

酵素簡介

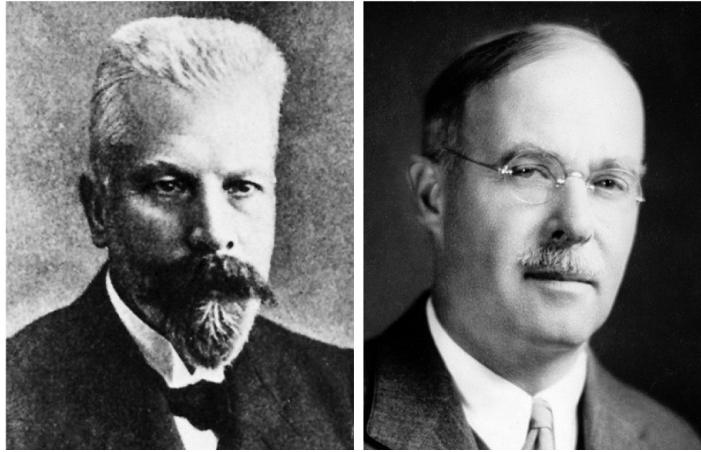
《緒論》

1. 生物體具有執行多種化學反應的能力，使反應可在環境變異下快速進行，且多種反應間可相互協調
2. 生物體內的化學反應通常在溫和的環境中進行，但其反應的調控則是嚴格但有彈性
3. 許多在實驗室需加熱、加酸或加鹼才能發生的反應，在生物體(體溫約 37°C 、pH值近中性)卻可迅速進行，即因生物體有酵素(生物催化劑)的存在

4. 大部份的酵素為蛋白質，有些酵素需非蛋白質的有機成分(如維生素衍生的輔酵素)或金屬離子(輔因子)的協助才具有催化活性
5. 雖然“酵素”一詞遲至1877年才被提出，但人類早已發現酵素的作用，例如酵母細胞會加速由糖變成酒精的發酵作用，分離出的胃消化液可加速肉類的分解等
6. 當時，許多科學家認為“活”的酵素(酵母細胞)與“沒有生命”的胃消化液是不同的東西(生機論)，但德國生理學家Kühne則提出後者是所謂的“酵素”(enzyme，原文取自於希臘字in yeast即“在酵母中”的意思)，Kühne認為胃消化液的催化活性與酵母細胞是相同的(機械論)

7. 1897年，德國化學家Büchner*以砂粒磨碎酵母細胞並成功取得可產生相同發酵作用的細胞抽取液，終止了生機論與機械論的爭論，Büchner因此貢獻獲得1907年諾貝爾化學獎

8. 接著，酵素的本質開始被研究，由於酵素只要稍微加熱就會變質，因此許多生物化學家懷疑酵素的本質就是蛋白質，此論點直到Sumner*與Northrop等人(1926至1930年間)成功地將許多酵素結晶並證明其成分為蛋白質後才得以確立，Sumner與Northrop因此貢獻同獲1946年諾貝爾化學獎



Eduard Buchner (1860 ~ 1917), 左

- **1907**年諾貝爾化學獎

Biochemical researches and discovery of cell-free fermentation

James Sumner (1887 ~ 1955), 右

- **1946**年諾貝爾化學獎

Discovery that enzymes can be crystallized

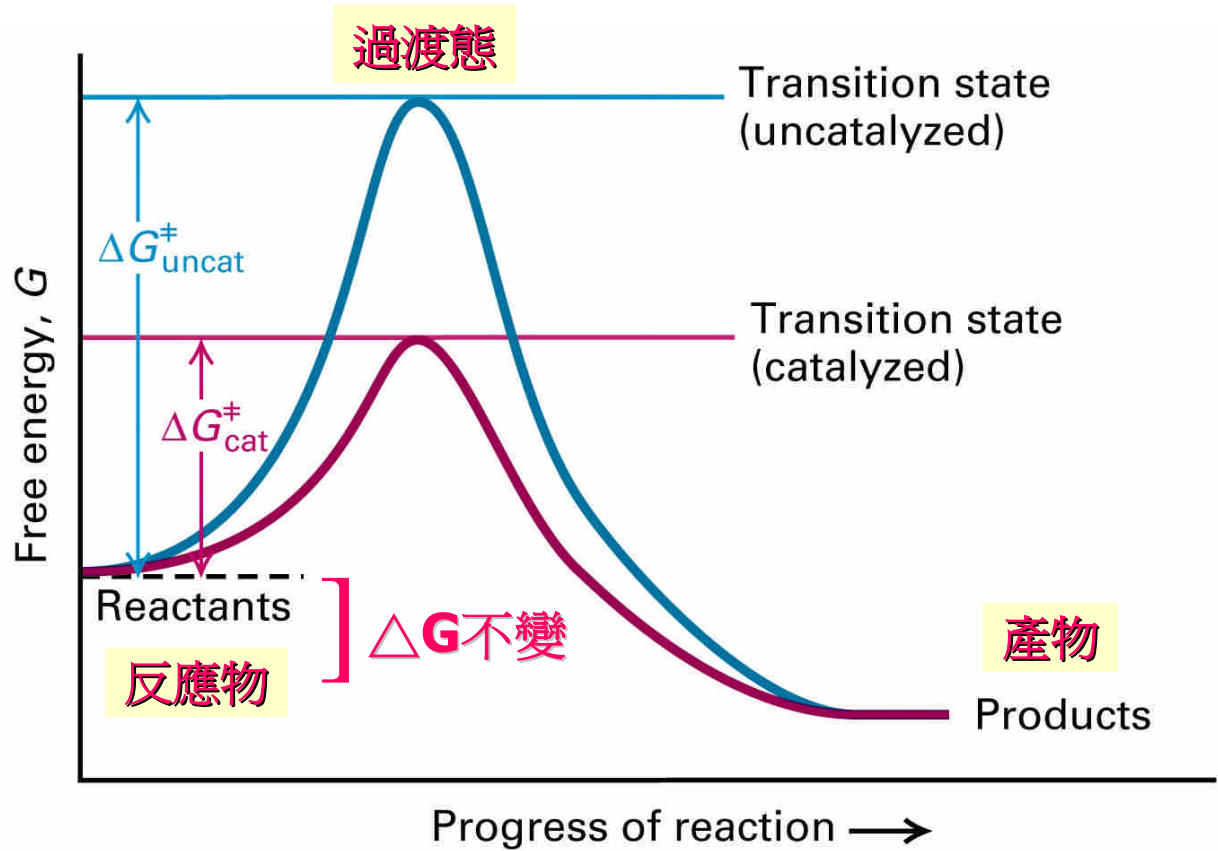
《酵素的重要》

1. 任何細胞都含有許多酵素，細胞內所有重要反應的進行速度才能因應細胞的生理要求，生物才能生存，生命才得以延續，因此生物的一切特性都是由酵素造成，酵素的重要性可由“Life is a system of cooperating enzyme reactions”的敘述看出
2. 酵素是一些疾病的原因，如**先天性代謝異常**患者通常是體內缺乏特定酵素所引起的(如半乳糖血症因患者缺乏將半乳糖轉變成葡萄糖的酵素而導致血液中的半乳糖含量過高；而苯酮尿症患者則是缺乏將苯丙胺酸代謝成酪胺酸的酵素)，先天性代謝異常若無法及早診斷與治療，通常會造成嚴重的智障等

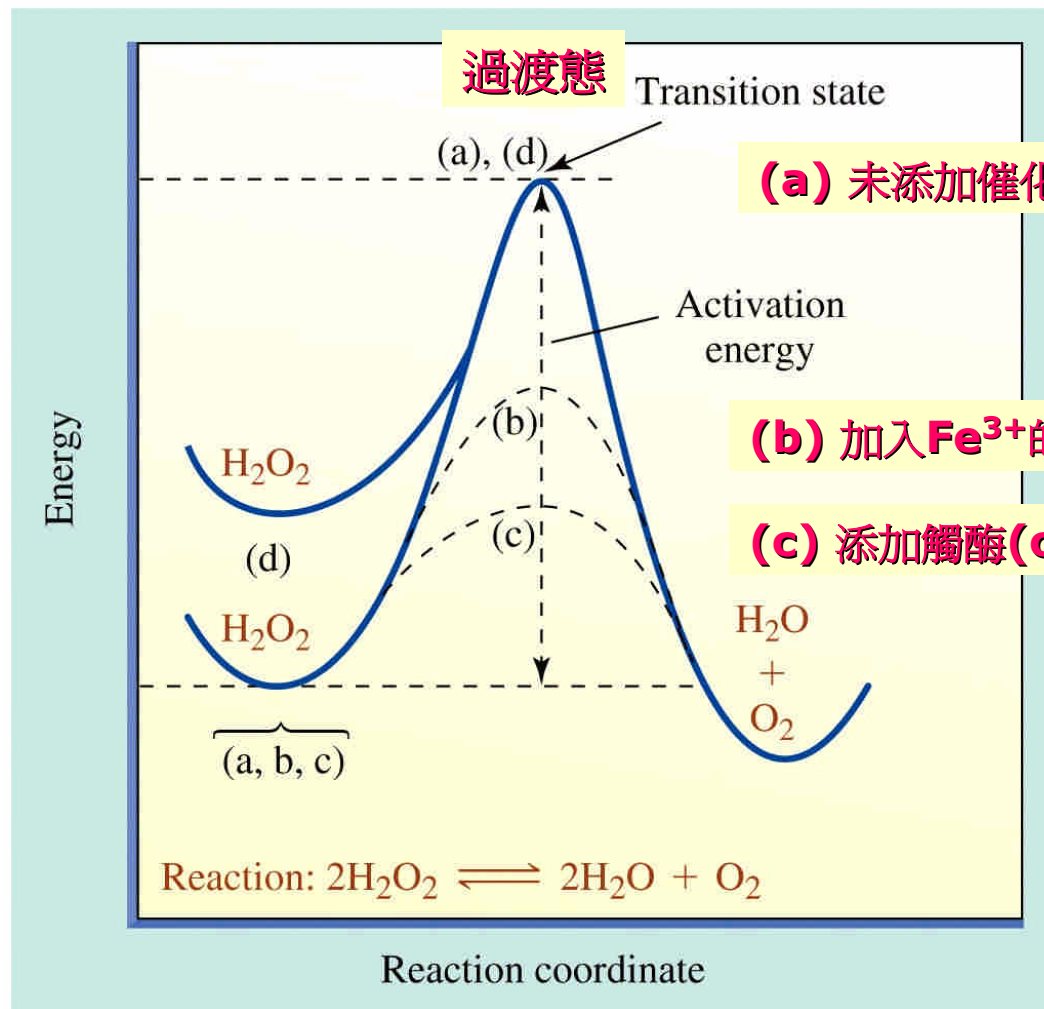
3. 有機磷殺蟲劑的使用或氰化物中毒及鉛中毒等都是因此類物質會阻害重要反應過程中的酵素活性，如有機磷殺蟲劑會阻斷神經傳導，而氰化物會阻斷呼吸鏈
4. 有些抗菌藥物會干擾細菌的酵素系統，但不致於嚴重影響宿主體內的代謝，因此常用於臨床治療的藥物，如青黴素可抑制細菌細胞壁的合成，磺胺類藥物則會干擾細菌的葉酸代謝等
5. 有些酵素可用於疾病的診斷與治療

《酵素的特性》

1. 大部份的酵素為蛋白質，因此高溫、酸、鹼或重金屬都可能使酵素發生變性，而失去或降低原有的催化活性
2. 影響酵素作用的因子有酵素濃度、受質濃度、pH值、溫度與終產物的濃度等，適時與適度的調整各因子才能使酵素的催化作用達到最高效率
3. 酵素的催化作用是降低反應所需的活化能而加速反應趨向平衡但不影響反應的平衡常數*，因此酵素與化學催化劑一樣，只影響化學反應的動力學性質而非熱力學性質，因此又稱為生物催化劑

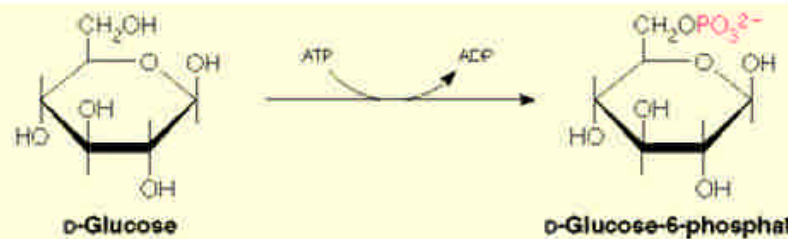
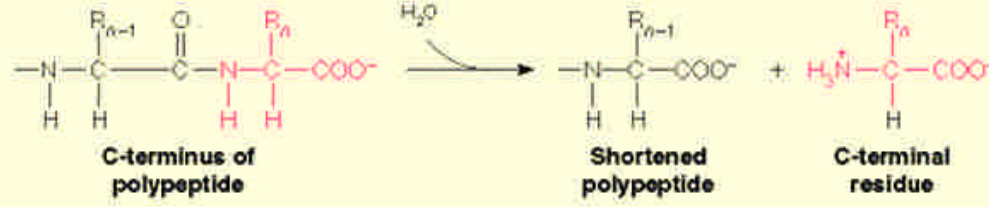
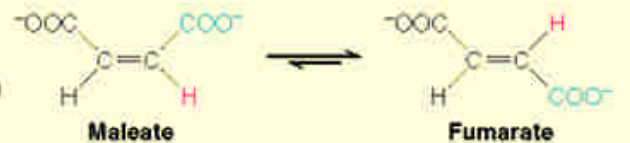


