- 三、酶的分子结构与催化活性的关系..... 5
 - (一) 酶的分子组成及辅酶与辅基.....
 - (二) 酶蛋白的结构与功能.....

II、酶作用的机理..... 10

- 一、酶促反应与分子活化能..... 11
- 二、酶——底物复合物..... 12
- 三、广义的酸碱催化..... 15
- 四、亲核催化与亲电催化..... 19
- 五、邻近效应与微环境的影响..... 23
- 六、酶作用机理的实例..... 24

III、酶促反应的动力学..... 29

- 一、化学反应速度与反应初速度的概念..... 29
- 二、底物浓度对酶促反应速度的影响..... 33
 - (一) 中间产物学说与米氏方程..... 33
 - (二) 米氏方程的推导与布-哈氏的修正..... 36
 - (三) 米氏方程与米氏常数的意义..... 42
 - (四) 米氏方程的实际应用与 K_m 及 V 的求法..... 46
- 三、酶浓度对酶促反应速度的影响..... 54
- 四、激活剂对酶促反应速度的影响..... 55
- 五、抑制剂对酶促反应速度的影响..... 56

(一) 抑制作用的一般概念与研究的意义·····	56
(二) 抑制作用的类型·····	57
1. 不可逆抑制作用·····	57
2. 可逆抑制作用及其动力学·····	58
(1) 竞争性抑制作用及其动力学·····	59
(2) 非竞争性抑制作用及其动力学·····	64
(3) 反竞争性抑制作用及其动力学·····	68
(三) 一些重要的抑制剂及其作用·····	74
六、PH对酶促反应速度的影响·····	82
(一) 最适PH·····	
(二) PH对 K_m 的影响	
(三) PH对V的影响	
七、温度对酶促反应速度的影响·····	92
(一) 最适温度与稳定温度	
(二) 活化能 E_a 与温度系数 Q_{10}	
V、附录	
一、酶的实际应用·····	100
(一) 概述·····	100
(二) 酶在医学上的应用·····	103
1. 酶与疾病的关系	
2. 酶活性的测定及其在临床诊断上的应用	
3. 酶作为药物在治疗上的应用	
(三) 酶在工业生产上的应用·····	109
(四) 酶在分析监测上的应用·····	112
二、酶的分离制备与鉴定·····	115
(一) 材料的选择	
(二) 酶的分离与纯化	
(三) 酶纯度的鉴定与保存	
主要参考材料	

I、引言

酶是由活细胞所产生的可受多种因素调控的一类特殊的催化剂。故又被称为生物催化剂，虽然早在三四千年前就被人们应用，但直到本世纪初才认识到一切生命现象和生物系统的所有化学反应几乎都是在“酶”这一生物催化剂的作用下进行的。复杂的生命现象正是和生物体内存在着的丰富多彩的由酶所催化的化学反应历程紧密地联系在一起的。若离开了酶的催化，代谢就不能进行，生命也就停止了；就是体内各复杂酶系网的任何改变，也都会严重地影响到机体的正常生命活动，而引起某些疾病以致导致死亡。因此，研究酶的催化特性、作用机理与动力学对于了解机体生命活动的规律和进一步指导有关的医学实践及工农业生产都具有重要意义，同时由于酶的独特催化功能，使得它与微生物、药理、病理、生理、遗传工程及临床医学等许多学科都有着密切的关系，并在许多领域都有着重要的实际应用。

一、现代酶学研究的主要内容与趋向

酶学的研究，从十七世纪Van Helmont 研究发酵作用的化学历程，提出“酶素”这一名称就已开始。但直到1926年 Sumner 制备出了尿酶的结晶后，人们才开始了解到酶的蛋白质本质，酶学的研究便进入了一个分子水平的现代酶学的新时代。并在数学、物理与化学等的渗透下，得到了迅速的发展。现在，已经搞清了许多种酶的一级结构和空间构型，酶作用机理与调控等；并在应用酶学方面也已取得了巨大成果。

