

酵素簡介

《緒論》

1. 生物體具備執行多種化學反應的能力，反應需在環境時時變異之下快速進行，且反應間需相互協調
2. 細胞內的反應通常在溫和的環境中進行，但接受嚴格卻有彈性的調控
3. 在實驗室許多需加熱、加酸或加鹼才能發生的反應，在生物體的體溫(37°C)及近中性的條件下即可迅速進行，因生物體內有酵素(生物催化劑)的存在
4. 大部份的酵素為蛋白質

5. 有些酵素催化反應時，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**)的協助才具有活性
6. 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，如酵母細胞會加速由糖變成酒精的發酵作用及分離出的胃消化液可加速肉類的分解等
7. 當時，許多科學家認為“活”的酵素(如酵母細胞)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**)

8. 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
9. 接著，酵素的本质開始被研究，由於酵素只要稍微加熱就會變質，因此許多生物學家懷疑酵素的本质就是蛋白質，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》

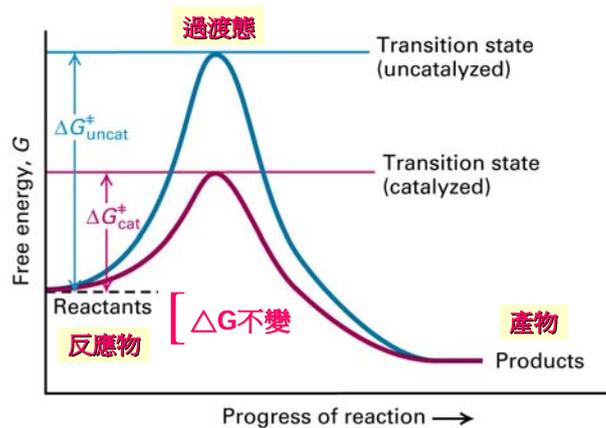
1. 任何生物、任何細胞都含有許多酵素，因此細胞內所有重要反應的進行速度才能因應細胞的生理要求，生物才能生存，生命才得以延續，因此生物的一切特性都是由酵素造成，酵素的重要性可由“Life is a system of cooperating enzyme reactions”的敘述看出
2. 酵素是一些疾病的原因，如**先天性代謝異常**患者通常是體內缺乏某一種酵素所引起的，先天性代謝異常病症若無法及早診斷與治療，通常會造成嚴重的智障等
如半乳糖血症患者，因缺乏將半乳糖轉變成葡萄糖的酵素而導致血液中的半乳糖含量過高；而苯酮尿症患者，則是缺乏將胺基酸中的苯丙胺酸代謝成酪胺酸的酵素

3. 使用含有機磷成份的殺蟲劑或氰化物中毒及鉛中毒等都是因此類物質會阻害重要過程中的酵素活性，如有機磷殺蟲劑會阻斷神經傳導，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，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. 有些酵素甚至可用於疾病的診斷與治療

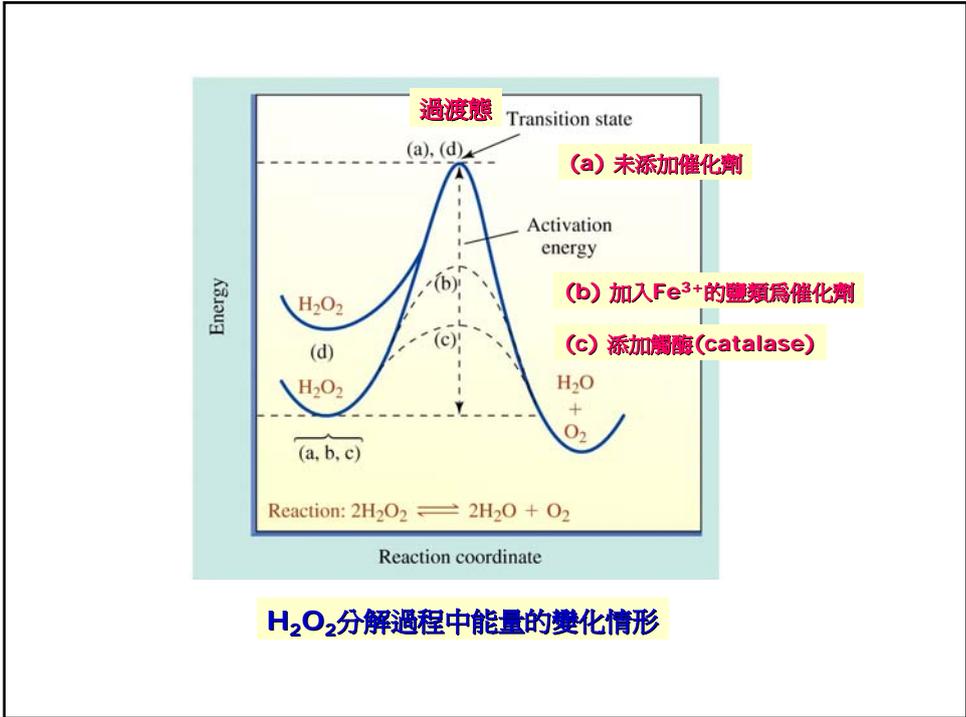
《酵素的特性》

1. 大部份的酵素是蛋白質，因此具有蛋白質的一切特性，因此高溫、過酸、過鹼或重金屬的存在均可能使酵素發生變性，而使原有的催化活性降低或消失
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，並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

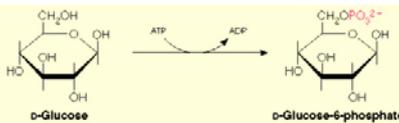
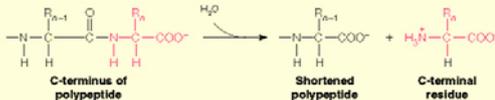
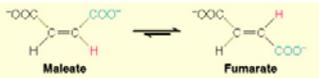
4. 酵素催化的反應雖有數千種，但反應的類別可歸為六類，因此酵素依其催化的反應類別分為**六大類***
 如氧化還原酶催化氧化還原反應，轉移酶催化官能基轉移的反應，水解酶催化水解反應，裂解酶催化鍵結切除的反應，異構化酶催化異構化反應，連接酶催化鍵結生成的反應
5. 生物催化劑(酵素)與一般化學催化劑的**不同處**
 酵素效率高(可加速反應達 10^8 倍)，因此所需量少
 酵素專一性高
 酵素作用條件溫和
 酵素具**活體外活性**且**活性可受阻害劑或活化劑的調節**