化學反應過程中反應物所含能量的變化



H_2O_2 分解過程中能量的變化情形

所有酵素依所催化的反應可歸為六大類

Class	Example (reaction type)	Reaction Catalyzed
1. Oxidoreductases	Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) (oxidation with NAD ⁺)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \xrightarrow{\text{NAD}^+} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{H} + \text{NADH} + \text{H}^+$ <p style="text-align: center;">Ethanol Acetaldehyde</p>
2. Transferases	Hexokinase (EC 2.7.1.2) (phosphorylation)	 <p style="text-align: center;">D-Glucose D-Glucose-6-phosphate</p>
3. Hydrolases	Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1) (peptide bond cleavage)	 <p style="text-align: center;">C-terminus of polypeptide Shortened polypeptide C-terminal residue</p>
4. Lyases	Pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1) (decarboxylation)	$\text{^-OOC-C(=O)-CH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H-C(=O)-CH}_3$ <p style="text-align: center;">Pyruvate Acetaldehyde</p>
5. Isomerases	Maleate isomerase (EC 5.2.1.1) (cis-trans isomerization)	 <p style="text-align: center;">Maleate Fumarate</p>
6. Ligases	Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1) (carboxylation)	$\text{^-OOC-C(=O)-CH}_3 + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{ATP}} \text{^-OOC-C(=O)-CH}_2\text{-COO}^- + \text{ADP} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">Pyruvate Oxaloacetate</p>

4. 酵素催化的反應雖有數千種，但反應的類別可歸為六大類，因此酵素可依其催化的反應類別分為**六大類***
如氧化還原酶催化氧化還原反應，轉移酶催化官能基的轉移反應，水解酶催化水解反應，裂解酶催化鍵結切除的反應，異構化酶催化異構化反應，連接酶催化鍵結生成的反應

5. 酵素與一般化學催化劑的**不同處**

酵素的效率高(可加速反應達 10^8 倍)，因此所需的用量少

酵素的專一性高

酵素作用的條件溫和

酵素具有**活體外的活性**且其**活性可受**阻害劑或活化劑的**調節**

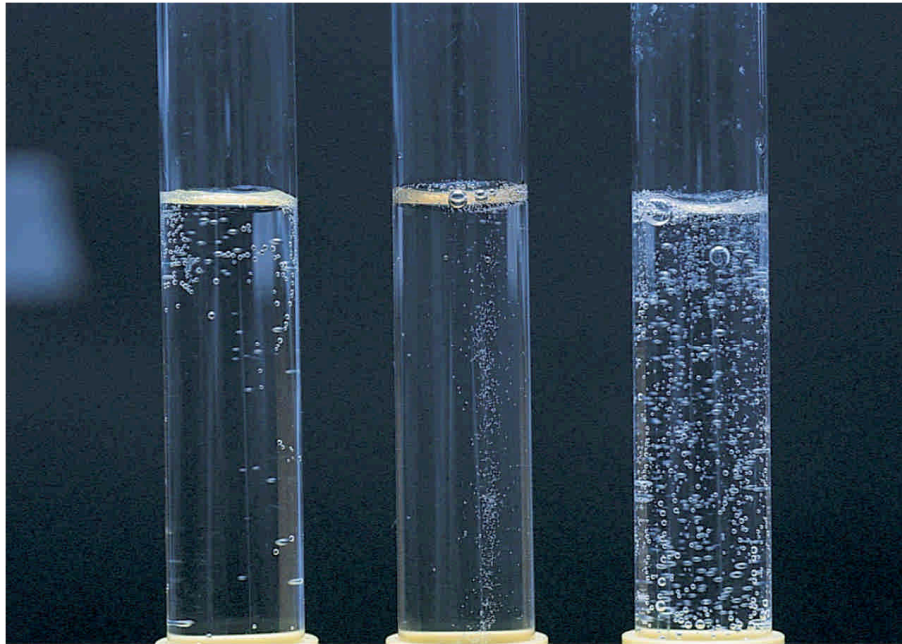
6. 以催化 $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2$ 反應的觸酶(catalase)為例
每分子的觸酶即使在 0°C 的條件下，每秒鐘仍可分解
44,000個 H_2O_2 分子，因此只需微量的觸酶即可催化
 H_2O_2 的分解反應

二氧化錳與鐵粉也可催化相同的反應，但兩者的效率
相差甚遠*，而二氧化錳與鐵粉除了催化 H_2O_2 的分解
外，尚可催化其它多種反應，但觸酶的作用則具有
專一性

7. 酵素的受質專一性*

立體異構物受質的專一性

- 酵素活性部位與受質間的三點接觸理論



(a)

(b)

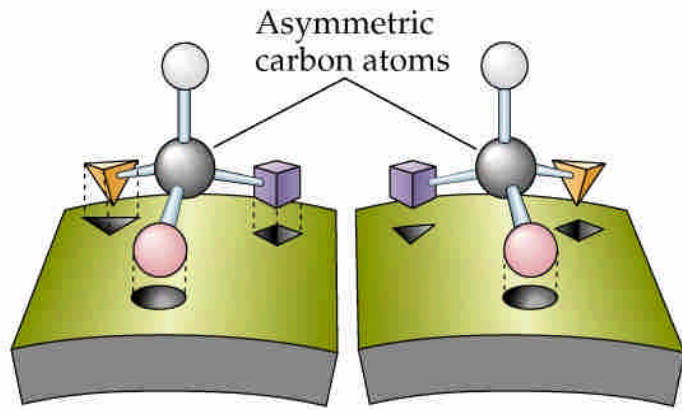
(c)

含3% H_2O_2 的水溶液置於 37°C
 (a) 未添加催化劑
 (b) 加入 Fe^{3+} 的鹽類為催化劑
 (c) 添加酵素觸酶(catalase)

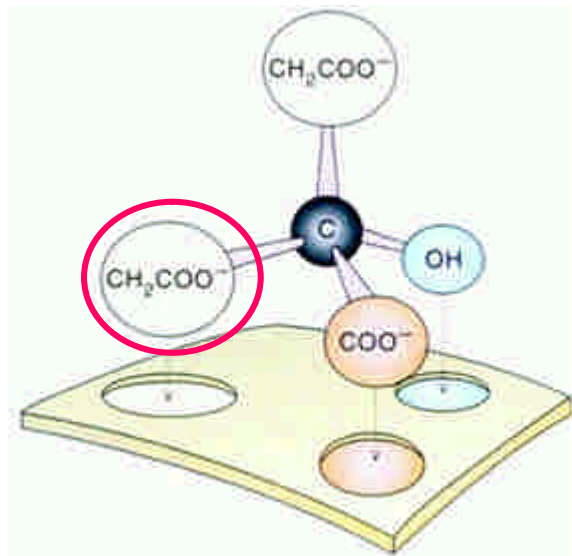
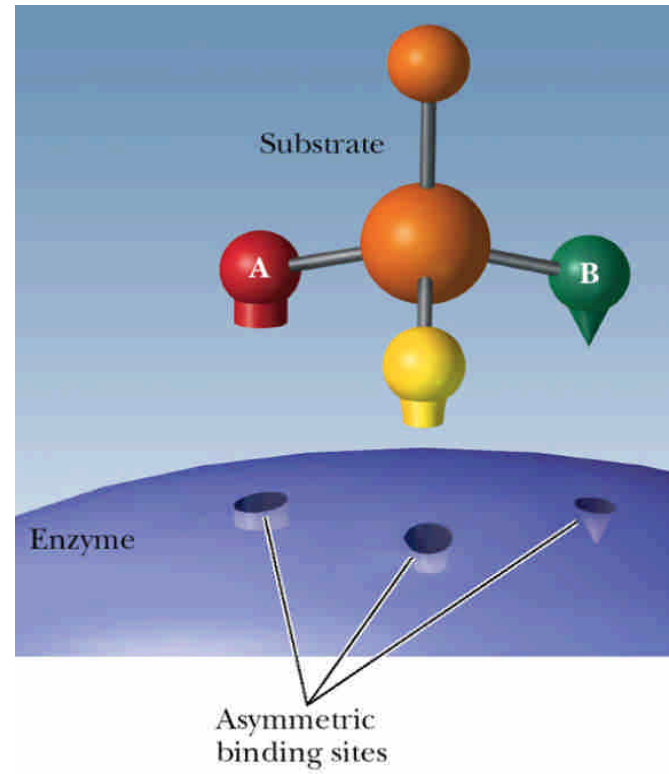
Lowering of the Activation Energy of Hydrogen Peroxide Decomposition by Catalysts

Reaction Conditions	Activation Free Energy		Relative Rate
	kJ mol^{-1}	kcal mol^{-1}	
No catalyst	75.2	18.0	1
Platinum surface	48.9	11.7	2.77×10^4
Catalase	23.0	5.5	6.51×10^8

酵素的專一性(1)

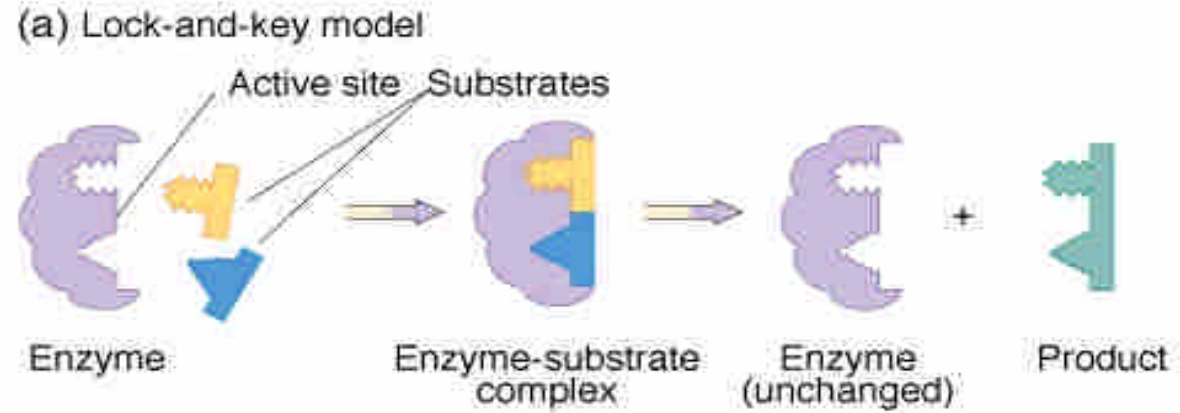


三點接觸理論



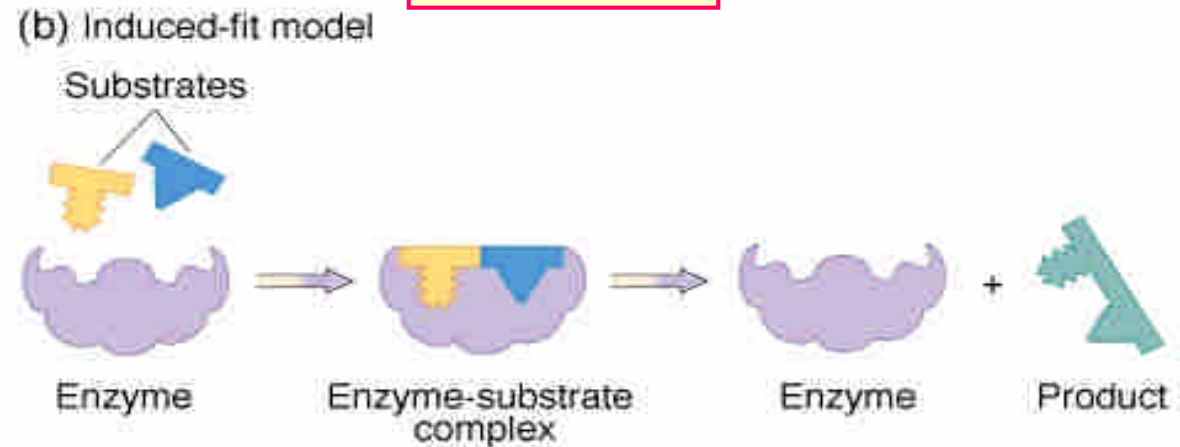
酵素的專一性(2)