目前，酶学的研究已向纵深发展，归纳起来主要有以下几个方面：

1. 酶的分离纯制:

自1926年 Sumner 首次制得尿酶结晶以来, 至今已获得百多种结晶酶, 而不同程度纯化的已有一千多种, 其中动物, 微生物酶研究较多, 植物酶研究较少。目前酶的分离纯化仍是酶学上的一项重要任务。因为酶的分离是纯的每一步都将有助于对酶本身及其作用的了解。分段离心沉淀, 盐析法, 电泳法, 层析法, 以及离子交换法等都是分离纯化酶的重要方法, 近年来由于方法的改进和创新, 使得整个过程向微量和迅速的方面发展, 这就为更深入地、全面地了解酶的本质及其进一步的研究与应用提供了条件。

2. 酶催化历程的本质:

从结构化学和物理化学的角度, 通过对酶促反应的动力学, 酶作用机理, 酶的结构与功能等方面来了解酶催化反应历程的本质, 这是现代酶学中最重要研究方向和课题, 这对探索生命奥妙的理论研究或是对人类的实际生活都具有十分重要的意义。

3. 酶的调控:

生命现象表现在它内部化学反应历程的有序性, 而这种有序性是受多方面因素的调节和控制的。酶的调控方式很多, 除神经、激素等生理因素的间接调节外, 还通过组成酶反应的各种动力学因子, 酶原的激活, 酶活性的转化等来发挥影响。近年来, 在调控酶的生成和降解, 共价修饰, 以及调节酶的作用等的研究上取得了较大的进展。继续对酶的调控的深入研究, 无论在揭示代谢调节的奥妙还是在基础医学上都有着重要的意义。

4. 多酶体系与多酶复合体:

机体的各种生命活动过程, 包括着一系列酶的有组织有秩序地彼此依赖相互制约的协同作用。酶和酶的这种相互关系, 相互作用不仅在膜上的酶系, 在溶液系统酶系中也引人注意。对糖酵解, 三羧循环, 脂

肪酸氧化等多酶体系已进行了卓有成效的研究；对丙酮酸脱氢酶复合体、脂肪酰合成酶复合体，芳香族氨基酸生物合成多酶复合体也正广泛进行研究，但是多酶体系是一个极复杂的系统，在酶的协同作用中不仅成员之间能互相影响，而且亦受到本身以外的因素影响。因此，为正确了解酶的生物学意义及其作用的客观规律，就必须对多酶体系与多酶复合体进行深入的研究。

5. 酶学工程：

包括酶的生产、制备与应用。随着工农业生产及临床医疗实践和有关酶学研究的迅速发展，酶的生产与应用越来越引起人们的注意，在酶的应用上已从酶制剂，固定化酶进入到了多酶反应器的第三代。并深入到组织、食品、医药工业和分析监测等许多方面，正引起革命性的变化，目前在工业生产上已出现了酶制剂这一新领域。

6. 新技术、新方法：

研究技术和实验技术的改革和创新有力地推动着酶学的发展。近年来，除化学和生物的方法外，尤其是物理技术的广泛应用，使得酶学的研究进入了一个崭新的阶段。例如高分辨率的 ^{31}P 核磁共振波谱可直接观察完整细胞内 pH 和生化变化，以及酶在变化中的作用；电子计算机正用来处理许多酶相互作用时的反应过程，而为酶在生物体内的功能提供一个接近整体的信息；而荧光探测结合多通道电子计算机可用于研究生物大分子溶液构象的动力学， D 及驰豫时谱，低温酶学等等技术可帮助深入研究酶作用机制等。因此方法上的研究也是重要课题之一。

但从总的趋势来看，近代酶学的研究则主要是沿着酶作用原理（催化原理与调节原理），酶的生物学（酶的生理功能，多酶复合体，膜酶与代谢调节）和酶学工程等几个方面发展。

二、酶的特殊性质

酶作为一种蛋白质，它具有一般蛋白质的物理化学性质，特别是具有一级、二级、三级及四级结构。酶有了二级和三级结构之后才具有催化功能。但是作为生物催化剂这一特殊功能的酶的特殊性质，则主要是它作用的特异性，高催化效率和可调性等，这些都是和它的独特功能有关的一些特殊性质。

