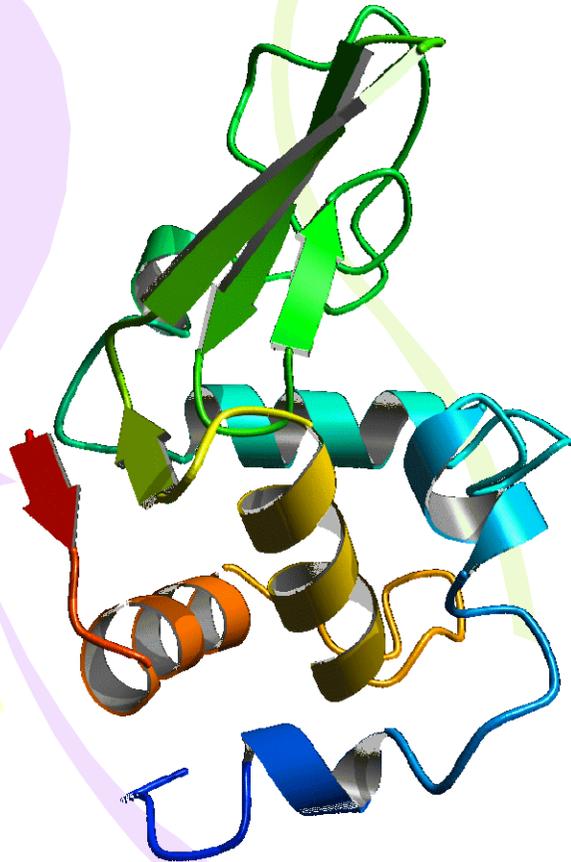


《生化工程》

Biochemical Engineering

第二章 均相酶催化反应动力学



Lysozyme

实例

- 脂肪酶催化酯化反应: 生物柴油



- 高果糖浆:



化学反应的基础知识

- 反应进行的方向
- 反应进行的可能性
- 反应进行的限度

化学热力学

- 反应进行的速率
- 反应机制

化学动力学

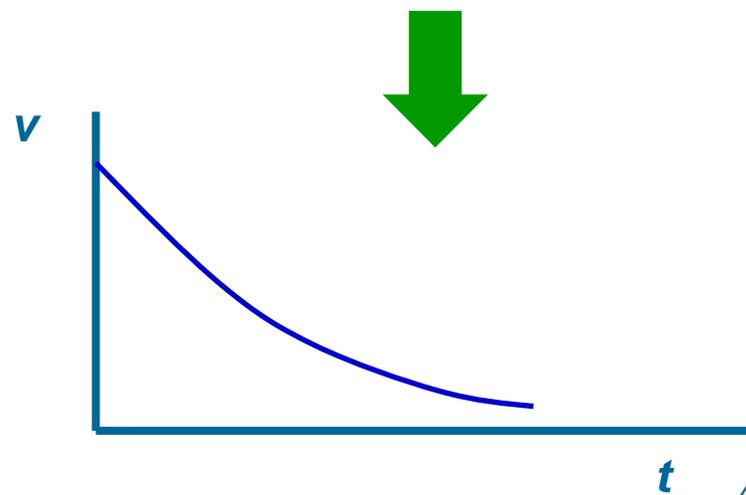
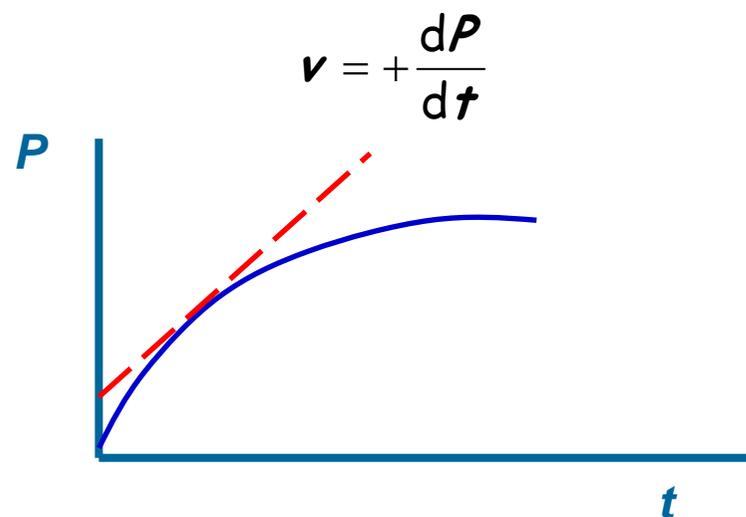
反应速率及其测定