鎖與鑰匙模型



兩者皆不變

誘導填入模型



一者變一者不變

酵素活性部位與受質間的鎖與鑰匙模型

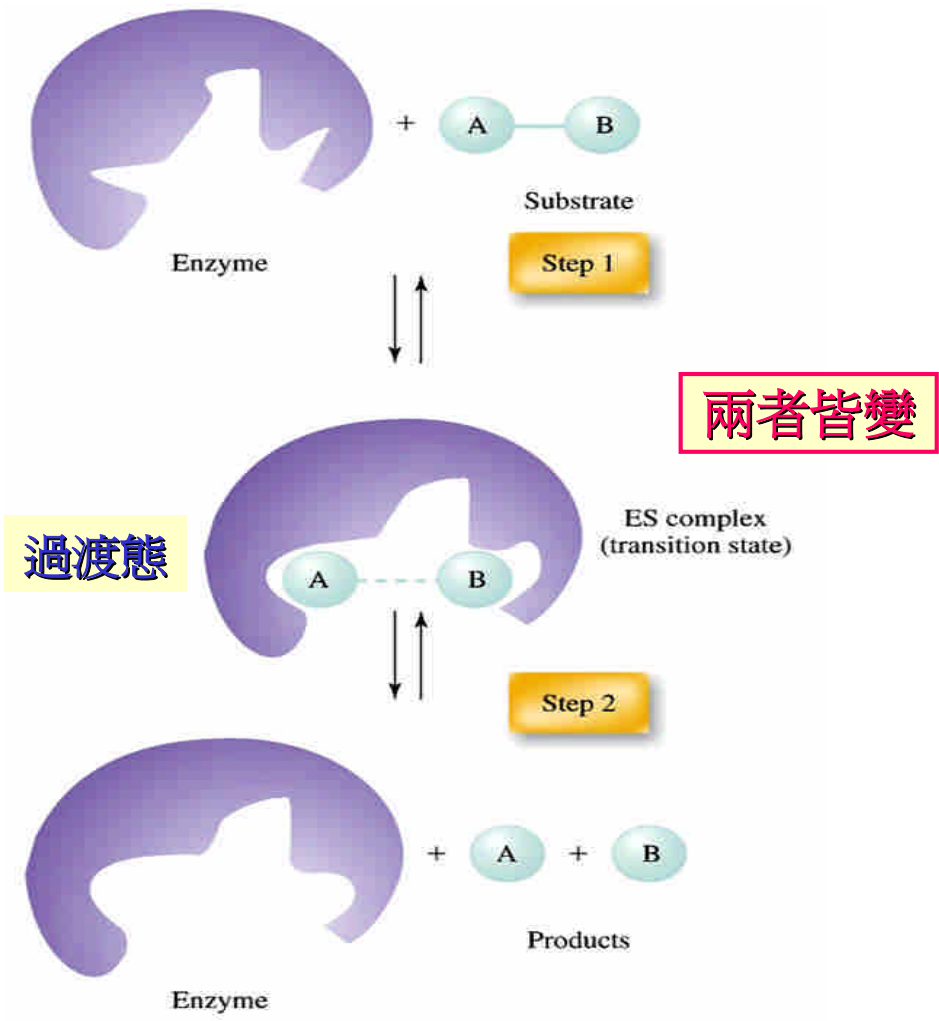
酵素活性部位與受質間的誘導填入模型

酵素活性部位與受質間的過渡態穩定模型

8. 酵素是生物體特有的催化劑，但在適當的條件下，即使細胞的結構被破壞，原有的酵素在細胞外仍具有催化活性，因此各別的酵素可被分離、純化、結晶而用於代謝反應的研究、酵素結構與特性的研究、甚至發展成為化學試劑、藥物及工業上的催化劑等

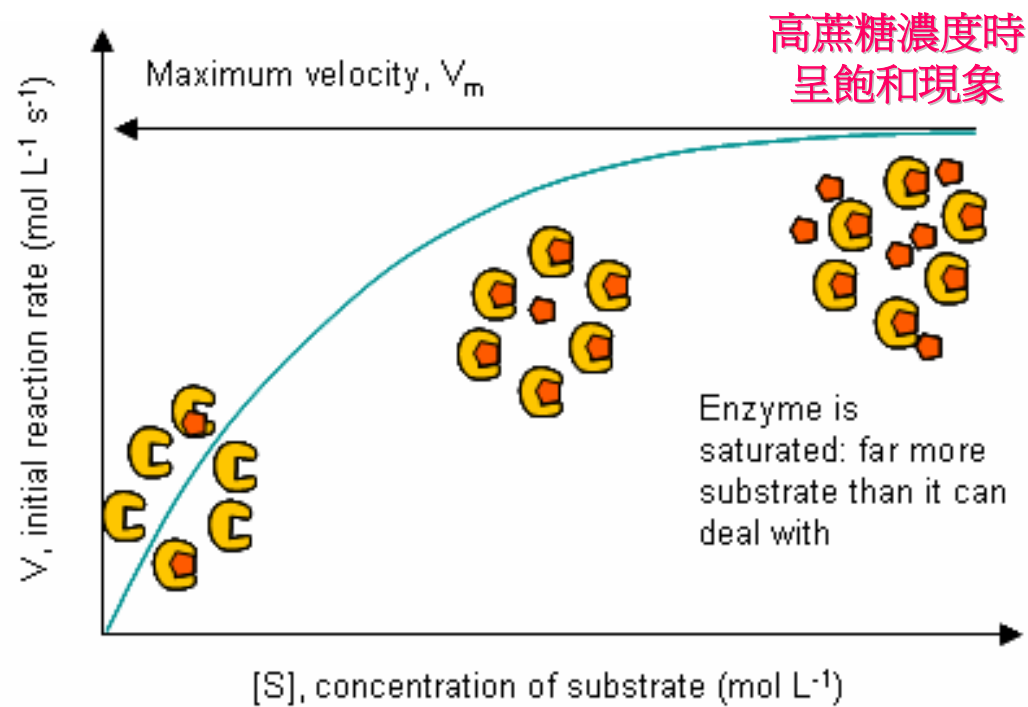
酵素的專一性(3)

過渡態穩定模型



《酵素動力學簡介》

1. 酵素動力學主要研究酵素反應的速率與影響反應速率的因子
2. 早期的酵素動力學研究以蔗糖的水解為主
比較蔗糖以酸(HCl)水解及以蔗糖酶水解的反應
- 蔗糖酶水解高濃度的蔗糖(受質)時, 其反應速率有飽和現象
3. Michaelis與Menten的研究
主要探討單一受質與單一產物的酵素反應系統
- S (受質) \rightarrow P (產物)



雙曲線關係

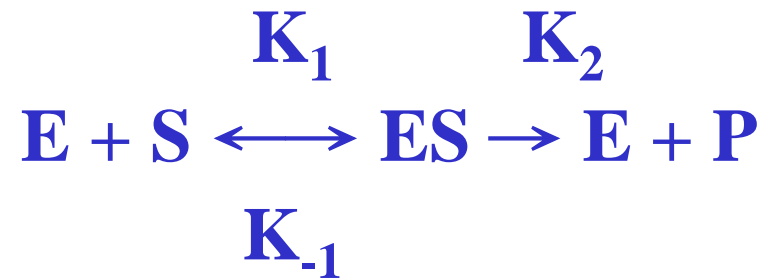
蔗糖濃度對蔗糖水解酶(sucrase)反應速率的影響



Leonor Michaelis (1875~1949, 左)

- Famous for his work with **Maud Menten (1879~1960, 右)** in enzyme kinetics and Michaelis-Menten kinetics
- Besides his role in the formulation of Michaelis-Menten equation (1913), he found that thioglycolic acid could dissolve keratin, making him the **father of the permanent wave**

- 酵素反應的過程



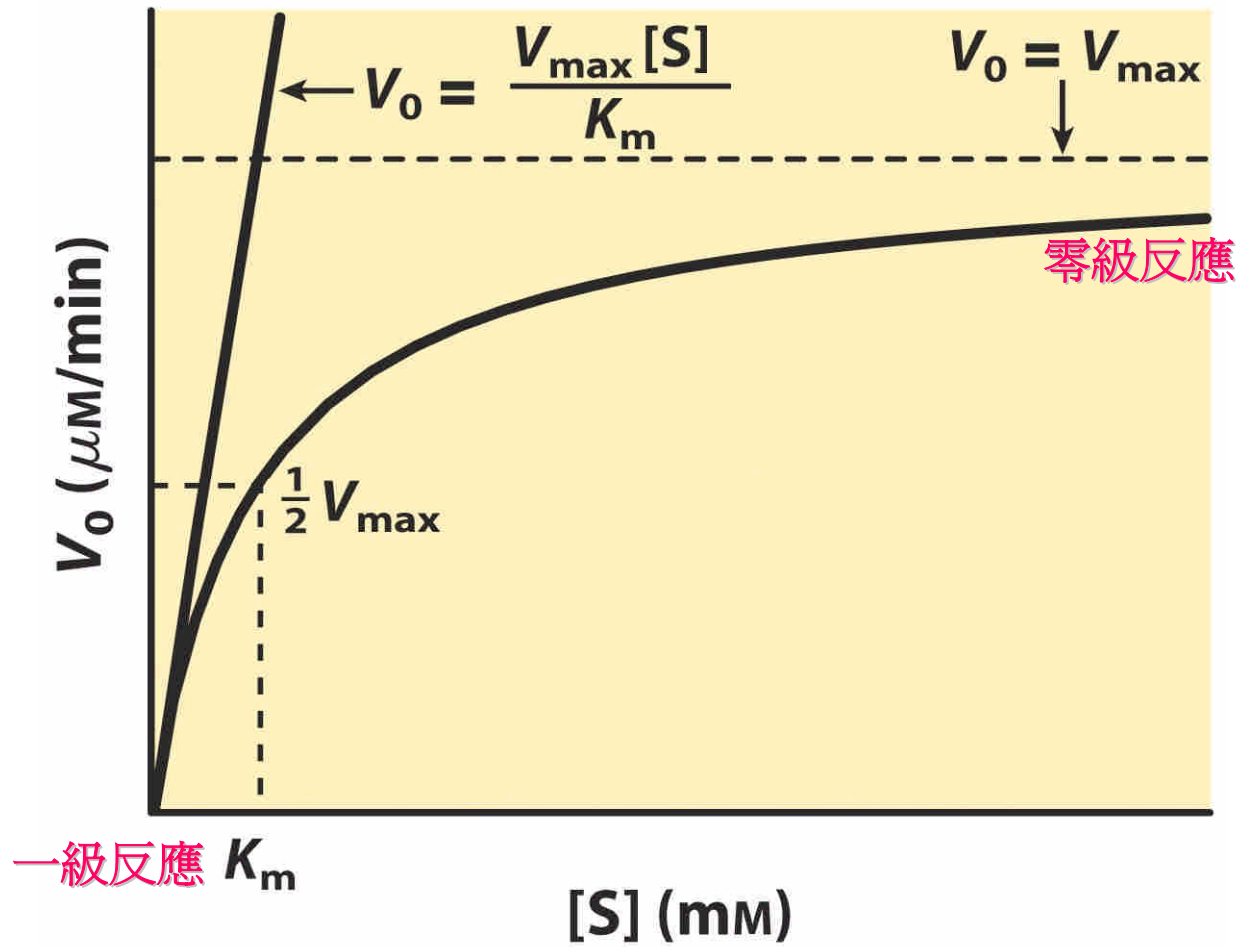
$\text{K}_1 = \text{ES}$ (酵素與受質複合體)形成的速率常數

$\text{K}_{-1} = \text{ES}$ 分解的速率常數

$\text{K}_2 =$ 產物生成與釋出的速率常數

穩定態假說

- ES 形成的速率等於 ES 分解的速率 ($d[\text{ES}]/dt = 0$)



反應速率與受質濃度的關係

4. Michaelis-Menten 方程式

$$V_o = V_{\max} [S_o] / (K_m + [S_o]), K_m = (K_{-1} + K_2) / K_1$$

- 當 $[S_o] \gg K_m$, $V_o = V_{\max}$ 為零級反應
- 當 $[S_o] = K_m$, $V_o = 1/2 V_{\max}$
- 當 $[S_o] \ll K_m$, $V_o = V_{\max} ([S_o] / K_m)$ 為一級反應

5. Michaelis-Menten 方程式的重要性

K_m 為酵素與受質間親和力的指標*

- 當 $K_{-1} \gg K_2$, $K_m = (K_{-1} + K_2) / K_1 = K_{-1} / K_1 = K_d$ (ES 的解離常數)

V_{\max} 為酵素催化效率的指標?

- K_{cat} (在 Michaelis-Menten 方程式中, $K_{\text{cat}} = K_2$)

TABLE 6–6 **K_m for Some Enzymes and Substrates**

Enzyme	Substrate	K_m (mM)
Hexokinase (brain)	ATP	0.4
	D-Glucose	0.05
	D-Fructose	1.5
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	26
Chymotrypsin	Glycyltyrosinylglycine	108
	<i>N</i> -Benzoyltyrosinamide	2.5
β -Galactosidase	D-Lactose	4.0
Threonine dehydratase	L-Threonine	5.0

TABLE 6–7**Turnover Numbers, k_{cat} , of Some Enzymes**

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})
Catalase	H_2O_2	40,000,000
Carbonic anhydrase	HCO_3^-	400,000
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	14,000
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2,000
Fumarase	Fumarate	800
RecA protein (an ATPase)	ATP	0.5

6. 完美的酵素?