(一) 酶催化效率：

酶具有极高的催化效率，在相同的条件下，可比一般催化剂高 10^6 —— 10^{13} 倍，比非催化反应高 10^8 —— 10^{20} 倍，例如过氧化氢酶催化 H_2O_2 分解的反应： $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$ 在相同条件下，过氧化氢酶要比铁离子催化同一反应快 10^{11} 倍，然而这种比较还往往只能估计出一个下限，实际上要把一个酶的催化反应和一个非酶反应，或一般催化剂的催化反应作定量的比较是十分困难的。因为一方面，酶催化的反应同非酶催化的反应以及非催化反应的反应历程不同；另一方面，一些反应在酶催化下可以顺利地进行，而在没有酶存在下，反应速度则测不出来。生物体所处的条件是常温常压中性PH，体内的化学反应能顺利进行，而同样条件在体外无酶存在的情况下，几乎都不能进行。例如体内 CO_2 的水合反应，在碳酸酐酶的存在下，每一酶分子在一秒钟内，可使 10^7 个 CO_2 分子发生反应生成 H_2CO_3 ：



而在体外则极微。正是由于酶的催化效率高，故在机体细胞内各酶的含量尽管很低，仍可迅速地催化大量底物发生反应。

(二) 酶作用的专一性强：

一、酶只能作用于某一类或某一特定的底物进行某一特定的反应，

酶的这种性质称为酶的专一性。因此酶作用的这种专一性，一般来讲具有两个方面。一是对被催化的反应的专一的，另一种是对于被作用的反应物是专一的。前者反映在催化的速度上，后者反映在酶和底物的相互作用。

酶作用的专一性，正是酶作为一种催化剂但又不同于一般催化剂的特征之一。但不同酶的专一程度颇不相同。有的酶只作用一种底物，叫绝对专一性，例如麦芽糖酶，只能促使麦芽糖的 $\alpha-1:4$ 糖甙键水解断裂为葡萄糖，而不能水解蔗糖的 $\alpha-1:4$ 糖甙键断裂成为葡萄糖和果糖。而多数酶则能作用于化学键相似的某一类化合物称为相对专一性，例如脂肪酶不仅能水解脂肪，也能水解简单的酯类。还有一类酶只能作用于底物的立体异构物中的一种，例D-氨基酸氧化酶只能作用D-型氨基酸，对L-型则无作用，称为立体专一性。

正是由于酶具有高度的专一性，使得生物体内各错综复杂的代谢反应能按一定方向，有条不紊地进行。

(三) 酶的催化活性是受调节控制的：

体内酶的受控调节，是酶的重要性质之一，也是区别于一般催化剂的一个重要特征，代谢反应的顺序性，是体内酶受控制调节的表现，其调节方式，有在不同水平上调控酶的生成和降解；有通过酶原的激活来调节酶的活性，有通过反馈调节来控制酶的活性；还有通过同工酶和多酶复合体等来进行调控等。酶活性的调节是体内代谢调节的关键所在，是维持机体正常生命活动所不可缺少的，若酶活性失去了调控就会出现代谢紊乱，表现出疾病，甚至死亡。

三、酶的分子结构与催化活性的关系

(一) 酶的分子组成及辅酶与辅基

酶的化学本质是蛋白质，它和其它蛋白质一样，根据其化学组成可分为单纯蛋白质酶与结合蛋白质酶两类。单纯蛋白质酶的水解产物全为氨基酸，如唾液淀粉酶，胰蛋白酶、脂肪酶等水解酶类，其催化活性仅由它们的蛋白质结构所决定。而结合蛋白质酶类，则是由酶蛋白部分和非蛋白质的辅酶或辅基两部分组成，它们的催化活性除蛋白质部分外，还需要有非蛋白质的辅酶或辅基参加，只有酶蛋白和辅酶或辅基两部分结合成全酶后才具有催化活性：

