

酶反应动力学和发酵动力学

刘明伟
Mingwei Liu

E-Mail: lmingwei@gmail.com
Website: www.bioinfoserv.org

提纲

1. 酶的催化特性与反应动力学
2. 发酵动力学

1. 酶的催化特性与反应动力学

1.1 酶催化作用特点：

A. 专一性

绝对专一：催化一种底物（立体异构专一性）

相对专一：催化一类结构相似底物

专一性催化学说：

◆ 锁钥学说：

◆ 诱导契合学说

键专一：酯酶水解脂类

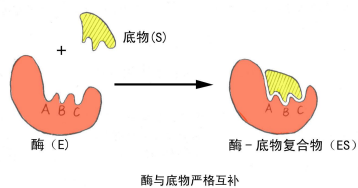
基团专一：胰蛋白酶：

赖氨酰-羧基肽键

精氨酰-羧基肽键

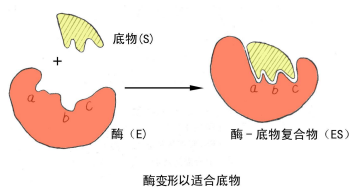
锁-钥匙学说（Fisher, 1890）-刚性模板理论

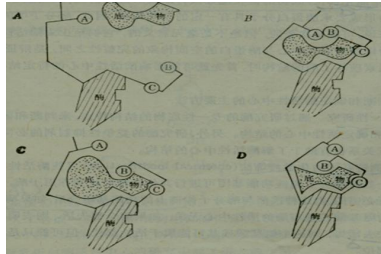
酶的天然构象是刚性的，如果底物分子结构上存在着微小的差别，就不能契入酶分子中，从而不能被酶催化。



诱导-契合假说（Koshland, 1958）

当酶分子与底物接近时，酶蛋白受底物分子的诱导，其构象发生了有利于底物结合的变化，酶与底物在此基础上互补契合，进行反应。





酶专一性催化时的构象变化

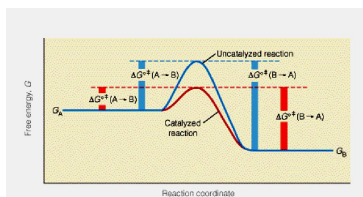
专一性的确定步骤

- (1) 选择酶作用底物，通过实验确定酶催化反应的条件；
- (2) 试验底物对反应速度影响，确定 K_m 和 V_{max} ；
- (3) 选取底物结构类似物，根据酶的催化反应情况确定专一性类型：绝对/相对专一；
- (4) 确定最适催化底物；
- (5) 光学异构试验，确定专一性的立体异构性。

B. 催化效率高

■ 酶催化转换系数高 (10^3min^{-1})

- ✓ 转换系数 k_3 ：当底物浓度很高时， $V_{max} = k_3[E] = k_3[E]_0$ ， k_3 ：当酶被底物饱和时，每秒钟每个酶分子转换底物的分子数 (简称 TTN)，又称为催化常数 (catalytic constant, k_{cat})， k_{cat} 值越大，表示酶的催化效率越高。



活化能显著低

碳酸酐酶： $3.6 \times 10^5 \text{min}^{-1}$
(1) 酶催化反应速度 $\sim 10^5 \sim 10^6$
非酶催化反应速度
(2) 活化能显著降低