化學反應過程中反應物所含能量的變化



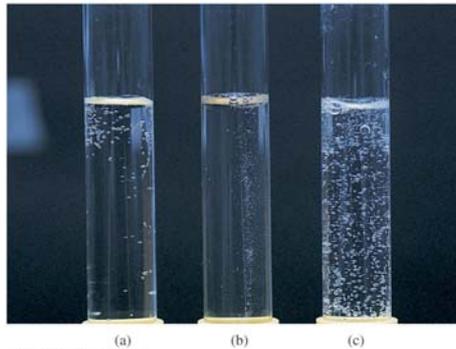
所有酵素依所催化的反應可歸為六大類

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)	$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{H} + \text{CO}_2$ <p style="text-align: center;">Pyruvate Acetaldehyde</p>
5. Isomerases	Malate isomerase (EC 5.2.1.1) (cis-trans isomerization)	 <p style="text-align: center;">Malate Fumarate</p>
6. Ligases	Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1) (carboxylation)	$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{COO}^- + \text{CO}_2 \xrightarrow{\text{ATP}} \text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{C}(=\text{O})\text{COO}^- + \text{ADP} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">Pyruvate Oxaloacetate</p>

6. 以觸酶為例

觸酶催化 $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2$ 的反應

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



含3% H_2O_2 的水溶液置於 37°C

(a) 未添加催化劑

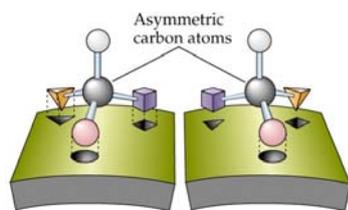
(b) 加入 Fe^{3+} 的鹽類為催化劑

(c) 添加酵素觸酶(catalase)

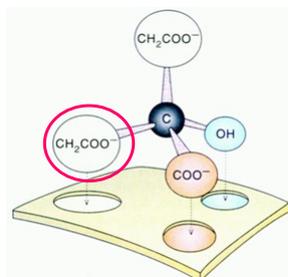
Lowering of the Activation Energy of Hydrogen Peroxide Decomposition by Catalysts			
Reaction Conditions	Activation Free Energy		Relative Rate
	kJ mol^{-1}	kcal mol^{-1}	
No catalyst	75.2	18.0	1
Platinum surface	48.9	11.7	2.77×10^4
Catalase	23.0	5.5	6.51×10^8

7. 酵素的受質專一性*
- 立體異構物的專一性
- 三點接觸理論
 - 鎖與鑰匙模型
 - 誘導填入模型
 - 過渡態穩定模型

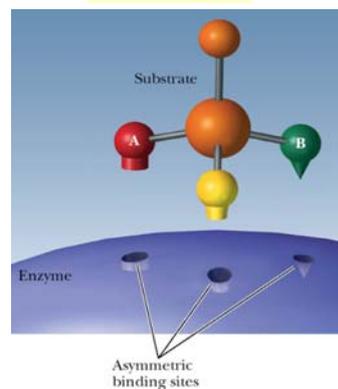
8. 酵素是生物體特有的催化劑，但在適當的條件下，即使細胞的結構被破壞，原有的酵素在細胞外仍具有生物活性，因此各別的酵素可被分離、純化、結晶而用於代謝反應的研究、酵素結構與特性的研究、甚至發展成為化學試劑、藥物、及工業上的催化劑等



酵素的專一性(1)

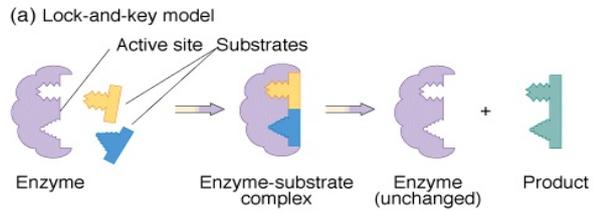


三點接觸理論



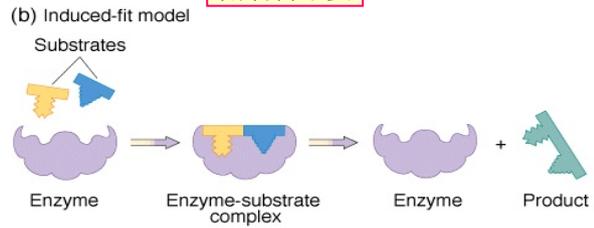
酵素的專一性(2)

鎖與鑰匙模型



兩者皆不變

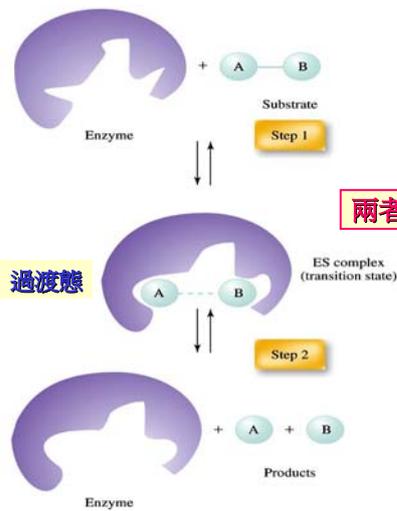
誘導填入模型



一者變一者不變

酵素的專一性(3)

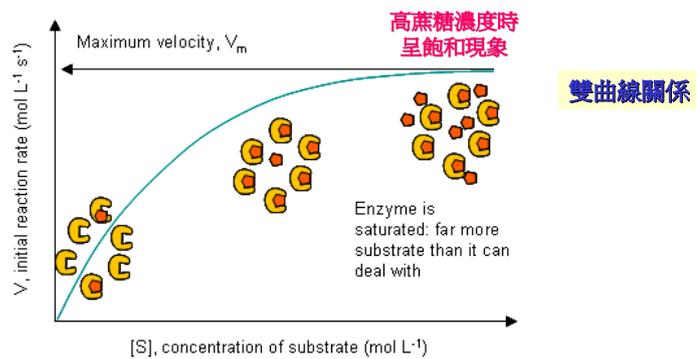
過渡態穩定模型



兩者皆變

《酵素動力學簡介》

1. 酵素動力學研究酵素反應的速率與影響反應速率的因子
2. 早期的動力學研究以蔗糖的水解為主
比較以酸水解蔗糖的反應與以蔗糖酶水解蔗糖的反應
- 蔗糖酶水解蔗糖的反應速率在高濃度蔗糖(受質)存在時有飽和現象
3. Michaelis-Menten方程式
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)