酶蛋白 + 辅酶或辅基 = 全酶（结合蛋白）

非蛋白质的辅酶或辅基可以是金属离子，也可以是一种小分子的有机化合物，它们一般都具有下列特性：

(1) 对热稳定，不受蛋白变性剂的破坏。(2) 大多是B族维生素的衍生物，而参予酶的组成也正是B族维生素的主要功用。(3) 它们象底物一样参予反应，并在反应过程中发生化学变化。(4) 金属离子可参予构成酶的活性中心，或作为酶的辅酶的一个组成部分；有的则为稳定酶的催化活性所必需的构象；或将底物与酶螯合起来形成一种络合物，便于酶的作用等。(5) 辅酶一般与酶蛋白结合得较松，用透析法易从全酶中除去，如许多脱氢酶的辅酶，如 $C_{60}I$ ， $C_{60}II$ 等；辅基则与酶结合得较紧密，一般用透析法不易除去，而需经一定的化学处理才能与酶蛋白分开，例如许多黄酶类的辅基FAD或FMN，过氧化氢酶的铁卟啉等。

生物体内酶的种类很多，现已知的就约有两千种以上，但辅酶或辅基的种类则很少，所以用一种辅酶或辅基往往可和多种不同的酶蛋白合成为不同全酶，但一种酶蛋白却只能和一种辅酶或辅基结合而成为一种全酶。因此决定酶专一性的是蛋白质部分，辅酶或辅基仅在酶促反应中起传递电子，氢或转移某些化学基团的作用。表2-1即为某些酶的辅酶或辅基。

(二) 酶蛋白的结构与功能

1. 酶蛋白的氨基酸组成与肽链结构

根据酶蛋白分子的结构特点，可将其分为单体酶与寡聚酶两类。单体酶是由一条多肽链组成，例如胃蛋白酶，木瓜蛋白酶，溶菌酶，核糖核酸酶等，这类酶数不多，一般都属水解酶类，其氨基酸组成与肽链的结构如表 2-2 和图 2-1。

表 2-1 某些酶的辅酶与辅基

酶	辅酶或辅基	所含维生素
脱氢酶类	NAD 或 NADP	含尼克酸胺
黄素蛋白酶类	FAD 或 FMN	含核黄素
转氨酶类	B ₆ — ⑤	含吡多素
脱羧(羧化)酶类	TPP	含硫胺素
乙酰化酶类	C ₀ A	含泛酸
过氧化氢酶	铁卟啉 (Fe ⁺⁺ / Fe ⁺⁺⁺)	
细胞色素	铁卟啉 (Fe ⁺⁺ / Fe ⁺⁺)	
细胞色素氧化酶	" "	
抗坏血酸氧化酶	Cu ⁺ / Cu ⁺⁺)	
酪氨酸酶	"	
碳酸酐酶	Zn ⁺⁺	
精氨酸酶	Mn ⁺⁺	
固氮酶	Fe ⁺⁺ , Mo ⁺⁺	

寡聚酶则是由几条甚至几十条多肽链亚基组成，各肽链或是相同的或是不相同的。多肽链间不是共价结合，彼此容易分开。例如磷酸果糖激酶，果糖二磷酸酶，己糖激酶，丙酮酸磷酸激酶，3-磷酸甘油醛脱