1.2 酶催化作用机理：

酶的活性中心：酶分子中直接与底物结合，并和酶的催化作用直接有关的部位。

- (1) 结合基团：与S结合的基团。
- (2) 催化基团：直接参与催化反应的基团。

酶的活性部位：决定酶的专一性和催化性质。
活性部位的基团都是必需基团。

1.3 酶催化速度理论

■在反应体系中，任何反应分子都有进行化学反应的可能，但只有能量达到或超过某—限度（能阈）的活化分子，才能在碰撞中起化学反应。

■**能阈——活化能：**活化分子处于活化态，活化态与常态的能量差，也就是分子由常态转变为活化态所需的能量称为活化能。
达到或超过能阈的分子——活化分子

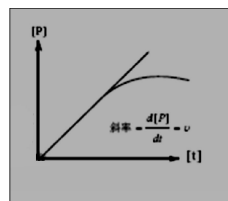
■活化分子越多——反应速度越快。

提高活化分子数量的途径：
①对反应体系加热，照射
②降低活化能

热力学：研究一个反应能否进行，进行的程度（反应物转化成产物的多少），只考虑始态、终态，不考虑历程（如何反应）。

化学动力学：研究反应速度、反应条件对速度的影响；反应步骤；反应机理。

酶催化反应动力学：研究酶催化反应的速度和影响此速度的各种因素以及反应历程。



1.4 酶催化反应动力学

1.4.1 单底物酶催化反应体系反应动力学

A. 中间复合物学说(可逆)

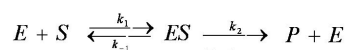


B. Michaelis—Menten快速平衡学说(不可逆)



1.4.2 双底物酶催化反应动力学

1.4.1 单底物酶催化反应体系反应动力学



米氏方程:
$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

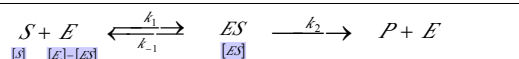
米氏常数:
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

■ **推导原则:** 从酶被底物饱和的现象出发, 按照“稳态平衡”假说的设想进行推导。

■ **推导前提假设:** $k_2 \ll k_{-1}$ (ES分解反应对平衡的影响忽略, 不可逆)

■ **符号意义:** E—游离酶, ES—酶与底物的复合物; S—底物; P—产物; k_1 , k_{-1} , k_2 —各步反应相应的反应速率常数。

米氏方程的推导



[ES]生成速度: $v_1 = k_1([E] - [ES])[S]$ [ES]分解速度: $v_2 = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

当酶反应体系处于恒态时 $v_1 = v_2$

即 $k_1([E] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \rightarrow \frac{[E][S] - [ES][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$

令 $\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_m$ 则 $K_m[ES] + [ES][S] = [E][S]$

经整理得 $[ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (1)$

由于酶促反应速度由[ES]决定, 即 $v = k_2[ES]$ 所以 $[ES] = \frac{v}{k_2} \quad (2)$

将(2)代入(1)得 $\frac{v}{k_2} = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \rightarrow v = \frac{k_2[E][S]}{K_m + [S]} \quad (3)$

当[ES]=[E]时 $v = V_m$ 所以 $V_m = k_2[E]$ (4)

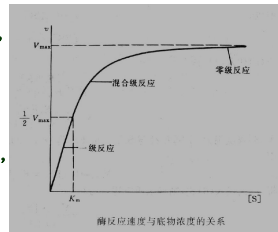
将(4)代入(3), 则
$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

底物浓度[S]、酶催化反应速度V及底物浓度[S]关系

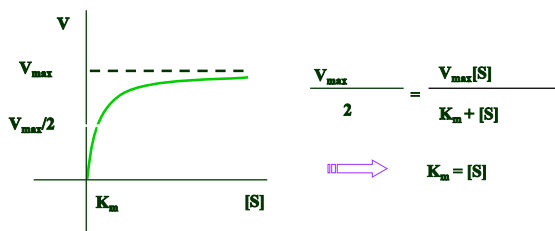
■ **一级反应**：当底物浓度较高时，反应速率与底物浓度成正比。
($V=V_{\max}[S]/K$)