可利用 K_{cat}/K_m 比常數評估酵素的催化效率

在生理狀況下， $[S]/K_m$ 的比值通常介於 0.01 ~ 1.0，則

$V = (V_{max}/K_m)[S_0] = (K_{cat}/K_m)[E_{total}][S]$ ，其中 $K_{cat}/K_m = (K_1K_2)/(K_{-1} + K_2) = K_1[K_2/(K_{-1} + K_2)] < K_1$ ，即反應受限於反應物質的擴散速率 ($10^8 \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)*

細胞的因應之道

- 酵素演化成具有多活性與多功能區
- 酵素演化成具有四級構造或更高層次的結構組合
- 胞器的生成

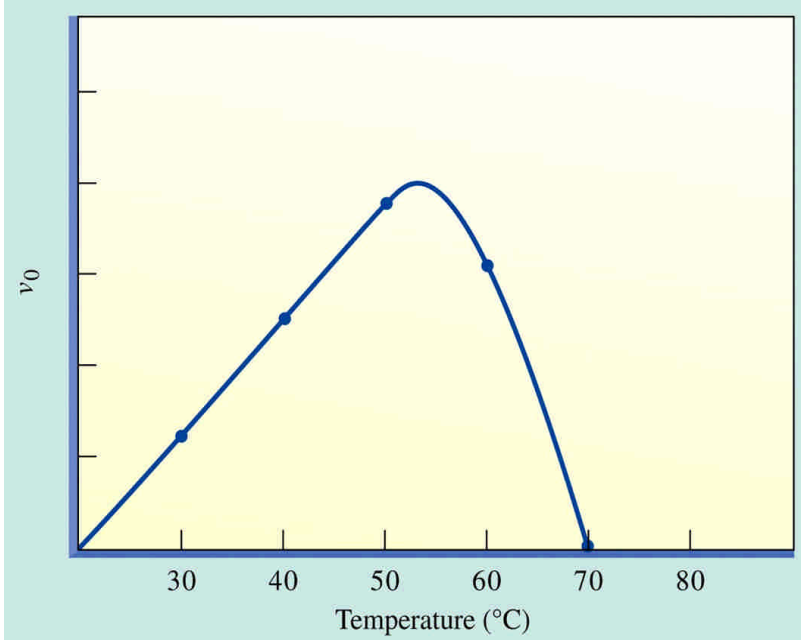
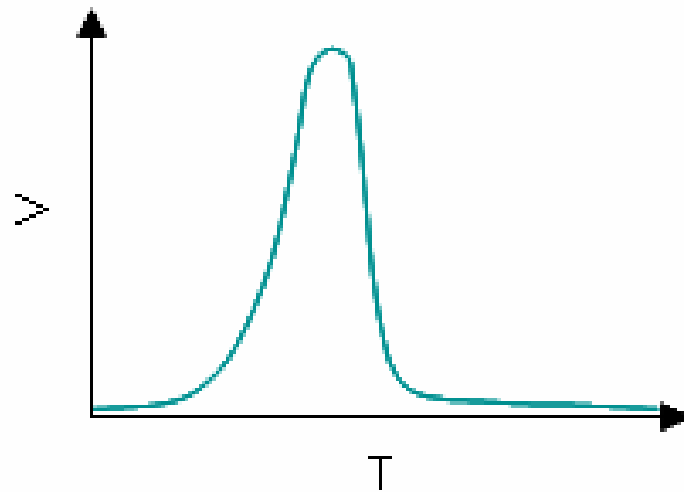
TABLE 6–8**Enzymes for Which k_{cat}/K_m Is Close to the Diffusion-Controlled Limit (10^8 to $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)**

Enzyme	Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_m (M)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
Catalase	H_2O_2	4×10^7	1.1×10^0	4×10^7
Crotonase	Crotonyl-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
Fumarase	Fumarate	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	Malate	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
β -Lactamase	Benzylpenicillin	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

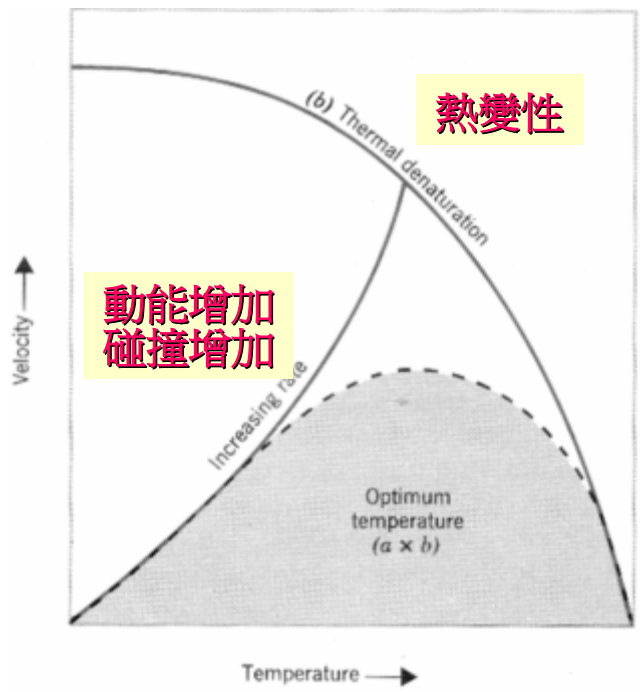
Source: Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W. H. Freeman and Company, New York.

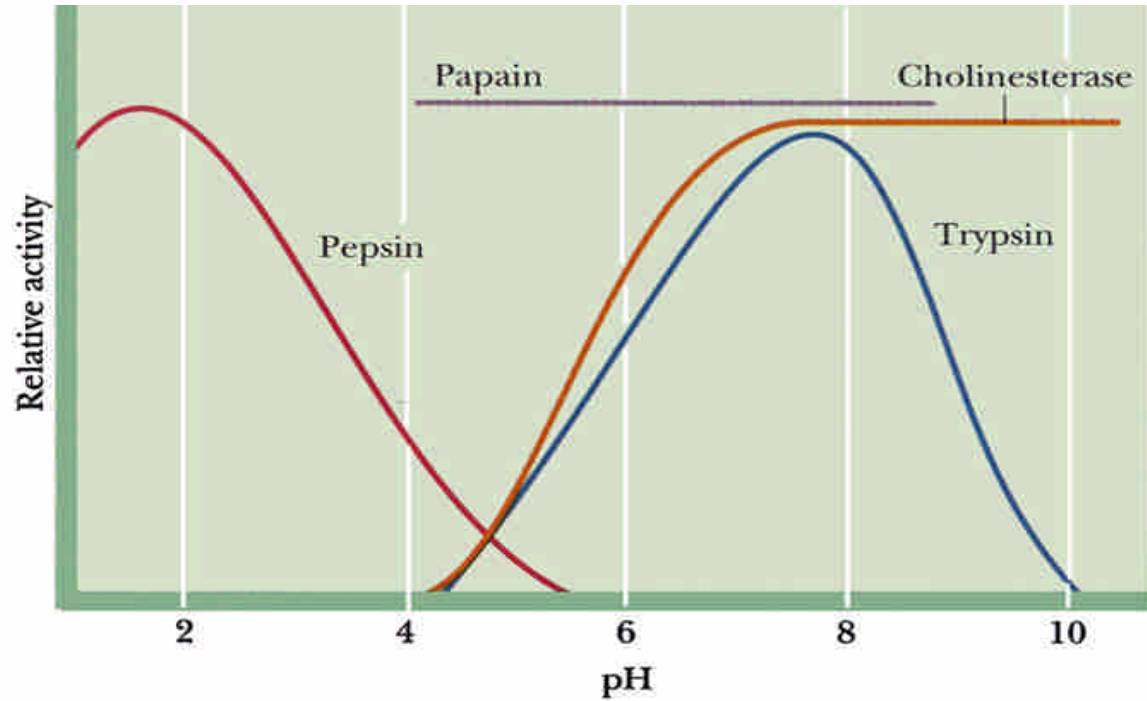
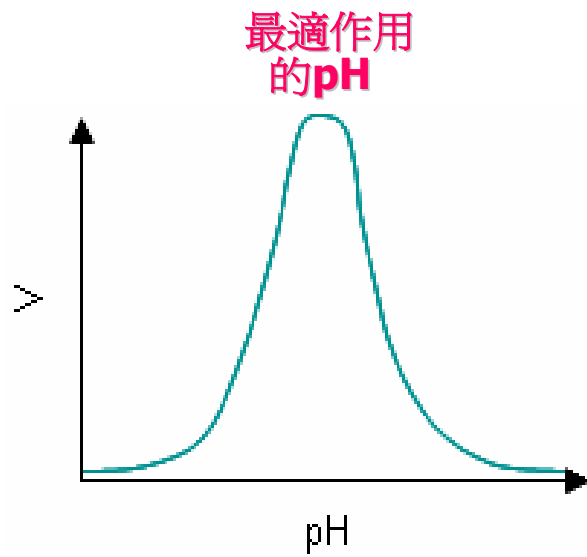
《酵素活性的調節》

1. 細胞代謝活性的調節對於細胞的生存極其重要
2. 代謝活性的調節通常可透過改變催化特定反應的酵素活性
影響酵素活性的因子有溫度*、pH值*、受質濃度*、
輔因子或調節劑的濃度等
活性調控的機制有不可逆的切除活化作用，可逆的
異位調節作用，可逆的共價修飾作用與其他機制等



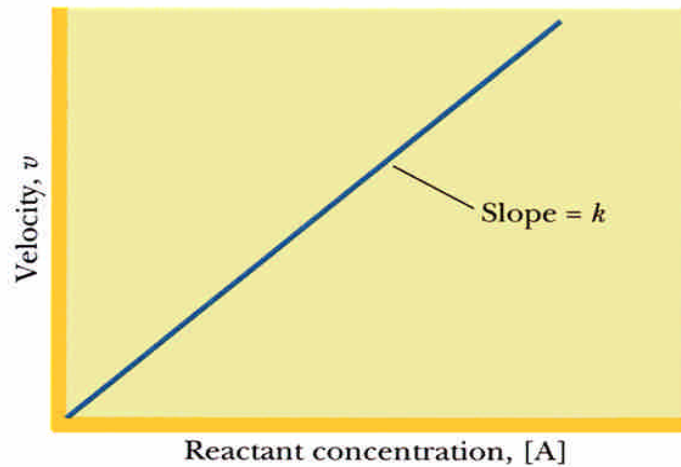
溫度對酵素作用的影響



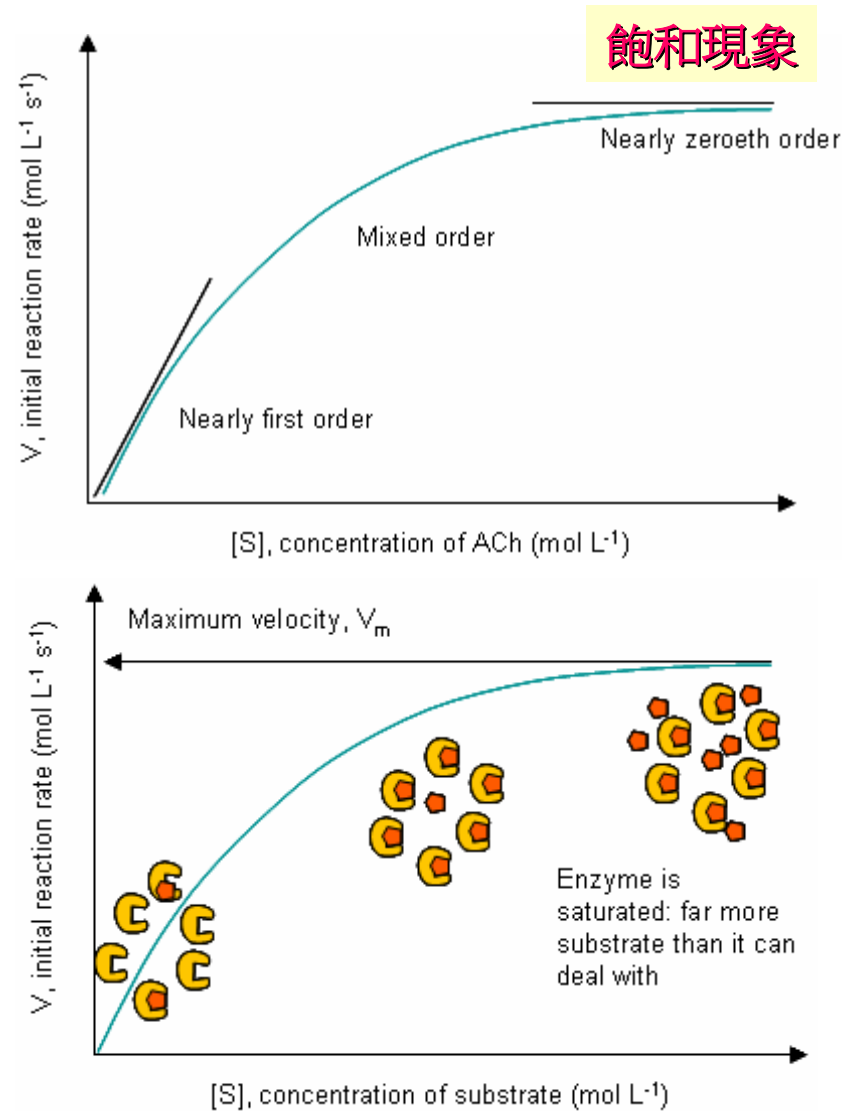


pH對酵素作用的影響

Optimum pH of Some Enzymes	
Enzyme	Optimum pH
Pepsin	1.5
Catalase	7.6
Trypsin	7.7
Fumarase	7.8
Ribonuclease	7.8
Arginase	9.7