氢酶，磷酸化酶a等为数甚多，并且其中许多是属调节酶类，分子量大，可从几万到几百万。

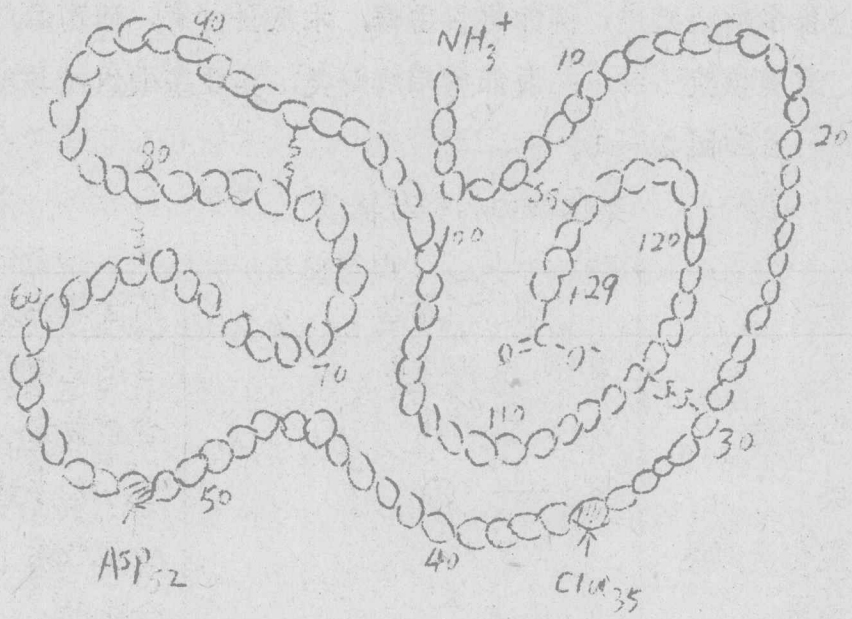


图 2 - 1 溶菌酶的氨基酸序列

表 2 - 2 某些酶的氨基酸组成

名 称	分子量	N一端	C一端	氨基酸数目
卵清溶菌酶	14600	Lys	Leu	1 2 9
牛胰核糖核酸酶	13700	"	Val	1 2 4
木瓜蛋白酶	23000	ILeu	Asn	2 1 2
胃蛋白酶	34500	"	Ala	3 2 7
羧肽酶A	34600	Ala	Asn	3 0 7

2 酶的活性中心

酶是生物大分子，其在催化反应中仅是它的某一小区域发生作用。例如木瓜蛋白酶是由 212 个氨基酸组成，用蛋白酶处理从 N 一端切去三分之二肽段后剩下的“碎片”仍有活性，这表明一个大而完整的酶蛋白分子中，只有很小一部分是与底物结合并与催化作用有关。酶分子中的这一区域便称为活性中心。酶的活性中心，又常按其功能分为与底物结合的部位和参与催化作用的部位，它们通常是酶蛋白分子的一条或几条多肽链上少数几个氨基酸的功能基（如组氨酸的咪唑基，丝氨酸的羟基，半胱氨酸的巯基，门冬氨酸的游离羧基，赖氨酸的游离氨基等）所组成；它们在一级结构上可能相距很远，但通过肽链的折迭盘曲，在空间位置上则相互靠近。例如由 124 个氨基酸组成的牛胰核糖核酸酶的活性中心，便是由其单一肽链中的 12 位和 119 位的组氨酸和 41 位的赖氨酸这三个氨基酸通过其肽链的盘曲和四个二硫键的固定使其在空间靠近而形成的。酶蛋白的空间构象的完整性与酶的活性中心的形成有着密切的关系，只有酶活性中心的必需基团处于适当的空间位置，酶才具有活性。当外界理化因素使酶蛋白变性，破坏了酶的空间结构时，肽链伸展，酶的活性中心不能形成，酶的活性也就丧失。（酶的活性中心示意，如图 2-2）。