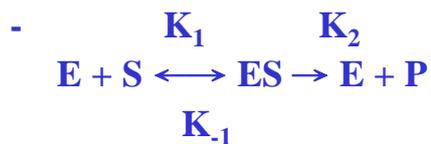
蔗糖濃度對蔗糖水解酶(sucrase)反應速率的影響



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



K_1 = ES (酵素與受質複合體)形成的速率常數

K_{-1} = ES分解的速率常數

K_2 = 產物生成與釋出的速率常數

穩定態假說

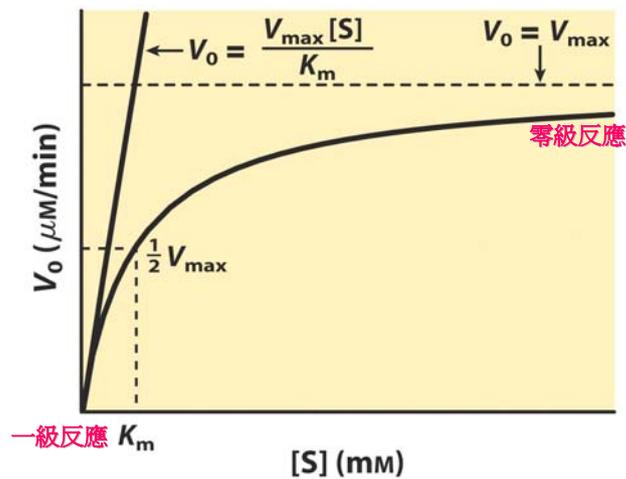
- ES形成的速率等於ES分解的速率($d[ES]/dt = 0$)

Michaelis-Menten方程式

- $V_0 = V_{\max} [S_0] / (K_m + [S_0])$, $K_m = (K_{-1} + K_2) / K_1$
- 當 $[S_0] \geq K_m$, $V_0 = V_{\max}$ 為零級反應
- 當 $[S_0] = K_m$, $V_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$
- 當 $[S_0] \leq K_m$, $V_0 = V_{\max} ([S_0] / K_m)$ 為一級反應

4. 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 $K_{-1} \geq K_2$,
 $K_m = (K_{-1} + K_2) / K_1 = K_{-1} / K_1 = K_d$ (ES的解離常數)
 V_{\max} 為酵素催化效率的指標?



反應速率與受質濃度的關係

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

5. 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 $K_{cat}/K_m = (K_1K_2)/(K_{-1} + K_2) \leq K_1$ ，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

- 酵素具有活性與多功能區
- 酵素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.

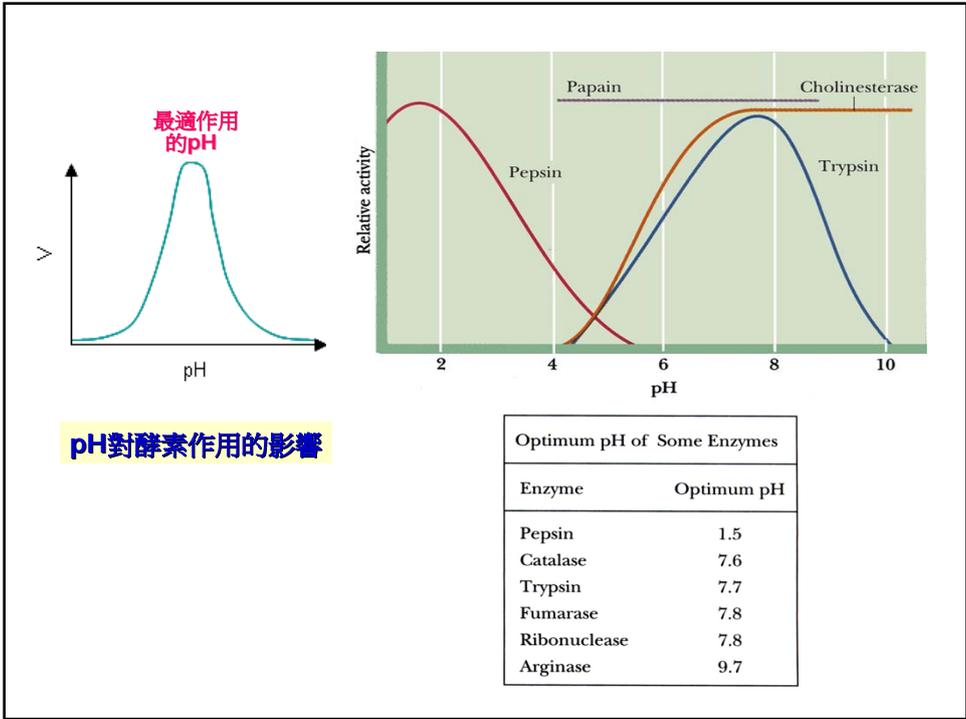
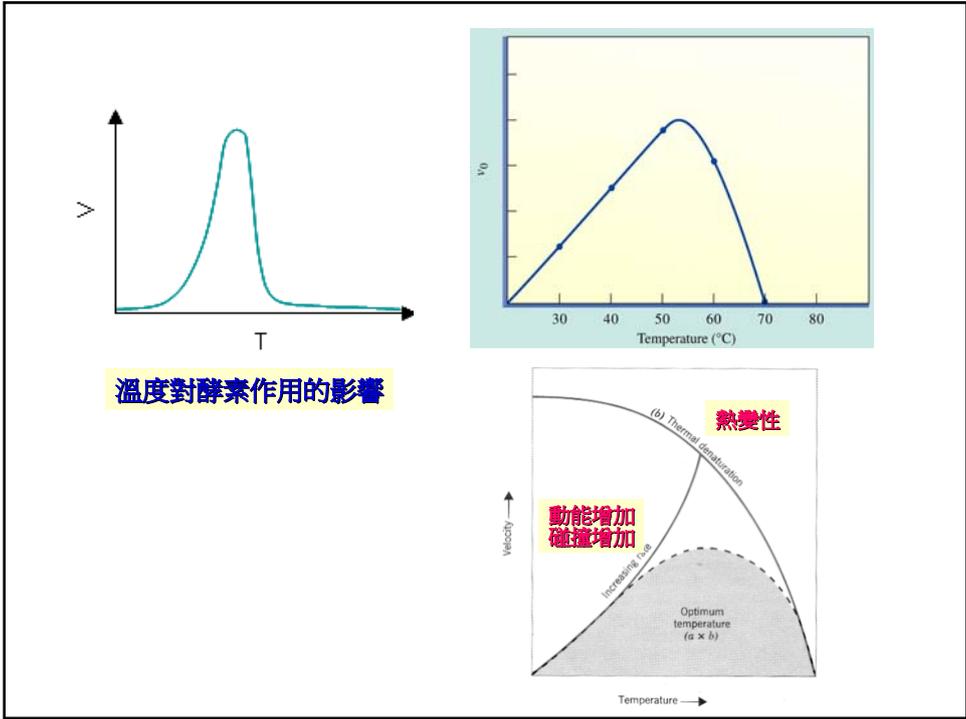
《酵素活性的調節》