反應物濃度對一般反應的影響



受質濃度對酵素作用的影響

3. 酵素的切除活化作用

如水解脂質、蛋白質與糖類等細胞成分的消化酵素*

- 酵素在製造後通常以不具活性的先質(先驅物)形式存在，以保護細胞結構的完整
- 當需要酵素活性時，不具活性的先質會被切除一小段肽鏈後而具有活性

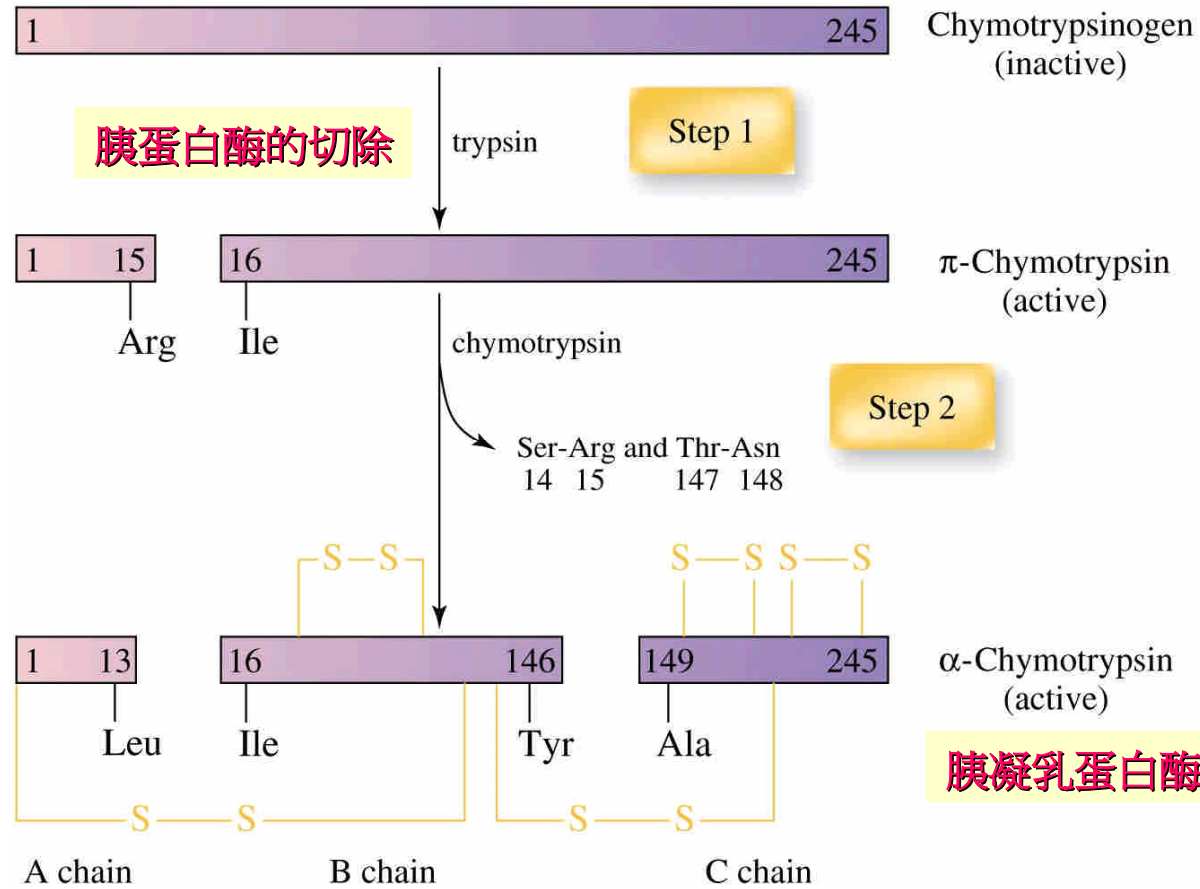
其他例子

- 凝血反應*中的凝血酶原與血纖維蛋白原
- 激素原(胰島素原)的活化*
- 細胞程式死亡(細胞凋亡)*中的多種蛋白質水解酶

Pancreatic and Gastric Zymogens		
Origin	Zymogen	Active Protease
Pancreas	Trypsinogen	Trypsin
Pancreas	Chymotrypsinogen	Chymotrypsin
Pancreas	Procarboxypeptidase	Carboxypeptidase
Pancreas	Proelastase	Elastase
Stomach	Pepsinogen	Pepsin

消化酵素多以不具活性的先質形式存在

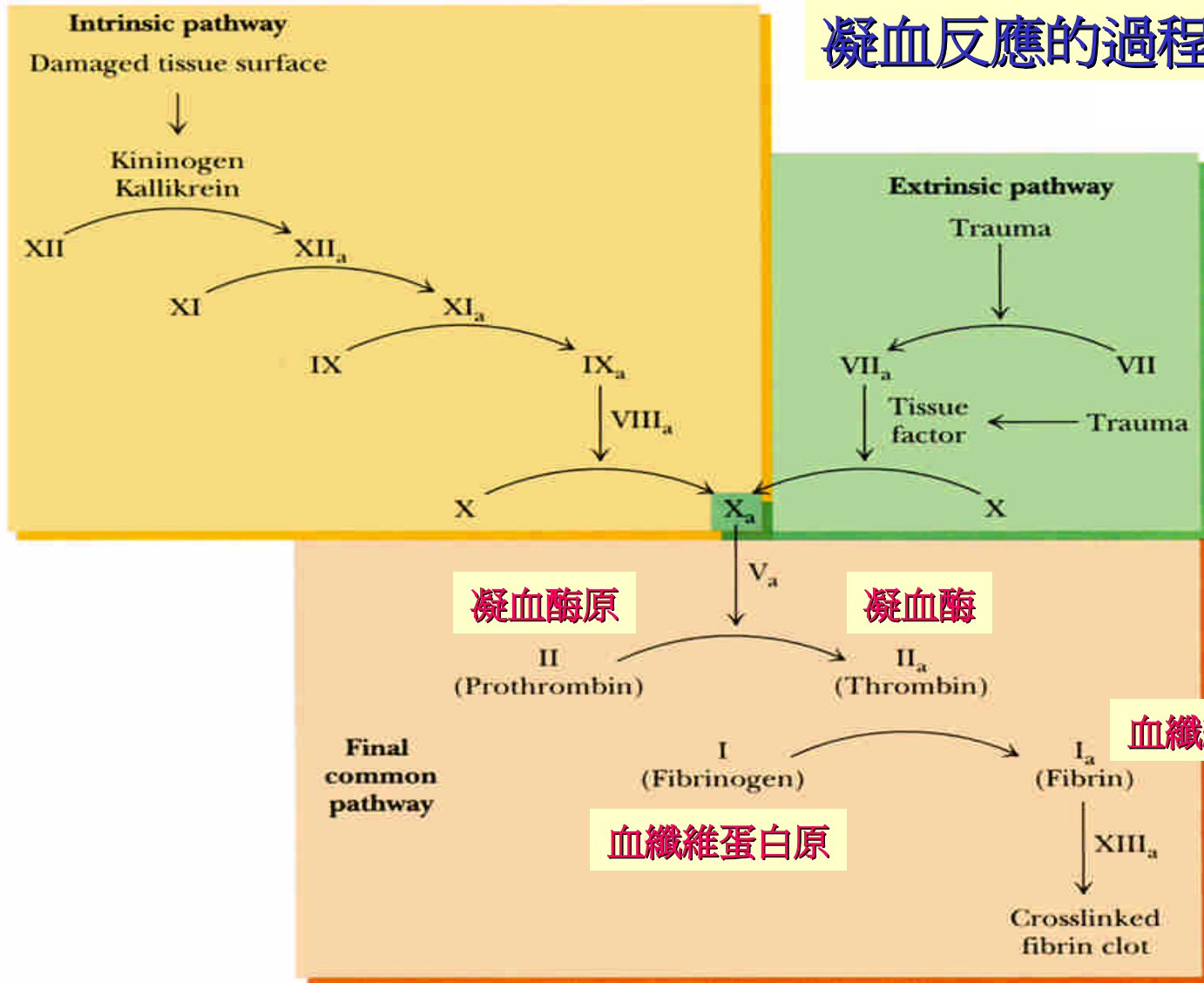
胰凝乳蛋白酶原(無活性)



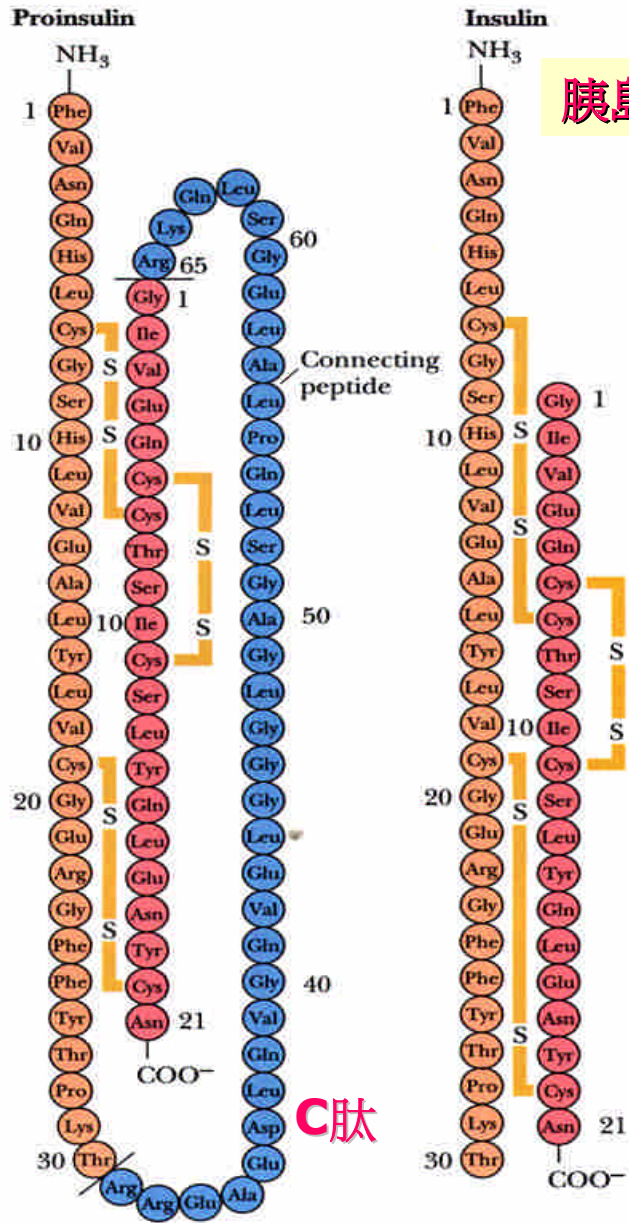
胰凝乳蛋白酶(有活性)

消化酵素胰凝乳蛋白酶的切除活化

凝血反應的過程



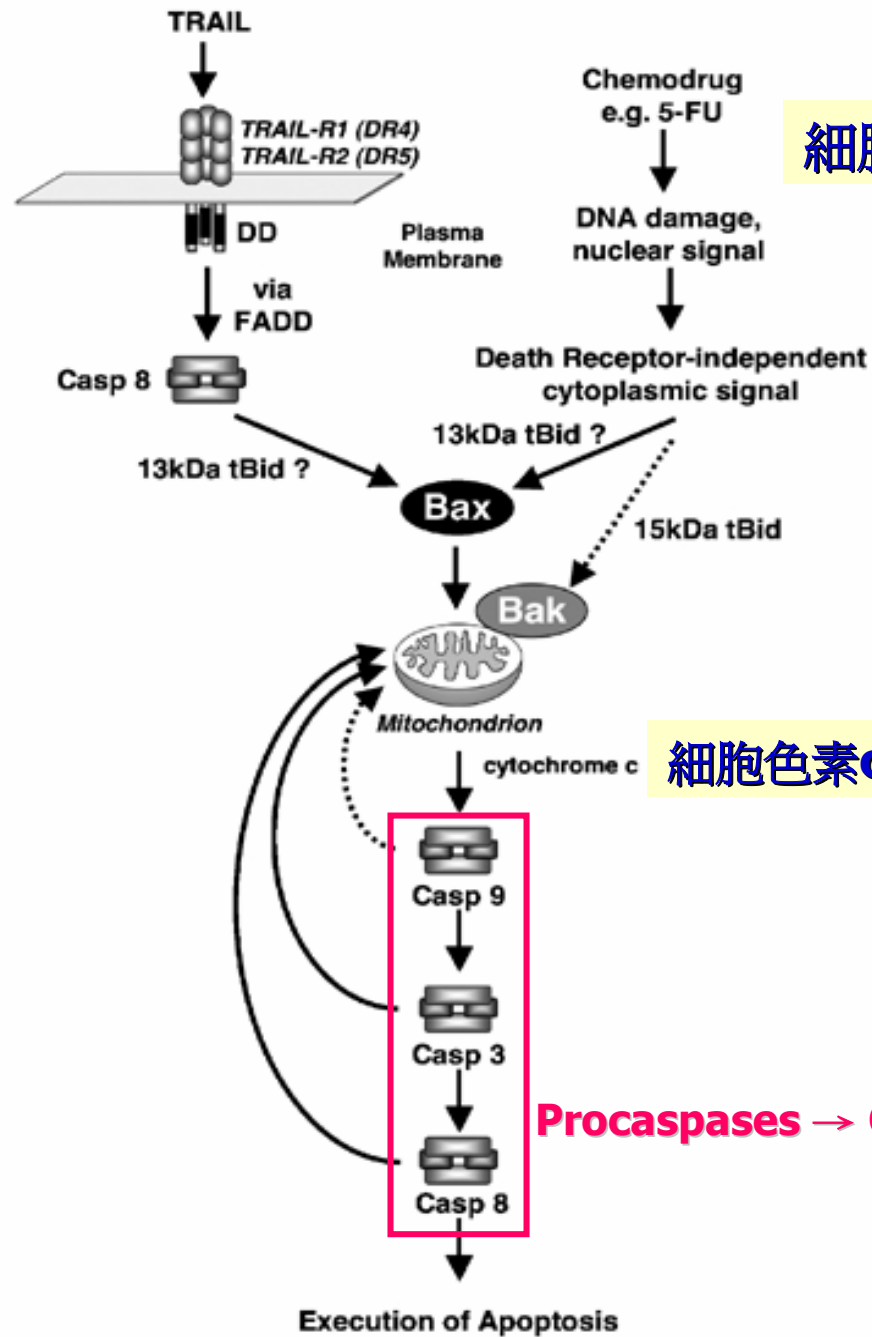
胰島素原



胰島素

胰島素的活化

細胞程式死亡(apoptosis)