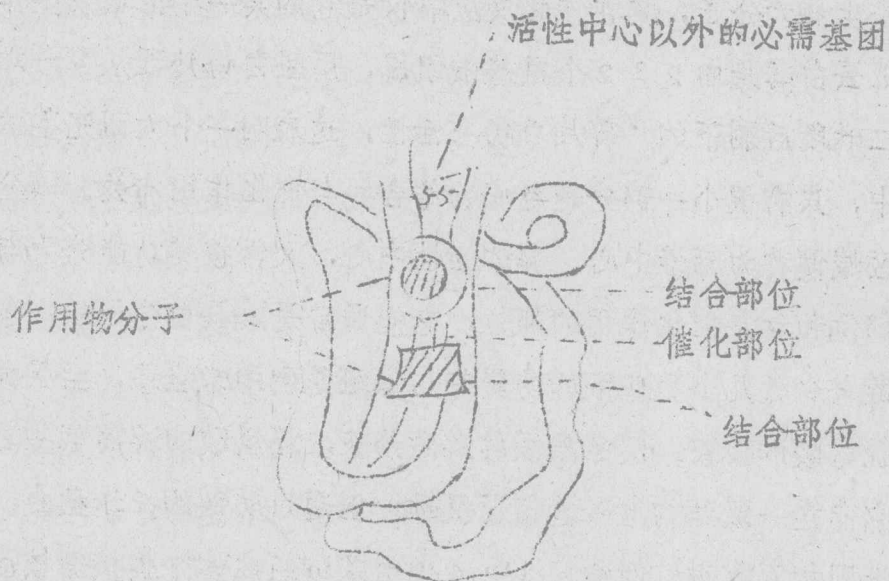


图 2 - 2 酶的活性中心示意图

II、酶作用的机理

酶作为催化剂的主要特征，就是能加速化学反应的速变。但是酶为什么比一般催化剂的催化效率高？这是一个长期以来人们希望了解的问题。在近几十年的研究中曾提出过多种关于酶作用机理的学说，但六十年代以前则多侧重于考虑底物的变化，即底物的活化；六十年代以来，包括从模拟酶和 X 光衍射等大量实验研究中，更看到了酶本身功能基团及空间构象在催化反应中的作用。这对酶催化机理的认识是一个重大的突破。但是酶催化的机理是一个极其复杂的问题，目前还很难总结出一个统一的规律来，现仅能从酶的基本催化反应和一些使酶促反应加快的因素作些介绍，以有助于对酶作用机理的了解。

一、酶促反应与分子活化能

酶为什么具有极高的催化效率？一般认为酶的催化作用主要是降低了反应所需要的活化能。根据化学动力学原理，仅有分子的碰撞并不一定能发生化学反应，更不是所有分子的每一次碰撞都能导致反应。因为在一个化学反应系统中，各反应物分子所含的能量是高低不同的，而只有那些能量达到一定值（称为能阈）的活化分子，亦即处于活化状态的分子才能发生反应，活化的分子数目越多，反应的速度就越快。所谓活化能，就是反应物由常态（基态）变为活化状态所需要的能量，亦即高出基态的这部分能量。在化学反应中，通常提供活化能的方式有两种：一是直接提供能量，如加热，光照等增加分子的动能使分子活化；二是降低反应的能阈，即降低反应所需要的活化能。但体内的化学反应不能依靠加热和光照的方式来供应活化能（因高温、强光等会使蛋白质变性，危害生命），而是靠酶的作用使底物分子活化，降低反应的能阈，使活化分子数在相同条件下相对增加，从而使反应大大加速。例如双氧水的分解反应，每克分子需要18000卡活化能，而在过氧化氢酶的催化下，进行反应反应所需的催化能便降到了2000卡/克分子，此时反应的速度便可增高4万倍以上。酶促反应与外酶反应活化能的关系，如图2-3所示：