■ **零级反应**：当底物浓度较低时，反应速率与底物浓度无关
($V=V_{\max}$)。酶的活性中心被底物全部占据。

■ **米氏常数**： $V=1/2V_{\max}$, $[S]=K_m$, 酶活性中心被底物占据一半。



米氏常数 K_m 意义



∴ K_m 值等于酶促反应速度为最大反应速度一半时的底物浓度：
 $v = 1/2V_{\max}$, $[S] = K_m$, 单位是 mol/L 。

(1) K_m 是酶的特性常数

与 pH 、温度、离子强度、酶及底物种类有关，与酶浓度无关，可以鉴定酶。有的酶可作用于几种底物，具有多个 K_m 值。

酶	底物	$K_m(\text{mmol/L})$
脲酶	尿素	25
溶菌酶	6-N-乙酰葡萄糖胺	0.006
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	6-磷酸-葡萄糖	0.058
胰凝乳蛋白酶	苯甲酰酪氨酸胺	2.5
	甲酰酪氨酸胺	12.0
	乙酰酪氨酸胺	32.0

(2) 判断酶的专一性和天然底物：酶与底物之间的亲和程度

K_m 值最小的底物——最适底物/天然底物

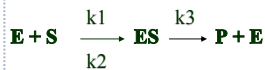
$1/K_m$ 近似表示酶对底物的亲和力：

$1/K_m$ 越大、亲和力越大

$k_2 \gg k_3$ 时

$K_m \approx k_2$ (分离能力) / k_1 (亲和能力)

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

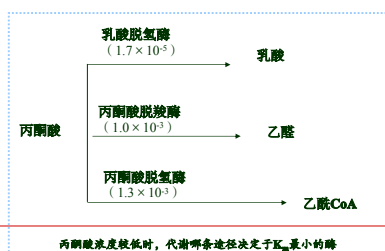


K_m 越小，亲和力越强，催化活性越高
 $[S]$ 很小时，反应速度就能达到很大。性能优，代谢中这类酶更为重要

(3) 根据 K_m 判断某 $[S]$ 浓度下， v 与 V_{max} 的关系；判断抑制剂的类型

(4) K_m 帮助判断某代谢反应的方向和途径

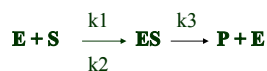
催化可逆反应的酶对正/逆两向底物； K_m 不同 —— K_m 较小者为主要底物



V_{max} 和 k_3 (k_{cat})

一定酶浓度下，酶对特定底物，其 V_{max} 也是一个常数。

$[S]$ 很大时， $V_{max} = k_3[E]$ 。



k_3 表示当酶被底物饱和时，每秒钟每个酶分子转换底物的分子数（即转换数或催化常数 k_{cat} ）： k_{cat} 越大，酶的催化效率越高

酶催化反应动力学数据处理（ K_m 与 V ）

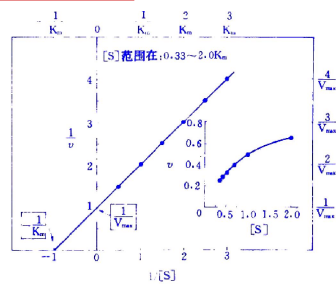
A. Lineweaver-Burk法(双倒数作图法):

应用前提: 底物浓度需在 K_m 附近

具体做法: 将实验所得的一些初速度数据 v 和 $[S]$ 取倒数, 得各种 $1/v$ 和 $1/[S]$, 将 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图, 得一直线。该直线纵截距 $=1/V_{max}$, 斜率 $=K_m/V_{max}$, 横截距 $=-1/K_m$ 。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$[S]$ 在 $0.33 \sim 2.0 K_m$ 的范围的实验结果而作出的双倒数图。



米氏方程的双倒数作图

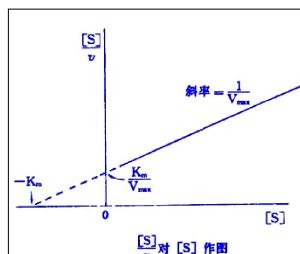
$[S]$ 在 $0.33 \sim 2.0 K_m$ 范围内的实验数据所作的图。