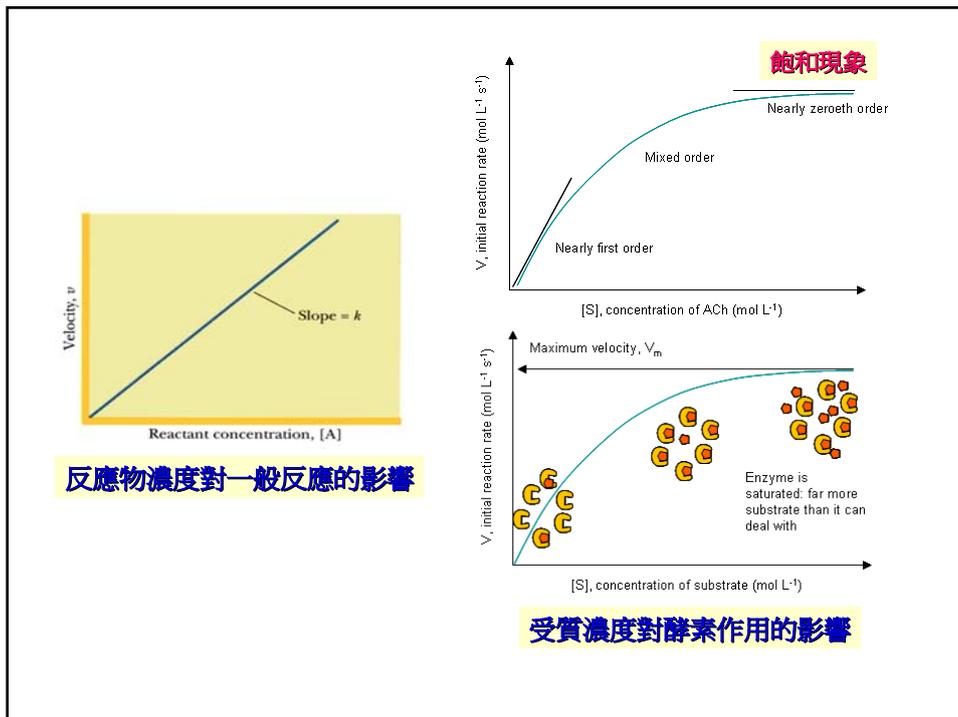
1. 細胞代謝活性的調節對細胞的生存極其重要

2. 代謝活性的調節通常是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





3. 不可逆的切除活化作用

如水解脂質、蛋白質與糖類等細胞成分的消化酵素*，製造後通常以不具活性的先質形式存在，以保護細胞本身結構的完整；當需要時，不具活性的酵素先質會被切除一小段肽鏈後而具有活性