基态与活化态底物分子自由能的差值，即为酶促反应所提供的活化能，或被有效降低的反应能阈，即：

$$\Delta G = G_{\text{活化态}} - G_{\text{基态}}$$

酶能有效的降低反应的能阈，正是酶催化效率高的原因。

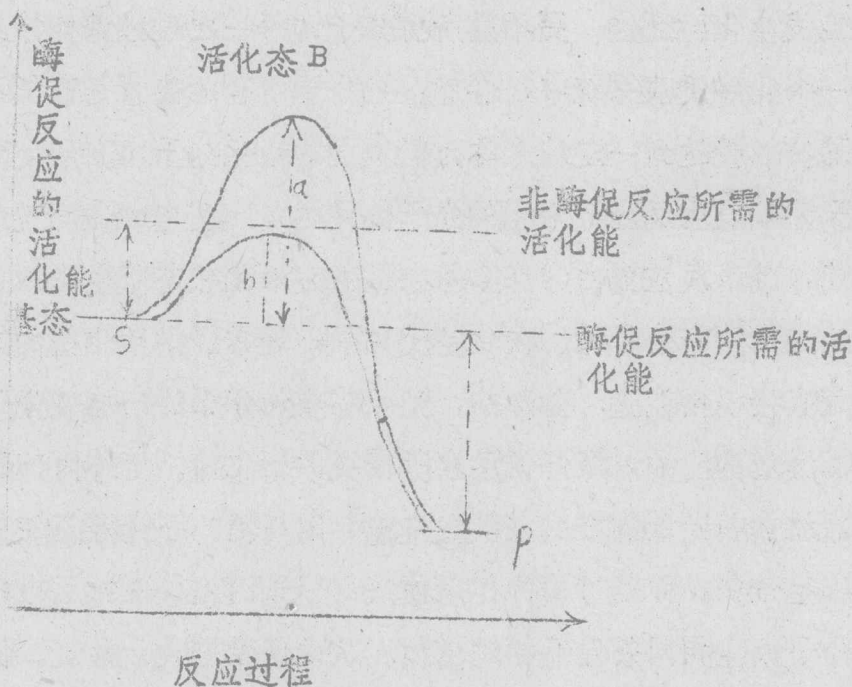


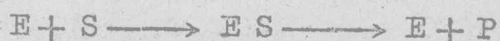
图 2 - 3 酶促反应与非酶促反应的活化能关系

二、酶——底物复合物

酶如何能降低反应所需的活化能而使反应加速？目前一般认为，酶与一般催化剂不同的就在于酶参予化学变化过程。虽然酶在反应前后不变，但它在反应过程中与底物结合形成过渡态的中间复合物，改变了反应的原来途径和使底物分子内的某些化学键发生极化，呈不稳定的或称活化的状态。这种活化态的分子极易放出能量而转变成为产物，结果反应所需的活化能大大降低，反应便随之加速。

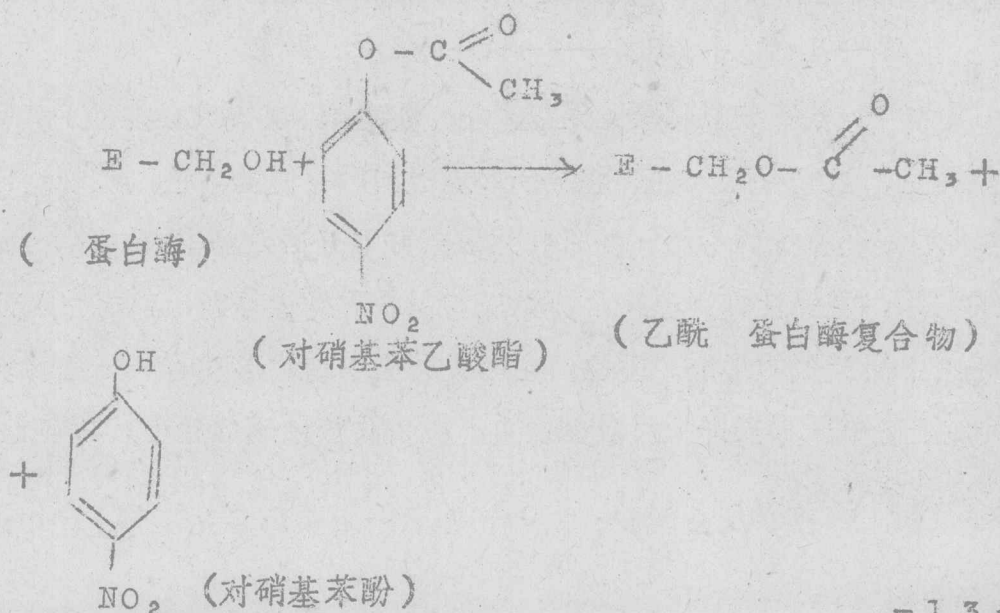
着以 S 代表底物， P 为产物， E 为酶， B 或 ES 为中间复合物，则无酶催化时，原来的反应途径： $S \longrightarrow P$ ，所需的活化能为上图中的