細胞色素c

Procaspases → Caspases

Execution of Apoptosis

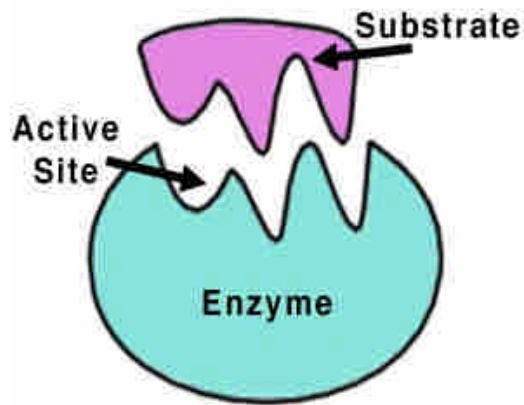
4. 酵素的異位調節作用

異位調節作用適用於具有四級構造的異位酵素或調節酵素*

異位(調節)酵素具有催化部位(活性部位)與調節部位

- 當酵素的調節劑(活化劑或阻害劑)與調節部位接合時，會引發調節部位發生構形改變*，此構形改變因四級構造中不同次單元間的相互作用而牽動催化部位發生構形改變，進而改變催化部位的特性，如**改變**酵素**對受質的接合能力**或酵素的催化效率等，最後使酵素的活性發生改變

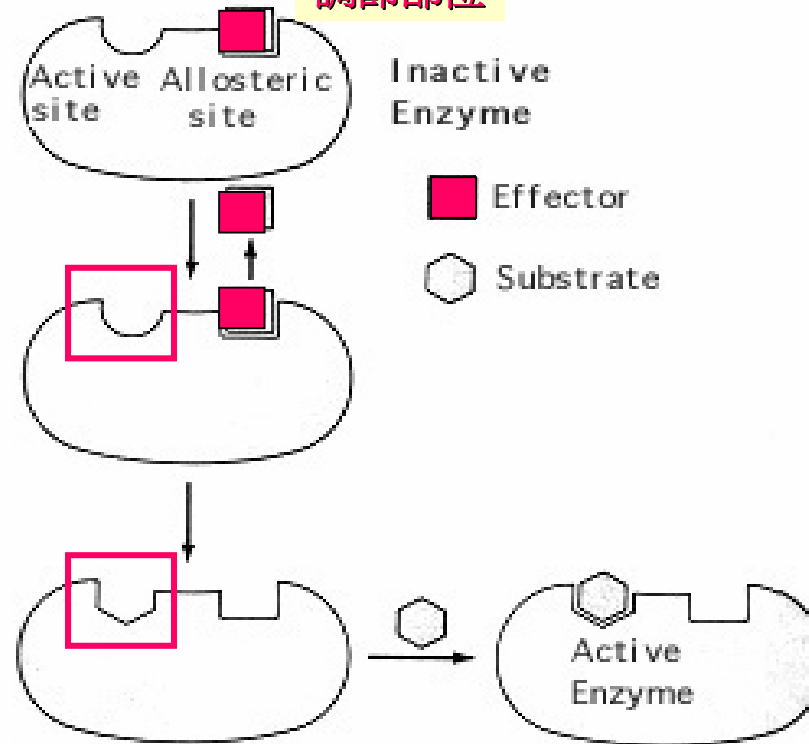
一般酵素



調節酵素

催化部位

調節部位



調節酵素的異位調節作用

5. 酵素的共價修飾作用

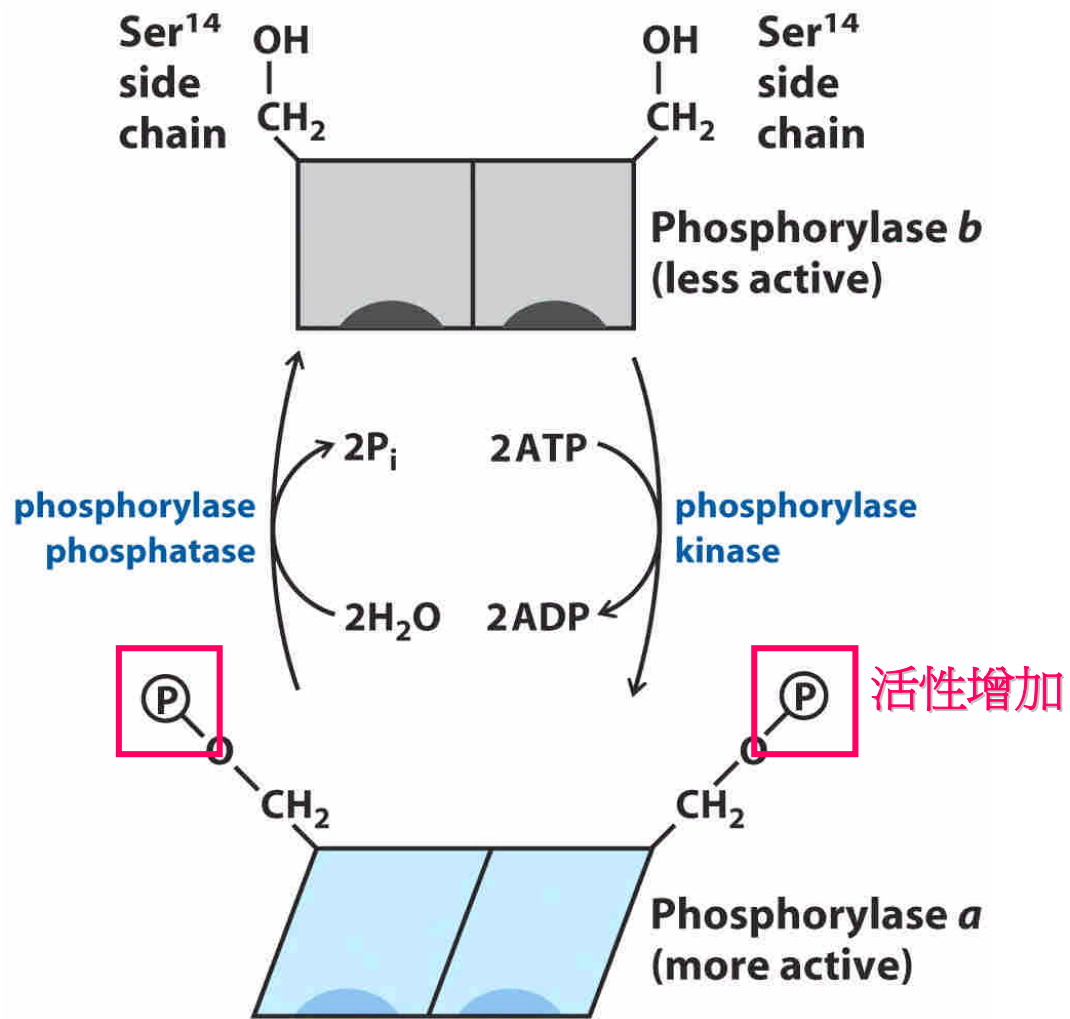
代謝肝糖的肝糖磷解酶*是研究最多的例子

- 肝糖磷解酶(或特定酵素)因特定胺基酸(如絲胺酸)接上磷酸基(或其他特定化學基)而改變(增加)其活性
- 此磷酸化的修飾作用屬於共價鍵結的生成，因此需要其他酵素的參與
- 酵素的共價修飾作用通常是激素調節細胞代謝的機制