蔗糖酶米氏常数（ K_m ）的测定

1. 配12支蔗糖底物溶液, 浓度分别为0、0.005、0.00625、0.0075、0.00875、0.010、0.0125、0.015、0.02、0.025、0.0375、0.050M, 在 35°C 水浴保温;
2. 加入3U/ml已在 35°C 水浴保温的酶溶液, 准确作用5分钟, 终止反应;
3. 各吸取0.5ml反应液与3, 5-二硝基水杨酸, 沸水浴5分钟, 冷却后在540nm测定吸光度OD值;
4. 作图

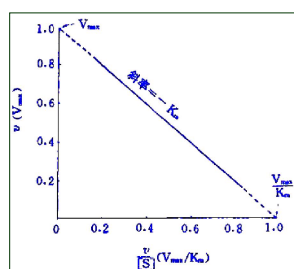
B. Hanes-Woolf作图法

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{\max}} [S] + \frac{K_m}{V_{\max}}$$



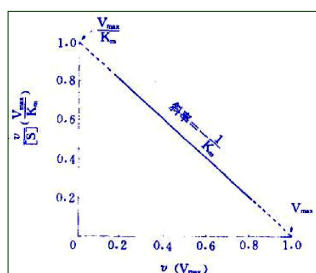
C. Woolf-Augustinsson-Hofstee作图法

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + V_{\max}$$

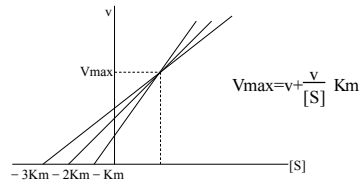


D. Eadie-Scatchard作图法

$$\frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m} v + \frac{V_{\max}}{K_m}$$



E. Eisinger和Cornish-Bowden线性作图法



酶反应的影响因素

- A. 抑制剂对酶反应的影响
- B. 温度对酶反应的影响
- C. pH对酶反应的影响

抑制剂的作用方式

- A. **不可逆抑制**: 抑制剂与酶反应中心的活性基团以共价形式结合, 引起酶的永久性失活。
- B. **可逆抑制**: 抑制剂与酶蛋白以非共价方式结合, 引起酶活性暂时性丧失。可通过透析等方法恢复/部分恢复活性。

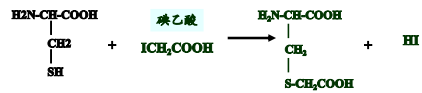
非专一性不可逆抑制剂

①重金属离子: Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+}

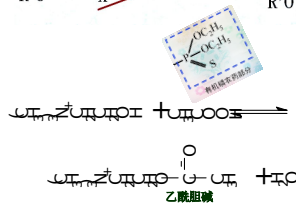
高浓度时可使酶蛋白变性失活;
低浓度时对酶活性产生抑制。

加入**EDTA**解除

②烷化剂 (多为卤素化合物)



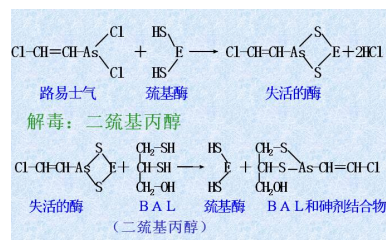
③有机磷化合物 (敌百虫、沙林)



排毒
洗胃、喝鸡蛋清牛奶
导泄、利尿
血液透析 (清除游离状态毒物)
解毒药: 解磷定

积累导致神经中毒症状

④有机汞、有机砷化合物



⑤氰化物、硫化物和CO

——与酶中金属离子形成稳定的络合物
如氰化物与含铁卟啉细胞色素氧化酶结合

⑥青霉素 (penicillin)

与细菌糖肽转肽酶Ser-OH活性,
影响细胞壁合成。

专一性不可逆抑制剂

Ks型: 具有底物类似的结构——(设计); 带有一活泼基团; 与必需基团反应(抑制)

∴ 利用对酶亲和力进行修饰
∴ 亲和标记试剂 (affinity labelling reagent)