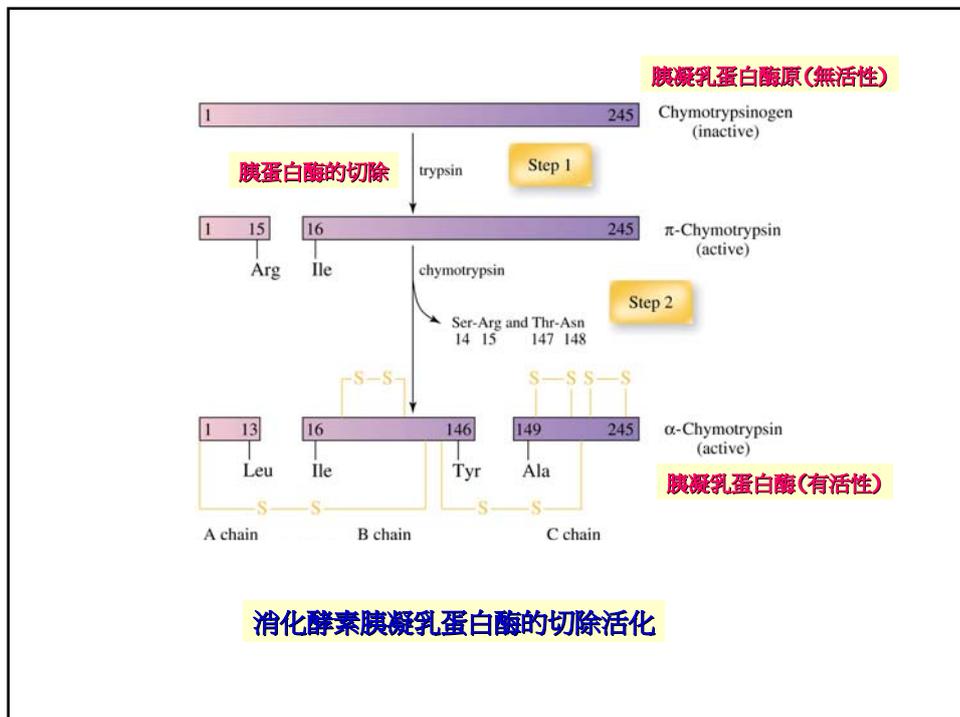
如凝血反應*中的凝血酶原與血纖維蛋白原

如激素原(胰島素原)的活化*

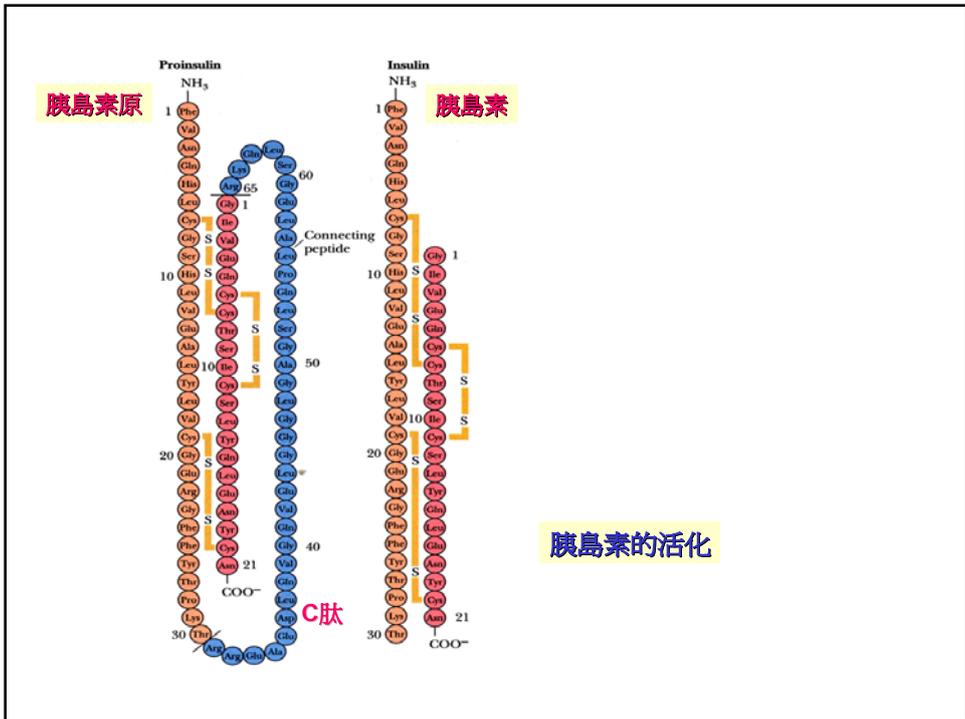
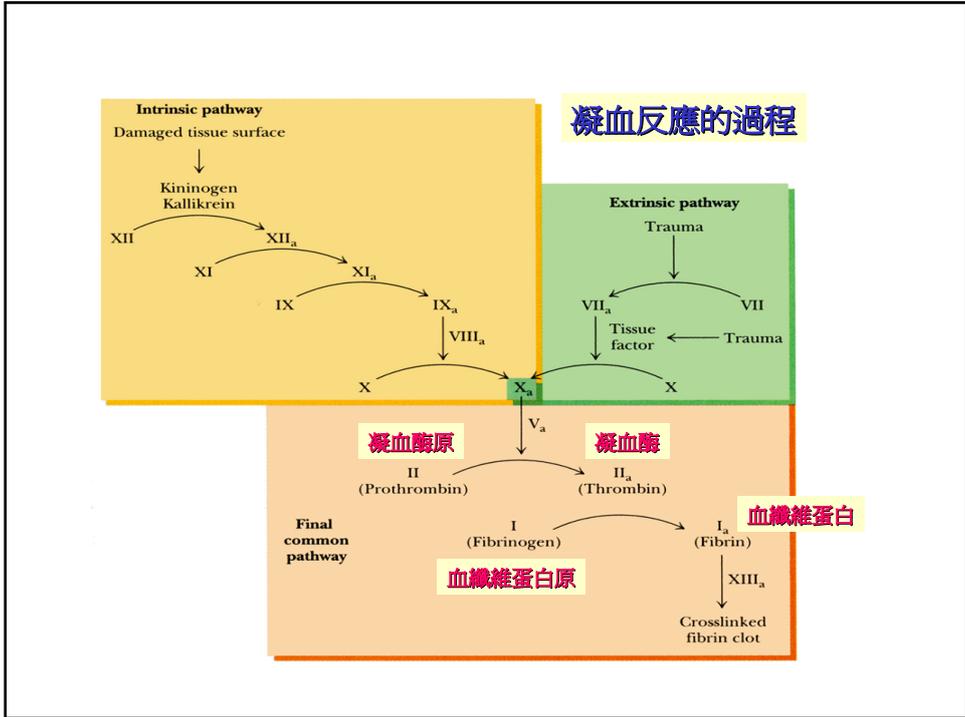
如細胞程式死亡*中的多種蛋白質水解酶

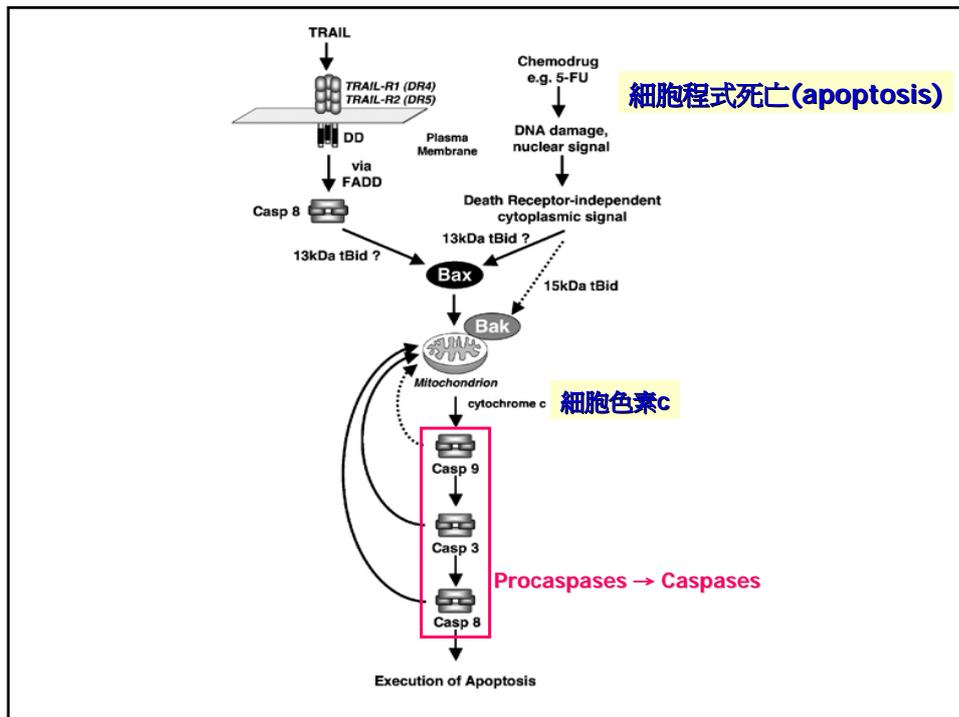
Pancreatic and Gastric Zymogens		
Origin	Zymogen	Active Protease
Pancreas	Trypsinogen	Trypsin
Pancreas	Chymotrypsinogen	Chymotrypsin
Pancreas	Procarboxypeptidase	Carboxypeptidase
Pancreas	Proelastase	Elastase
Stomach	Pepsinogen	Pepsin