- 反应速率：单位时间内反应物或生成物浓度的改变。
- 设瞬时 dt 内反应物浓度的很小的改变为 dS ，则：

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

- 若用单位时间内生成物浓度的增加来表示，则：

$$v = +\frac{dP}{dt}$$



反应分子数

- **反应分子数**：是在反应中真正相互作用的分子的数目。
- 如：A → P 属于单分子反应
- 根据质量作用定律，单分子反应的速率方程式是：

$$v = k[A]$$

- 双如：A+B → C+D 属于双分子反应
- 其反应速率方程可表示为：

$$v = k[A][B]$$

- 判断一个反应是单分子反应还是双分子反应，必须先了解反应机制，即了解反应过程中各个单元反应是如何进行的。
- 反应机制往往很复杂，不易弄清楚，但是反应速率与浓度的关系可用实验方法来确定，从而帮助推论反应机制。

反应级数

根据实验结果，整个化学反应的速率服从哪种分子反应速率方程式，则这个反应即为几级反应。

例：对于某一反应其总反应速率能以单分子反应的速率方程式表示，那么这个反应为**一级反应**。

又如某一反应： $A + B \rightarrow C + D$

$$v = k[A][B]$$

式中 k 为反应速率常数

符合双分子反应的表达式，为**二级反应**。

把反应速率与反应物浓度无关的反应叫做**零级反应**。

$$v = k$$

$$[A]^0$$

- 反应分子数和反应级数对简单的基元反应来说是一致的，但对某些反应来说是不一致的。例如：

Sucrase

- **Sucrose + H₂O → Glucose + Fructose**
- 是双分子反应，但却符合一级反应方程式。