6. 其他調節機制

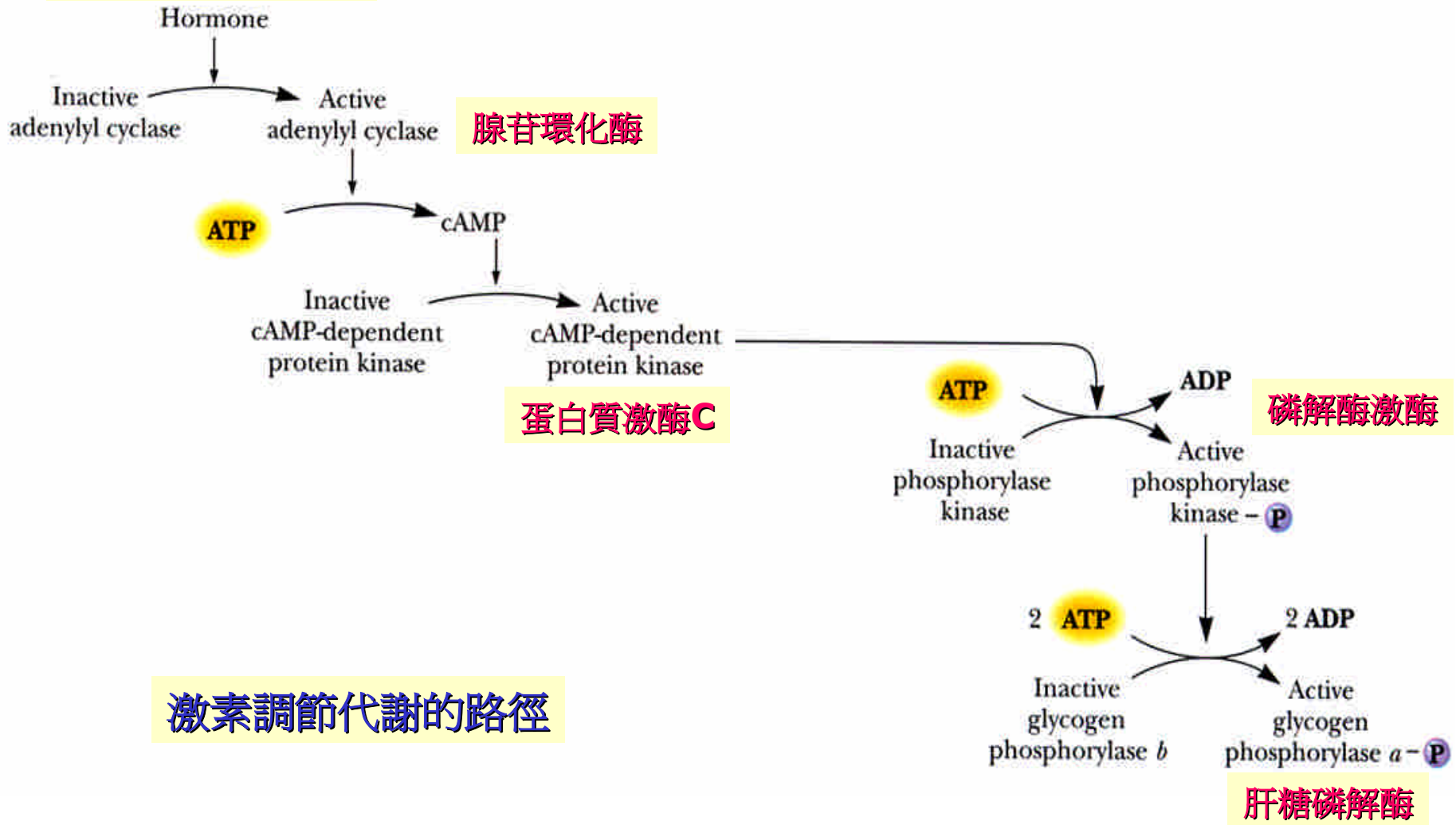
如長期的代謝調適過程中，可透過激素的作用使特定種類的酵素表現量增加或減少

如改變特定酵素或蛋白質分布的位置

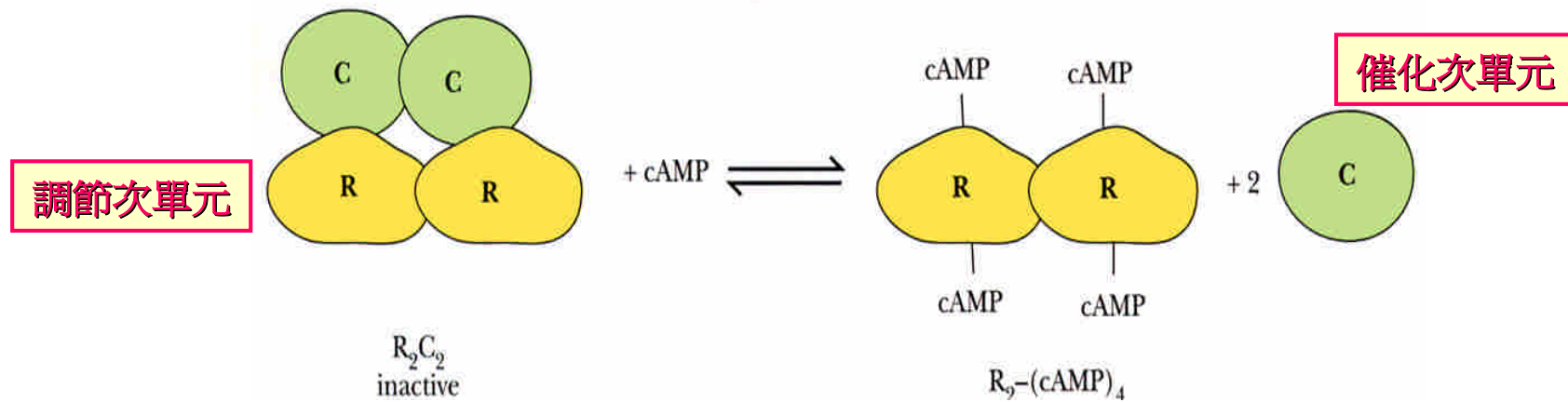


肝糖磷解酶的共價修飾作用

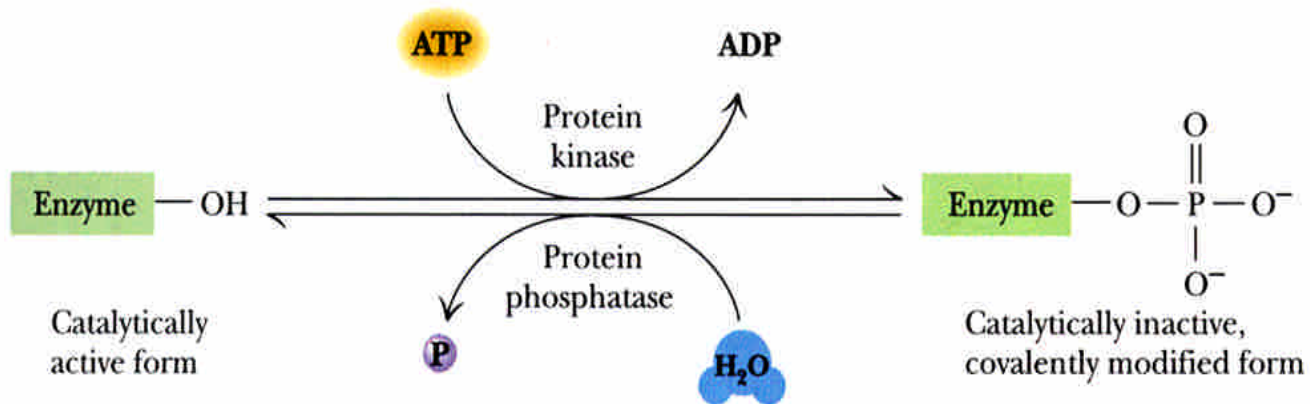
激素
(腎上腺素, 昇糖素)



激素調節代謝的路徑



蛋白質激酶C的活化



蛋白質的磷酸化修飾

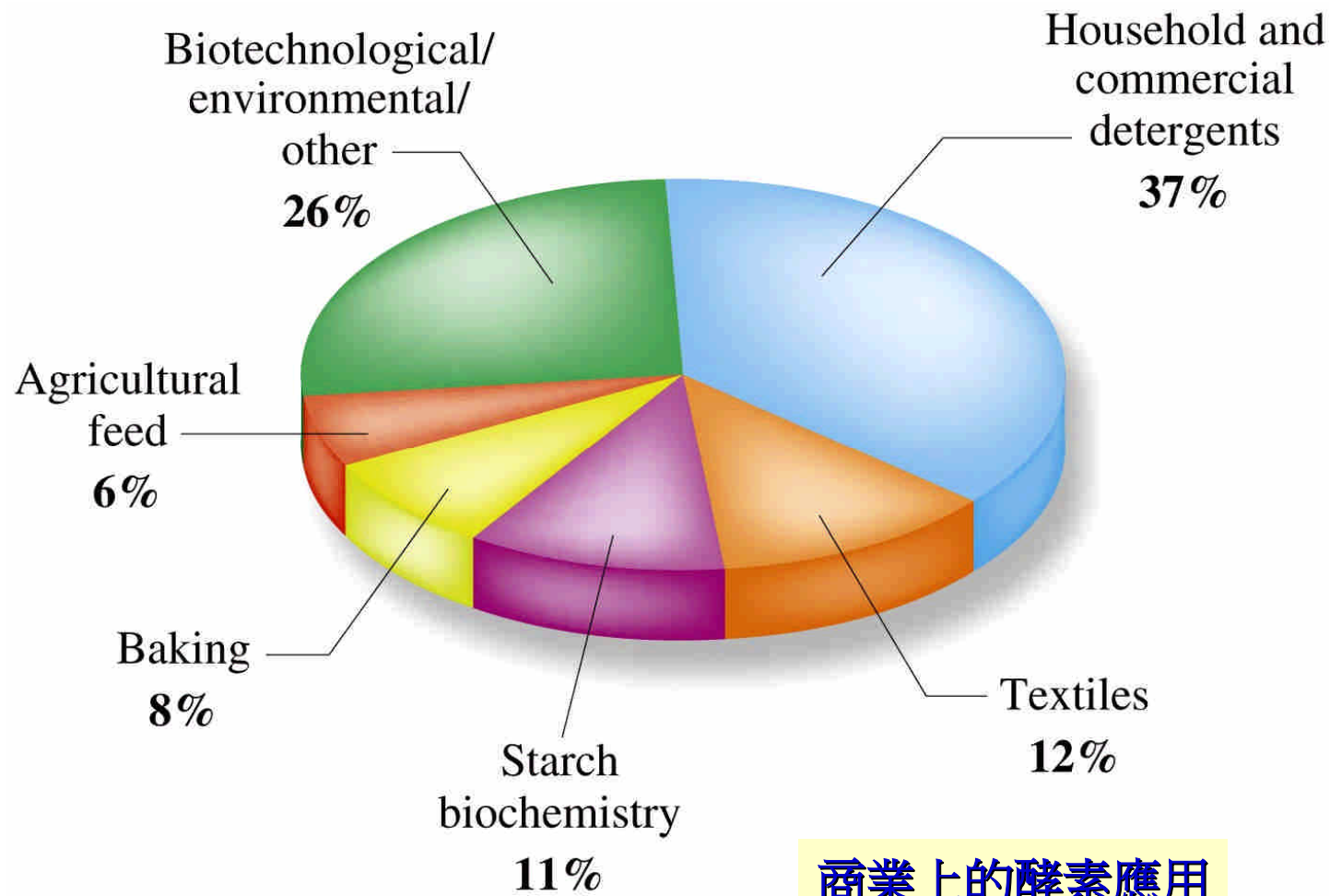
《酵素的應用》

1. 隨著對酵素的了解與現代科技的進步，酵素已被廣泛應用於臨床醫學、工業及生物科技上*

2. 酵素在臨床醫學上的應用

利用酵素的高專一性、高靈敏性與反應快速等優點，以酵素為試劑進行血糖或膽固醇含量的常規檢查，如葡萄糖氧化酶用於定量血中或尿中的葡萄糖含量*

利用酵素做為疾病診斷的輔助工具或治療效果的評估指標，如分析血液中轉胺酶GPT與GOT的含量*進行肝功能檢查，分析酸性磷酸根水解酶進行前列腺癌篩檢



肝功能檢查

肝功能檢查	單位	標準	97.3
ALB(白蛋白)-肝腎	g/dL	2.3-4.0	3.4
GLO(球蛋白)	g/dL	2.5-4.5	3.3
A/G(白蛋白與球蛋白比)	%	0.75-1.9	1.03
TBIL(總膽紅素)-肝膽	U/L	0-0.9	0.4
ALKP(鹼性磷酸酶)	U/L	23-212	77
AST(GOT)(麩氨酸草醋酸轉氨酶)	U/L	0-50	20
ALT(GPT)(麩氨酸丙醋酸轉氨酶)	U/L	10-100	42
GGT(加瑪麩胺硫轉移酶)	U/L	0-7	2
CHO(膽固醇)-肝腎	mg/dL	110-320	181
TG(三酸甘油脂)	mg/dL	10-100	53
LDH(乳酸脫氫酶)			×
NH3(血氨值)			×
Bile acid(膽酸)			×

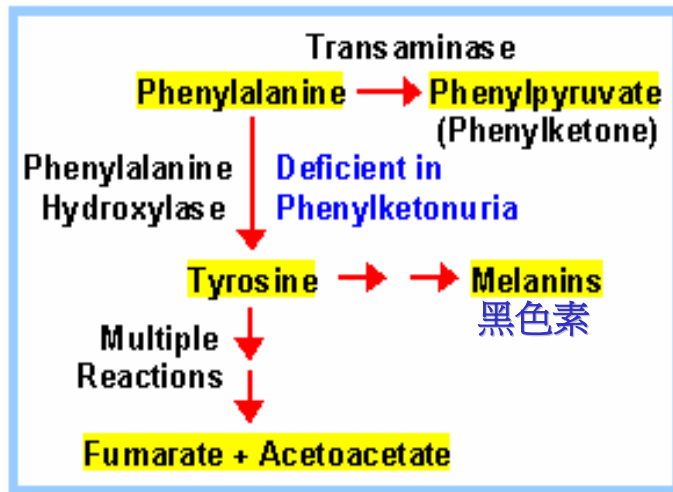
血糖機



利用酵素為治療疾病的藥劑，如天門冬醯胺酸水解酶*可治療白血病(血癌)，尿激酶*可治療血栓症，及用於清理傷口*與預防蛀牙等

利用酵素抑制的原理以治療疾病*，如臨床上痛風的治療，高膽固醇的治療與消炎等

利用酵素進行生理生化的研究，如新生兒先天性代謝異常中的苯酮尿症*即是因缺乏代謝苯丙胺酸的羥化酶所致



供苯酮尿症患者使用



治療乳糖不耐症



治療白血病



Elspar® is a brand name of Asparaginase.

傷口清理



治療血栓症(尿激酶)



酵素的抑制作用

- 可逆抑制作用

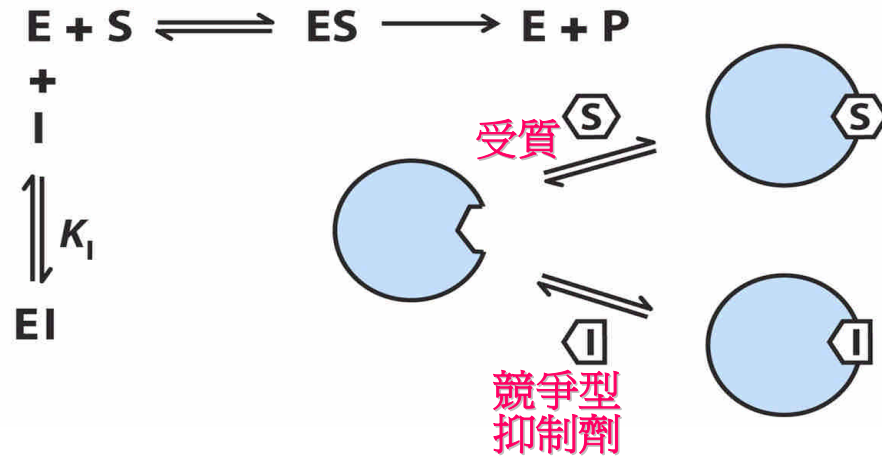
競爭型抑制劑(為酵素受質的類似物)

臨床用藥

- 不可逆抑制作用

盤尼西林

含有機磷農藥

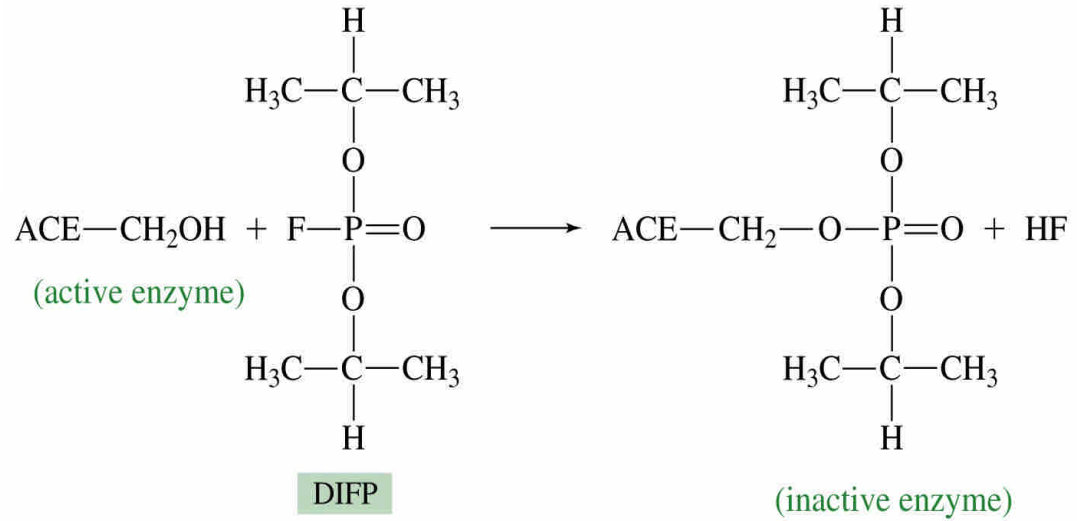
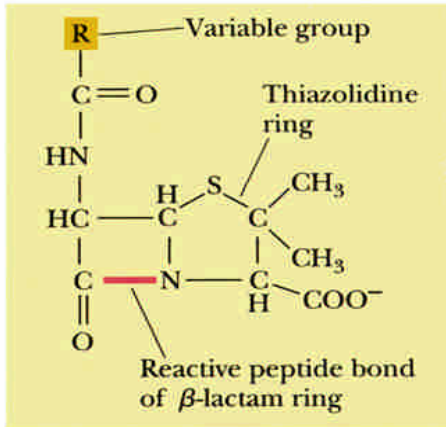