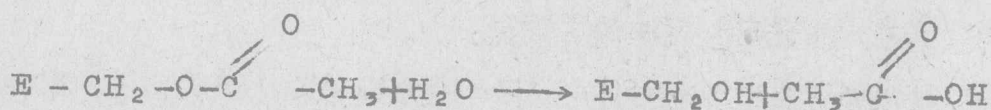
a; 当有酶催化时, 反应途径则为:



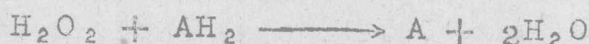
即反应过程分两步进行：酶先和底物结合形成中间复合物，所需活化能能为 b ；而 b 比 a 小的多，故酶促反应所需的活化能比无酶催化的反应所需的活化能要少得多。

酶与底物结合形成中间复合物之所以能降低反应所需的活化能。则主要是由于酶蛋白分子的空间结构与活性中心提高了与底物间相互结合的亲和力，既加速了酶——底物复合物的形成率，又使底物分子的电子分布发生改变，致某些键发生松弛，因而在较低的能量状态下，即可断裂形成新键，生成产物。关于酶促反应中酶——底物复合物的形成，已得到了大量的实验证明。例如近年来在研究糜蛋白酶催化对硝基乙酸酯的反应中，观察到当底物对硝基苯乙酸酯与糜蛋白酶接近时，酯键键能减弱而断裂，乙酰基便连接在糜蛋白酶活性中心的195位丝氨酸残基的羟基氧原子上，而迅速生成乙酰糜蛋白酶复合物，和对硝基苯酚。随后，乙酰糜蛋白酶复合物再水解生成乙酸并释放出酶。在 $\text{PH}3$ 时乙酰糜蛋白酶复合物极稳定，可分离出来，而直接证明了ES复合物的存在。

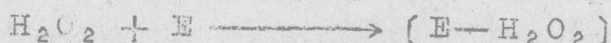




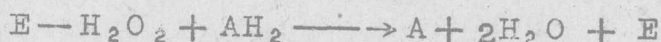
此外，过氧化氢酶，过氧化物酶等的吸收光谱，也可对酶——底物复合物的存在得到间接的证明。过氧化氢酶和过氧化物酶分子中均含有铁卟啉，各自均有特殊的吸收光谱，当它们与底物接触，便出现了另一些波长的吸收光谱表明有中间物的存在。例如过氧化物酶可催化 H_2O_2 去氧化其它物质，如焦性没食子酸 (AH_2)，使 H_2O_2 还原成水：



过氧化物酶溶液呈红褐色，并在 645，583，548 和 498 $m\mu$ 处有四条吸收光谱，当加入 H_2O_2 后，酶液由褐色变为红色，同时吸收光谱也改变成为 561 和 530 $m\mu$ 的两条吸收光谱了。这就说明酶与底物过氧化氢结合形成了一种新的物质——中间复合物。



若再加入被氧化的底物焦性没食子酸 (AH_2)， H_2O_2 被分解， AH_2 被氧化成氧化产物 A ，此时复合物的上述两条吸收光谱消失，原来的四条吸收光谱又重出现，表明反应完成，酶又被释放出来：



又如 D-氨基酸氧化酶，是以 FAD 为辅酶，其氧化型呈黄色，还原型无色，当它与 D-氨基酸结合形成中间产物便呈紫色，吸收光谱也与氧化型或还原型不同，并可在无氧条件下分离结晶出来。此外动力学的结果，竞争性抑制现象，酶受底物保护不变性等等，都有力的证明了确有中间产物的形成。因此，在酶促反应中通过形成酶——底物复合物的过渡态中间物来降低反应的能阈，促使反应加速的机理，目前已被公认为具有普遍性。