消化酵素多以不具活性的先質形式存在



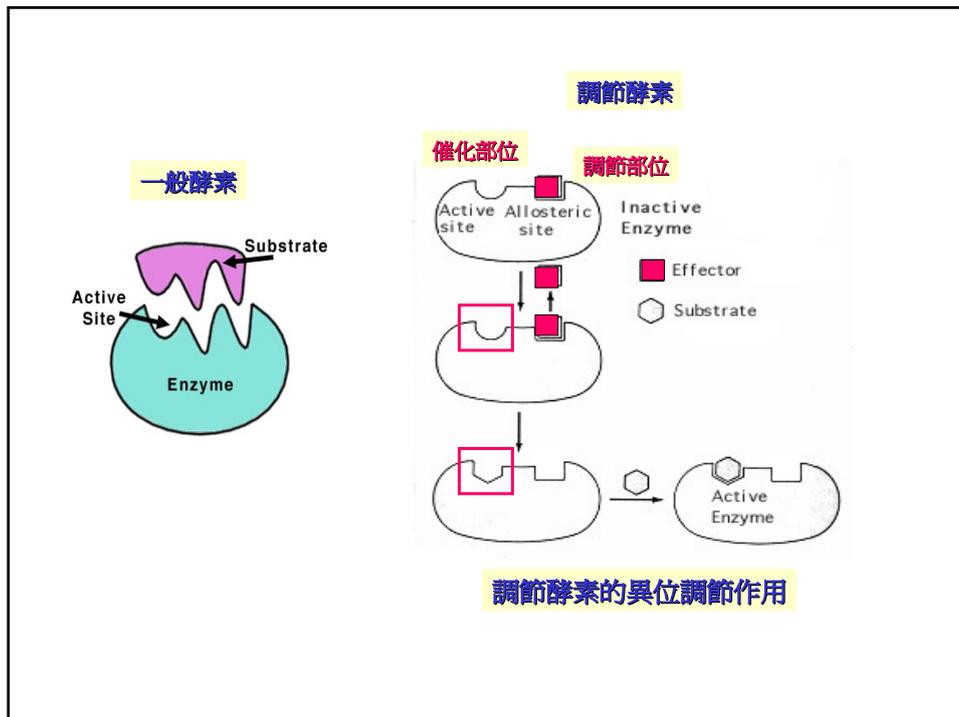
消化酵素胰凝乳蛋白酶的切除活化





4. 可逆的異位調節作用

此調節作用適用於具有四級構造的異位酵素或調節酵素*，此類酵素具有催化部位(活性部位)與調節部位 - 當酵素的調節劑(活化劑或阻害劑)與酵素的調節部位接合時，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可傳遞至催化部位，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

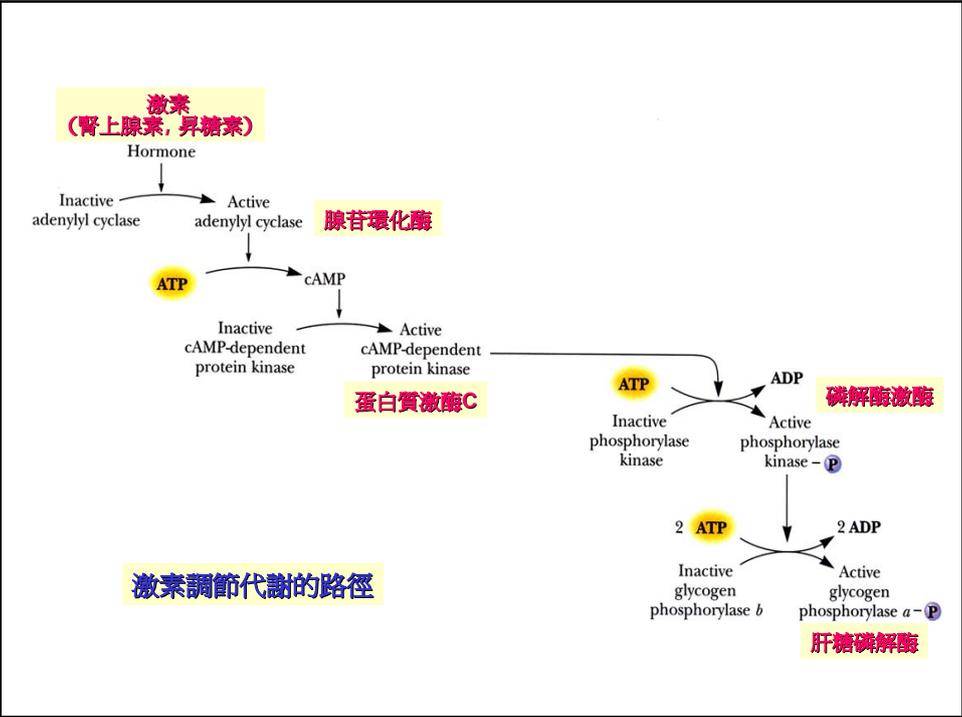
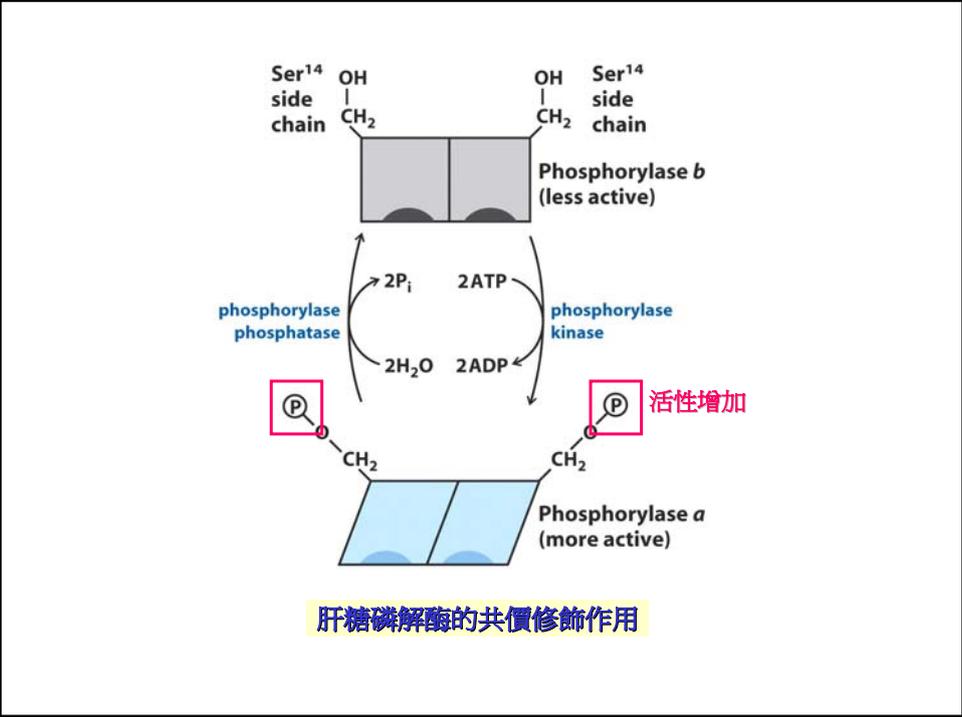