Kcat型: 具有底物类似的结构; 本身是酶的底物; 还有一潜在的反应基团

可逆抑制

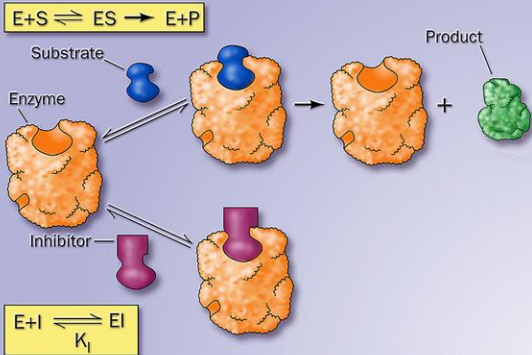
非共价键结合, 抑制作用可通过透析等方法除。

竞争性抑制(competitive inhibition):
结构类似物, 竞争酶活性中心, 通过增大底物浓度来恢复。

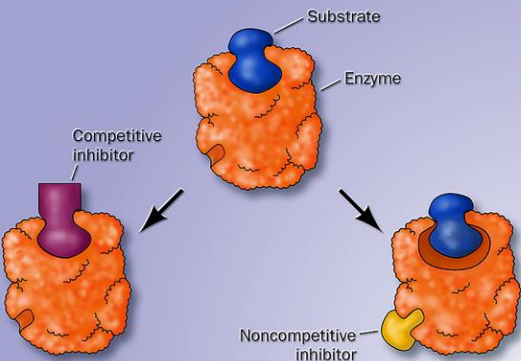
非竞争性抑制(non-competitive I.):
不竞争活性中心

反竞争性抑制(uncompetitive I.):
酶与底物结合后抑制剂才能和酶结合

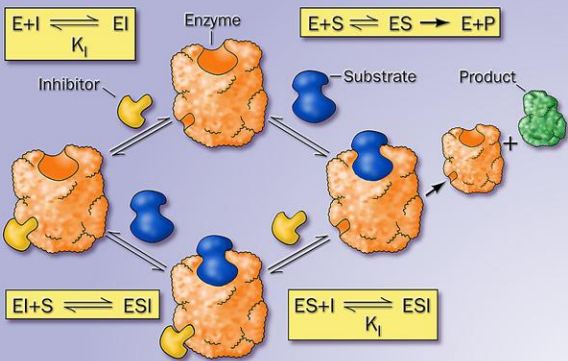
Competitive Inhibition



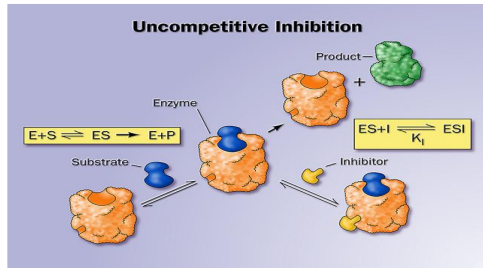
Competitive and Noncompetitive Inhibitors



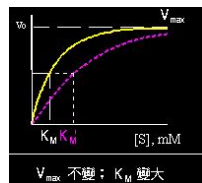
Noncompetitive Inhibition



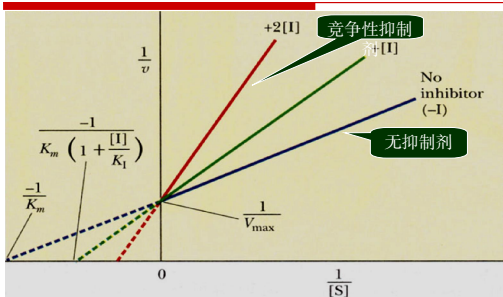
□ 酶与底物结合后抑制剂才能和酶结合

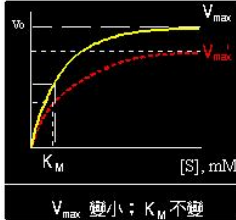


- 加入竞争性抑制剂后， K_m 变大，酶促反应速度减小：
- (1) V 下降，发生抑制
 - (2) V_{max} 不变（底物浓度增大，抑制剂结合机率减小）
 - (3) K_m 增大，亲和力下降