Substrate	Product	Competitive inhibitor
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Succinate</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{HC} \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Fumarate</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Malonate</p>

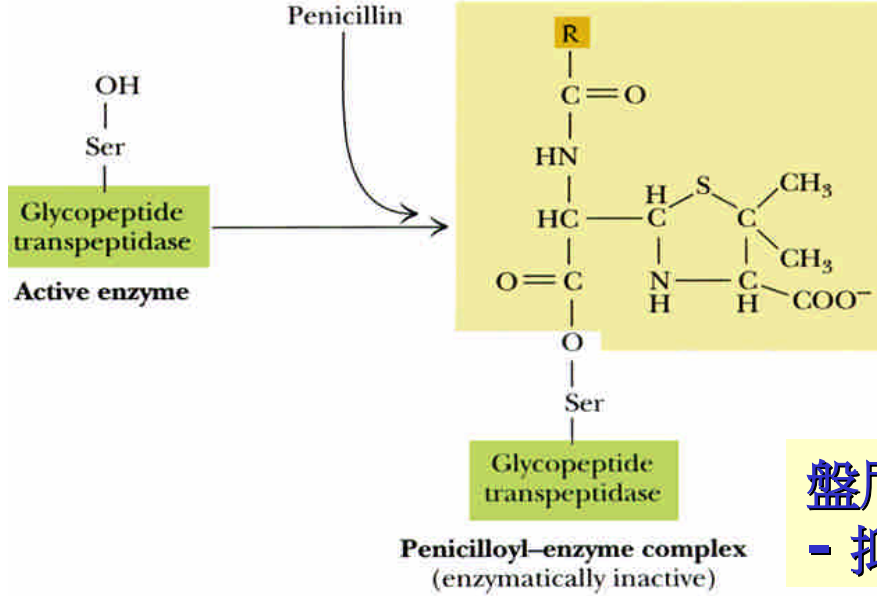
$\xrightarrow[\downarrow 2H]{\text{SDH}}$

受質

競爭型抑制劑



有機磷農藥的作用機制
- 抑制乙醯膽鹼水解酶



盤尼西林的作用機制
- 抑制參與細胞壁合成的酵素

3. 酵素在工業上的應用

檢測食品加工業的原料新鮮度、純度及品質，如分析原料中的還原酶活性可判定原料是否遭受細菌污染，分析牛奶中的轉化酶活性可確認牛奶的低溫滅菌過程是否完全

檢測牛肉產品中有否有馬肉攙假，如利用酵素免疫分析法檢驗

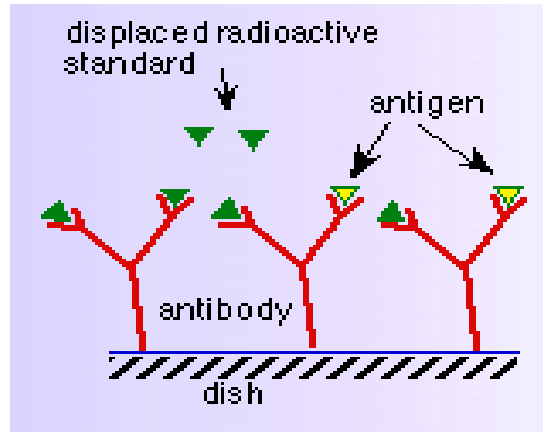
應用於食品加工方面，如製造果糖糖漿*或不含乳糖的特殊配方奶粉與食品以提供乳糖不耐症患者使用

應用於製藥工業方面，如製造廣效性抗生素

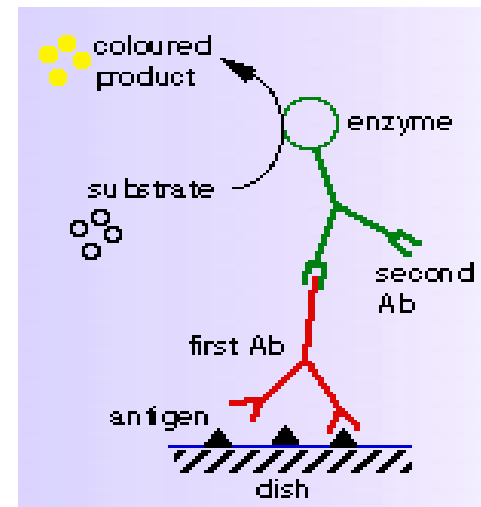
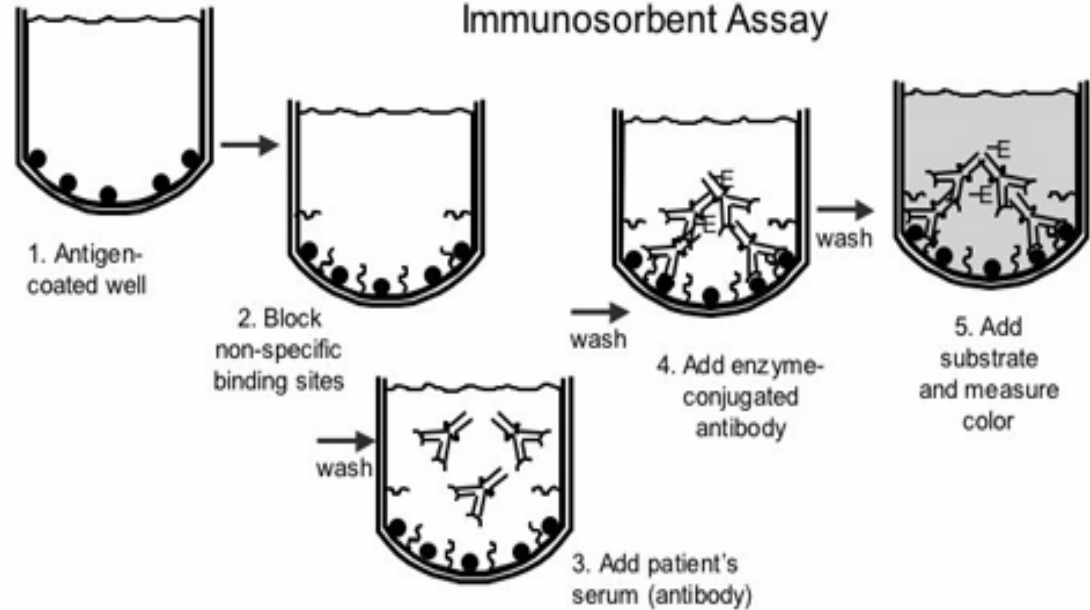
酵素結合免疫
吸附分析法

RIA: 放射免疫分析法

Radioimmunoassay



ELISA: Enzyme-Linked
Immunesorbent Assay



Glucose isomerase | Sweetzyme®



Sweetzyme is a ready-immobilised glucose isomerase which converts D-glucose to D-fructose. Immobilised glucose isomerase is used on a massive scale throughout the world in the production of high-fructose syrups for the confectionery and soft drink industries.

高果糖糖漿的製造

4. 酵素在其它工業上的應用

如皮革工業利用酵素處理皮革，紡織工業利用酵素處理紡織原料，清潔工業利用耐熱性蛋白質水解酶等酵素添加於洗衣粉中

5. 酵素在生物科技方面的應用

近年來，普遍應用限制酶，連結酶與DNA聚合酶於遺傳工程、蛋白質工程與基因療法

《未來展望》

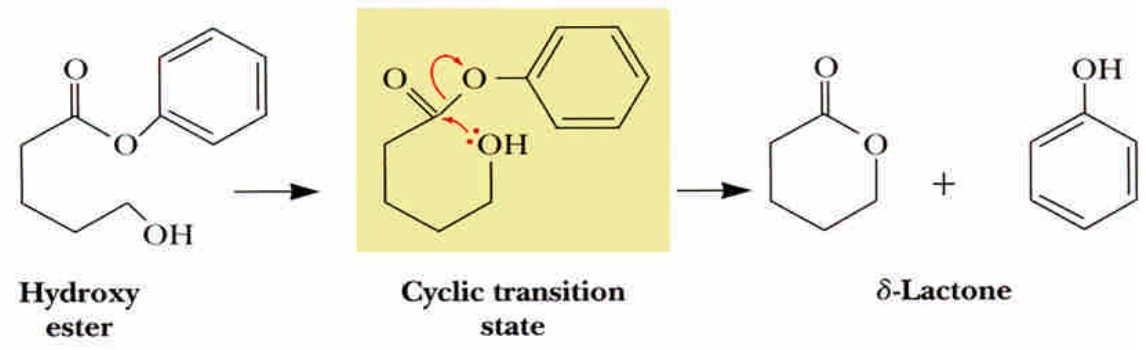
1. 核糖酶(ribozyme或catalytic RNA)

RNA可攜帶遺傳訊息，也可催化反應，在演化初期扮演重要功能

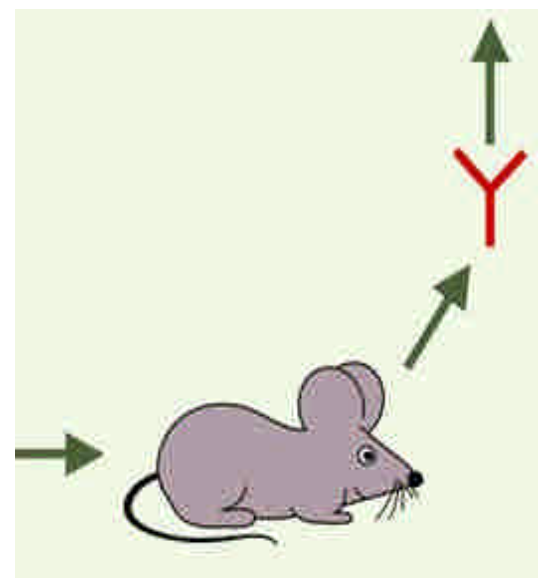
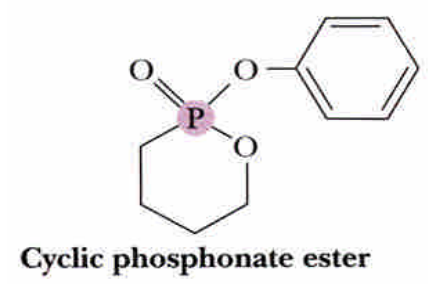
2. 催化性抗體(abzyme或catalytic antibody)*

以酵素反應過程中受質的過渡態類似物為抗原，所製造出的抗體具有加速反應的特性

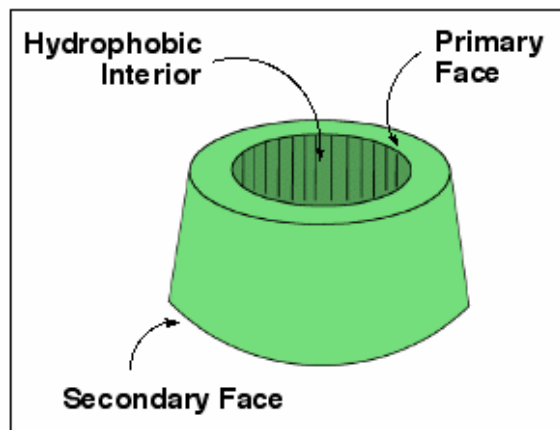
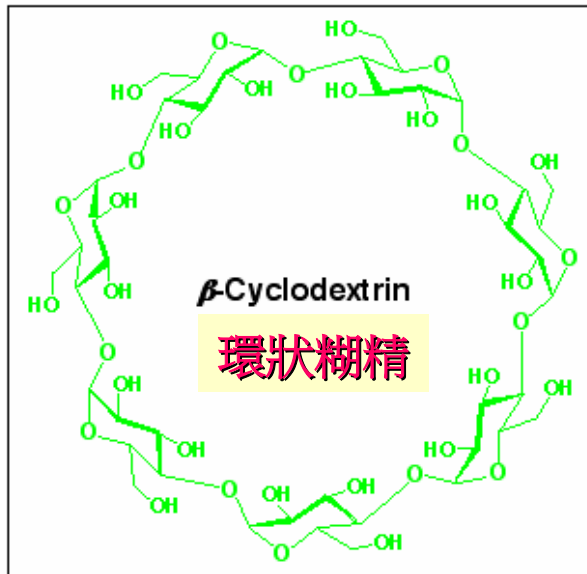
酯類水解過程
受質的過渡態



合成的
過渡態類似物



催化性抗體的製造



人工酵素的製造

3. 人工酵素(synzyme或artificial enzyme)

最常使用非蛋白質成分的環狀糊精*製造，沒有蛋白質
遇高溫、酸、鹼或重金屬時會使催化活性降低或消失
的缺點

4. 新藥物的開發，如蛋白質水解酶的抑制劑研究可用於 AIDS與阿茲海默症的治療