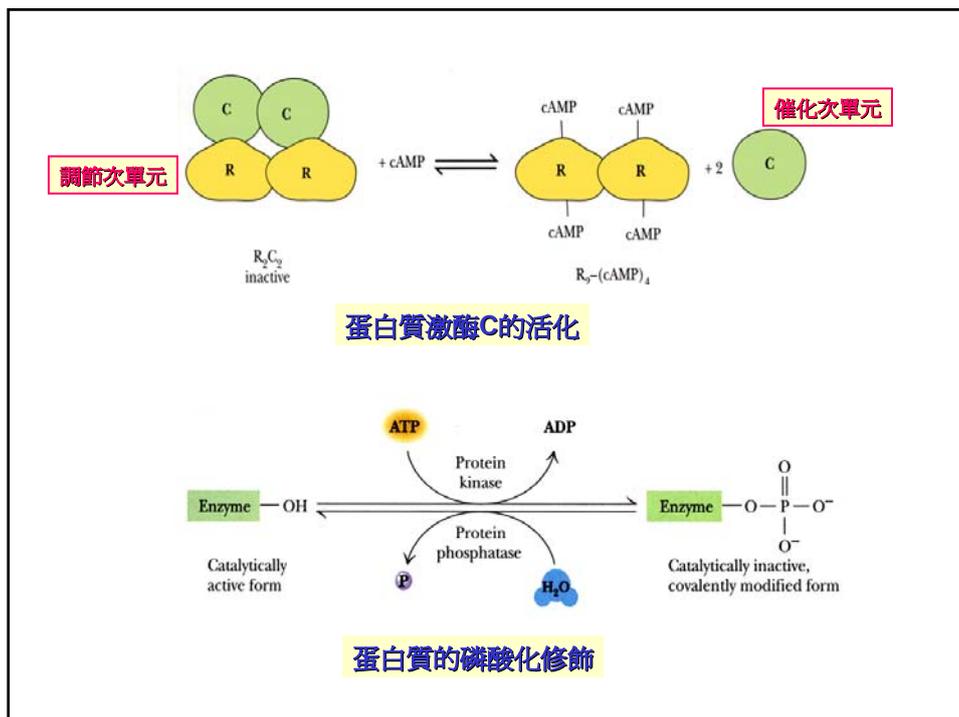
5. 可逆的共價修飾作用

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)而改變其活性，此修飾作用(磷酸化)屬共價鍵結的生成，因此需其他酵素的參與，此機制通常是細胞代謝受激素調節的結果

6. 其他機制

在長期的代謝調適過程中，亦可透過激素的作用使特定種類的酵素表現量增加或減少





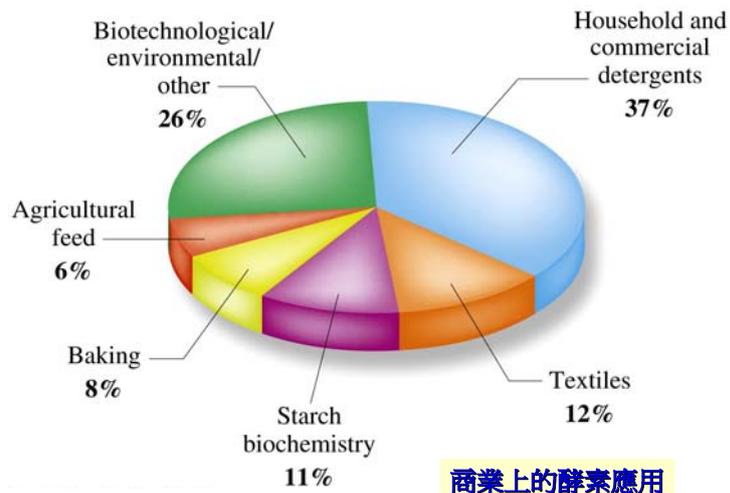
《酵素的應用》

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

可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等含量的常規檢查，如葡萄糖氧化酵素用於定量血中及尿中的葡萄糖量*

可利用酵素做為診斷疾病的輔助工具或治療效果的評估指標，如分析血液中轉胺酵素GPT與GOT的含量*檢查肝功能，分析酸性磷酸根水解酵素以篩檢前列腺癌



商業上的酵素應用

肝功能檢查

SGOT	或稱OT轉氨、AST，參考值為5~40U/L，若增加則懷疑心臟、肝臟方面疾病，或肌肉損傷或其他因素引起。
SGTP	或稱PT轉氨、ALT，參考值為5~40U/L，若升高為肝臟、腎臟方面疾病引起。
總膽色素	分直接膽色素及間接膽色素，直接膽色素參考值為0~0.4mg/dL，若增加為黃疸性的肝膽疾病等引起。間接膽色素參考值為0.2~0.8mg/dL，若增加為溶血性疾病或紅血球的破壞增加等引起。
鹼性磷酸	肝膽方面的疾病、骨骼方面的受損及其他因素引起，成長發育中的青少年也會有偏高現象。

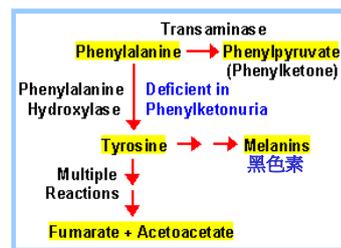
血糖機



可以酵素為治療疾病的藥劑，如天門冬醯胺酸的水解酶*可治療白血病(血癌)，尿激酶*可治療血栓症，及清理傷口*與預防蛀牙等

可利用酵素抑制的原理治療疾病*，如痛風的治療，高膽固醇的治療與消炎等

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

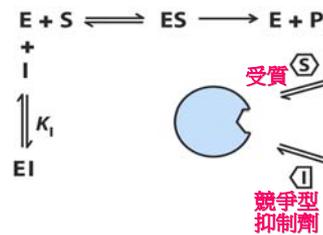
競爭型抑制劑(為酵素受質的類似物)

臨床用藥

- 不可逆抑制作用

盤尼西林

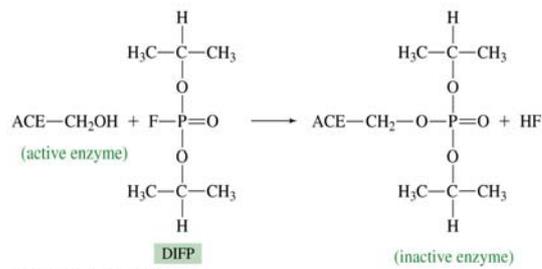
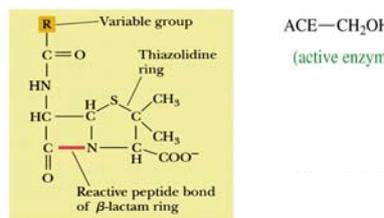
含有機磷農藥



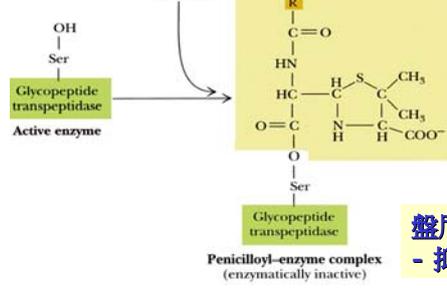
Substrate	Product	Competitive inhibitor
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Succinate</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{HC} \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Fumarate</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\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

$$\text{Succinate} \xrightarrow[\text{2H}]{\text{SDH}} \text{Fumarate}$$

受質 (Succinate)
競爭型抑制劑 (Malonate)