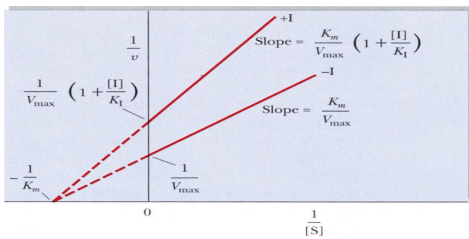


$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_m}$$





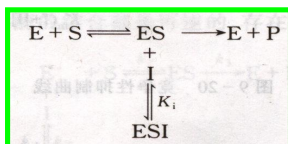
- (1) V 下降, 发生抑制
 (2) $V_{\max}$ 减小 (一部分酶始终失活)
 (3) K_m 不变, 酶与底物亲和力不受影响



$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

(Y) = m (X) + b

●酶先与底物结合, 然后才与抑制剂结合, 存在以下平衡:



$$\text{双倒数式: } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

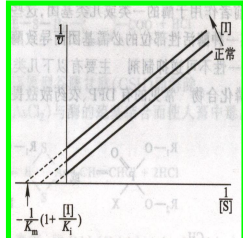
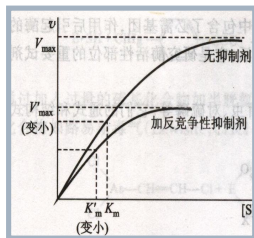
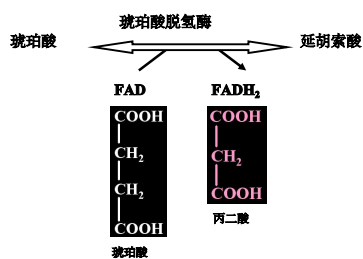


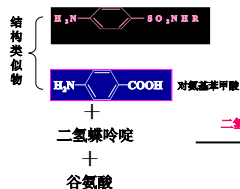
表 9-6 不同类型可逆抑制作用的米氏方程和常数

类型	方程式	$V_{\max}$	K_m
无抑制剂	$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$	$V_{\max}$	K_m
竞争性抑制	$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$	不变	增加
非竞争性抑制	$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$	减小	不变
反竞争性抑制	$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)[S]}$	减小	减小

丙二酸与琥珀酸竞争琥珀酸脱氢酶竞争



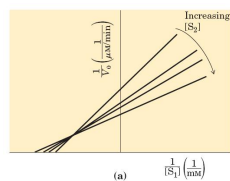
磺胺类药物的抑菌机制



与对氨基苯甲酸竞争二氢叶酸合成酶，竞争性抑制细菌叶酸形成，抑制细菌繁殖。人通过食物直接补充叶酸，对人无毒害。

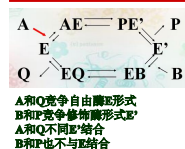
1.4.2 双底物反应的动力学方程

A、序列机制的底物动力学方程及动力学图



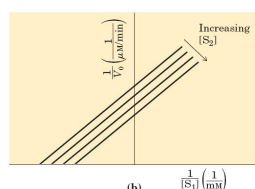
K_m^A —— 在 B 的浓度达到饱和时 A 的米氏常数
 K_m^B —— 在 A 的浓度达到饱和时 B 的米氏常数
 K_s^A —— 底物 A 与酶结合的解离常数
 $V_{\max}$ —— 底物 A、B 都达到饱和时最大反应速率

B、乒乓机制的底物动力学方程及动力学图



$v = \frac{V_{\max} \cdot [A] [B]}{[A] [B] + [B] K_m^A + [A] K_m^B}$

K_m^A —— 在 B 的浓度达到饱和时 A 的米氏常数
 K_m^B —— 在 A 的浓度达到饱和时 B 的米氏常数
 $V_{\max}$ —— 底物 A、B 都达到饱和时最大反应速率