有機磷農藥的作用機制
- 抑制乙酰膽鹼水解酶



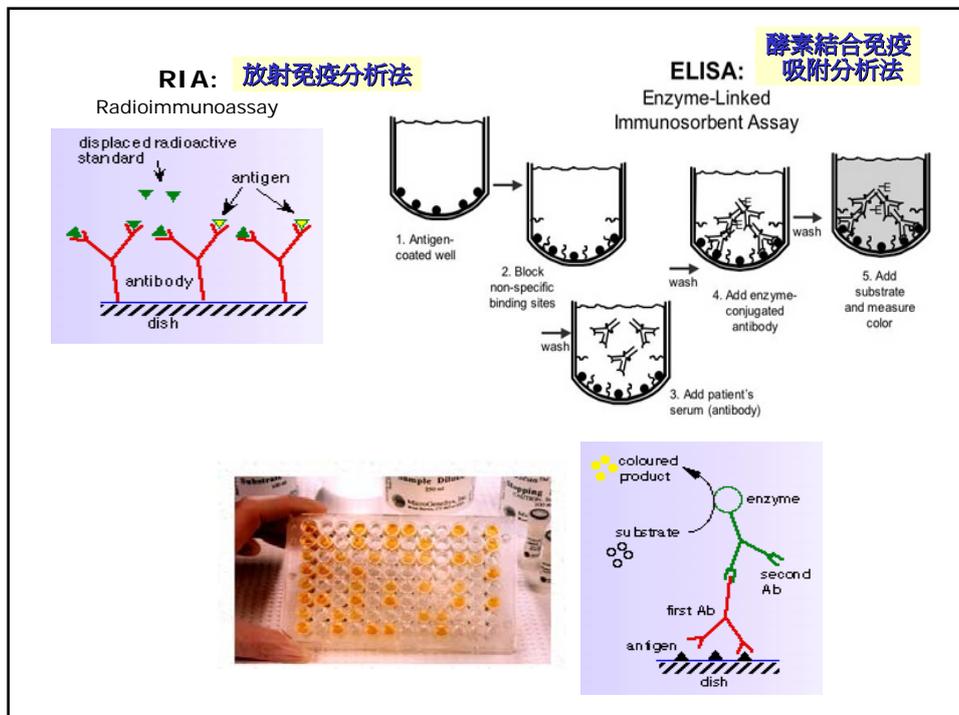
盤尼西林的作用機制
- 抑制參與細胞壁合成的酵素

3. 酵素在工業上的應用

用於食品工業原料的新鮮度、純度及品質的檢測，如分析原料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低溫滅菌過程是否完全

可以酵素免疫分析法*檢驗牛肉產品中有否有馬肉攙假
食品加工方面，如製造果糖漿*與製造不含乳糖的奶粉等特殊配方食品以提供乳糖不耐症患者使用

製藥工業方面，如廣效性抗生素的製造



Glucose isomerase | Sweetzyme®



高果糖糖漿的製造

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.

4. 酵素在其它工業上的應用

如以酵素處理皮革工業與紡織工業的原料，如洗衣粉中添加耐熱性的蛋白質水解酵素等

5. 近年來更有酵素在生物科技方面的應用

如遺傳工程、蛋白質工程與基因療法等等應使用的酵素

《未來展望》

1. 核糖酶(ribozyme, catalytic RNA)

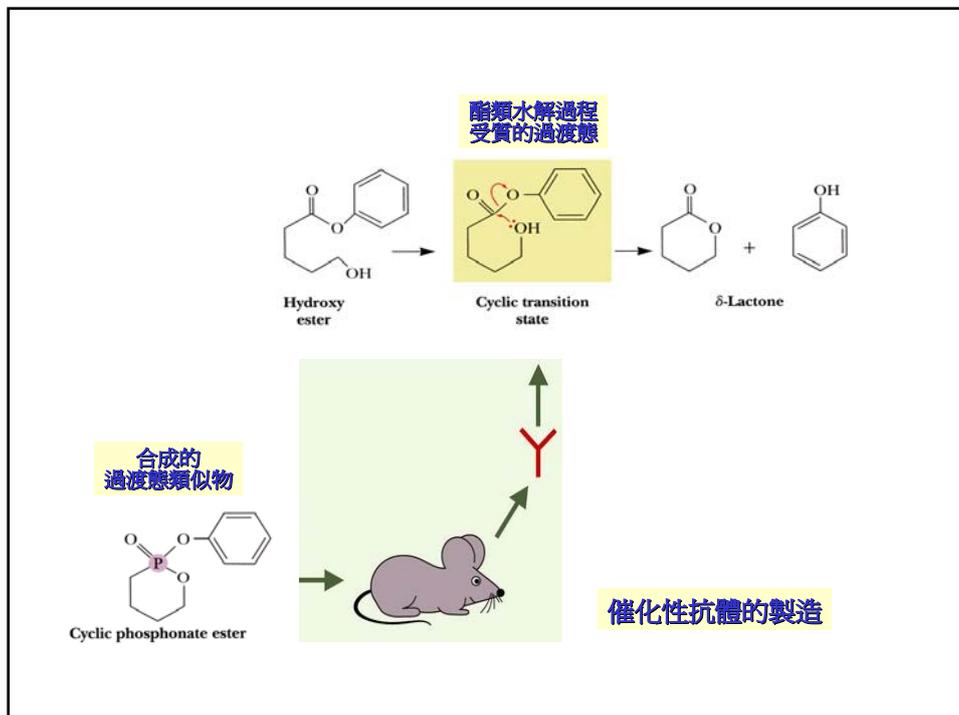
RNA既可攜帶遺傳訊息，也可催化反應，在演化初期扮演重要功能

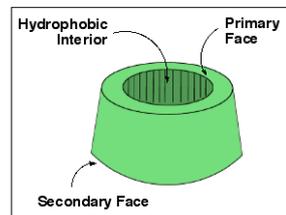
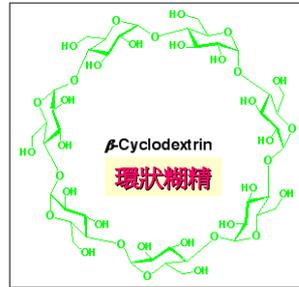
2. 催化性抗體(abzyme, catalytic antibody)*

以酵素反應過程中受質的過渡態類似物為抗原所製造的抗體，具有加速反應的特性

3. 人工酵素(synzyme, artificial enzyme)

環狀糊精*為最常用者，為非蛋白質成分，無蛋白質遇高溫、過酸、過鹼或重金屬時而使催化活性降低或消失的缺點





人工酵素的製造

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