2. 发酵动力学

- 分子水平动力学：酶催化
- 细胞水平动力学：微生物发酵
- 群体动力学：废水生物处理

发酵动力学

是研究生物反应过程的速率及其影响因素，是生物反应工程学的理论基础之一。

研究各种环境因素与微生物代谢活动之间的相互作用随时间变化的规律的科学。用数学模型定量地表达发酵过程中各种与生长、基质代谢、产物生成有关的因素，是发酵动力学研究的重要方法。

●**本征动力学**：微观动力学，在没有传递等工程因素影响时，生物反应固有的速率。该速率除反应本身的特性外，只与各反应组分的浓度、温度、催化剂及溶剂性质有关，而与传递因素无关。

●**反应器动力学**：宏观动力学，在一反应器内所观测得到的总反应速率及其影响因素，这些影响因素包括反应器的形式和结构、操作方式、物料的流动与混合、传质与传热等。

2.1 产物合成动力学

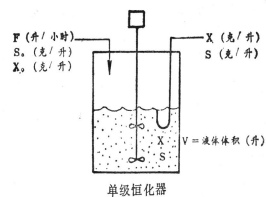
在连续培养的条件下，由生长、基质利用和产物形成的物料平衡方程，可以看出产物的形成与生长和细胞浓度的关系

(1) 细胞的生长

细胞量的积累速率 = 细胞生长速率 - 细胞消失速率

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{F_0 X}{V}$$

X—菌体浓度
 μ —比生长速率
 F_0 —培养液移走速率
V—培养液体积



(2) 基质的利用

基质的消耗速率 = 补料中基质的添加速率 - 生长消耗基质的速率 - 产物合成用去基质的速率 - 维持所消耗基质的速率 - 基质的移去速率。

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_p S_0}{V} - \frac{\mu X}{Y_{x/s}} - \frac{q_p X}{Y_{p/s}} - mX - \frac{F_0 S}{V}$$

S —基质浓度

F —补料速率

$Y_{x/s}$ —以消耗的基质为基准的细胞得率系数 (g细胞/g消耗的基质)

$Y_{p/s}$ —以消耗的基质为基准的产物生成系数, 即转化率 (g产物/g消耗的基质)

q_p —产物的比生产速率。它的意义是单位浓度的生产菌细胞在单位时间形成的产物量。其数学表达式为

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad q_p = Y_{p/s} \cdot \mu$$

P —产物的浓度; $Y_{p/s}$ —单位质量细胞生成的产物量 (g产物/g细胞)

m —维持系数, 表示单位浓度的细胞在单位时间里用于细胞物质的转化、营养物质的运输、产物的分泌等生命活动所消耗的基质量

(3) 产物的形成

产物形成的速率 = 产物合成速率 - 产物移去速率 - 产物被破坏速率

$$\frac{dP}{dt} = q_p X - \frac{F_0 P}{V} - KP$$

K —产物破坏常数

2.2 代谢产物形成的动力学模型

产物生成速率与细胞生长速率之间的关系

●**类型 I**: 相关模型, 产物形成伴随细胞生长 (产物生成与细胞的生长相关)

●**类型 II**: 部分相关模型, 产物形成不完全伴随细胞生长

●**类型 III**: 非相关模型, 产物形成不伴随细胞生长。细胞生长阶段时, 无产物积累, 而当细胞停止生长, 产物却大量生成。一般又称为次级代谢

三种代谢产物产率动力学方程

I

$$r_p = Y_{p/x} r_x = Y_{p/x} \mu X$$
$$q_p = Y_{p/x} \mu$$

II

$$r_p = \alpha r_x + \beta X$$
$$q_p = \alpha \mu + \beta$$

III

$$r_p = \beta X$$
$$q_p = \beta$$

μ — 比生长速率

q_p — 产物的比生产速率

$Y_{p/x}$ — 单位质量细胞生成的产物量