因为蔗糖的稀水溶液中，**水的浓度比蔗糖浓度大得多**，水浓度的减少与蔗糖比较可以忽略不计。因此，反应速率只决定于蔗糖的浓度。

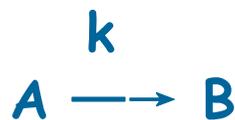
$$v = k [S]$$

酶促反应动力学基础—反应速率

● 零级反应

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = r_{\max}$$

● 一级反应

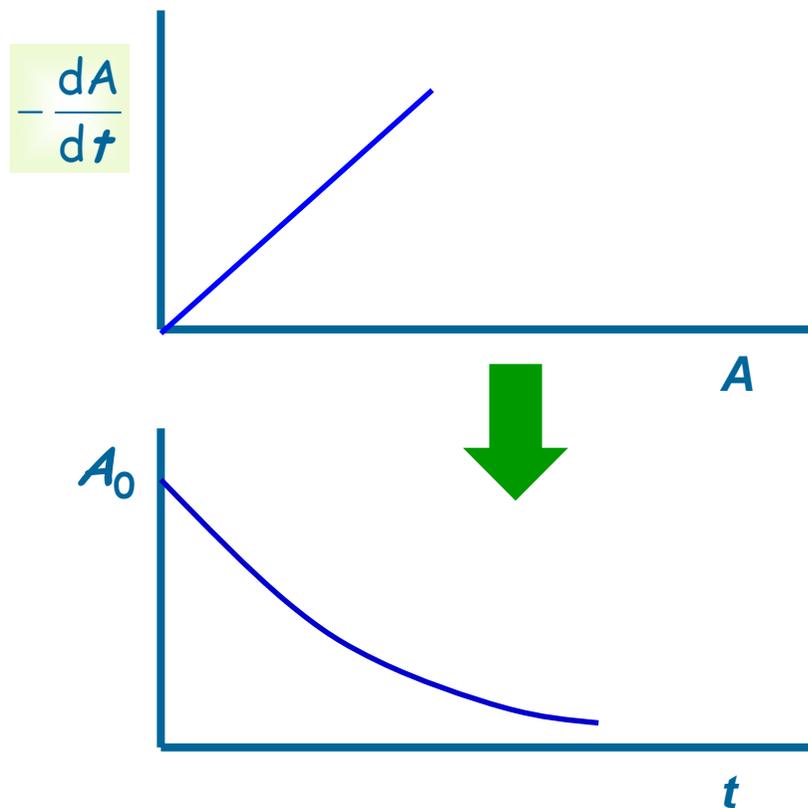


$$v = -\frac{dA}{dt} = kA$$

积分后得: $\ln A = -kt + C$

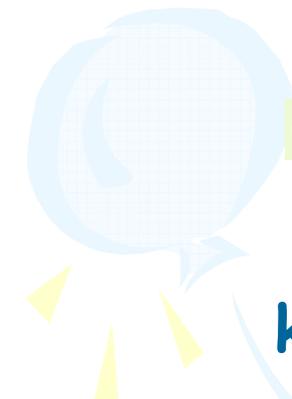
这儿: k 是反应速率常数, C 是积分常数

若反应开始($t=0$)时, $A=A_0$, 则 $C=\ln A_0$, 最后得到: $A=A_0e^{-kt}$



一级反应




$$v = kAB$$

k指反应的速率常数。



反应速率与反应物的性质和浓度、温度、压力、催化剂及溶剂性质有关

酶促反应动力学基础—平衡常数

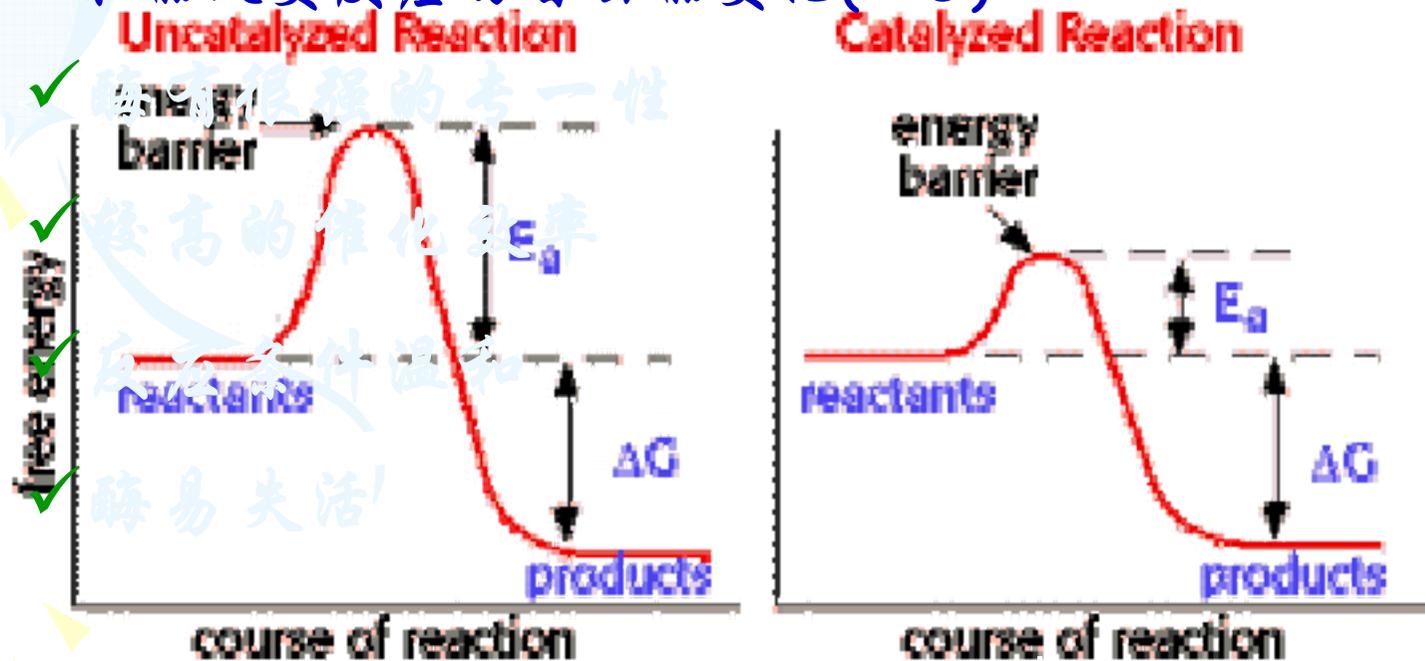
- 平衡：可逆反应的正向反应和逆向反应仍在继续进行，但反应速率相等的动态过程。
- 反应的平衡常数与酶的活性无关，与反应速率的大小无关，而与反应体系的温度、反应物及产物浓度有关。
- 平衡常数(K)的计算：



$$K = \frac{C^2 D}{A \cdot B^3}$$

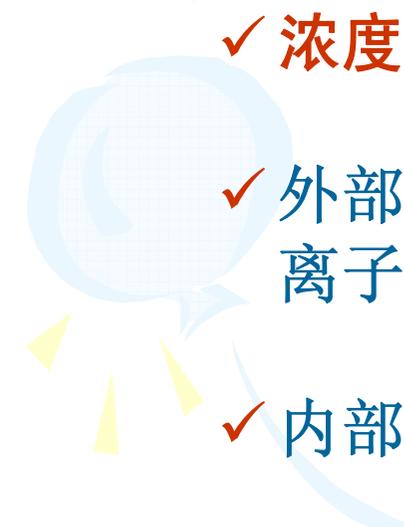
酶的基本概念

- 酶可加快反应速率
- 降低反应的活化能(E_a)
- 不能改变反应的平衡常数K
- 不能改变反应的自由能变化(ΔG)





酶促反应动力学基础

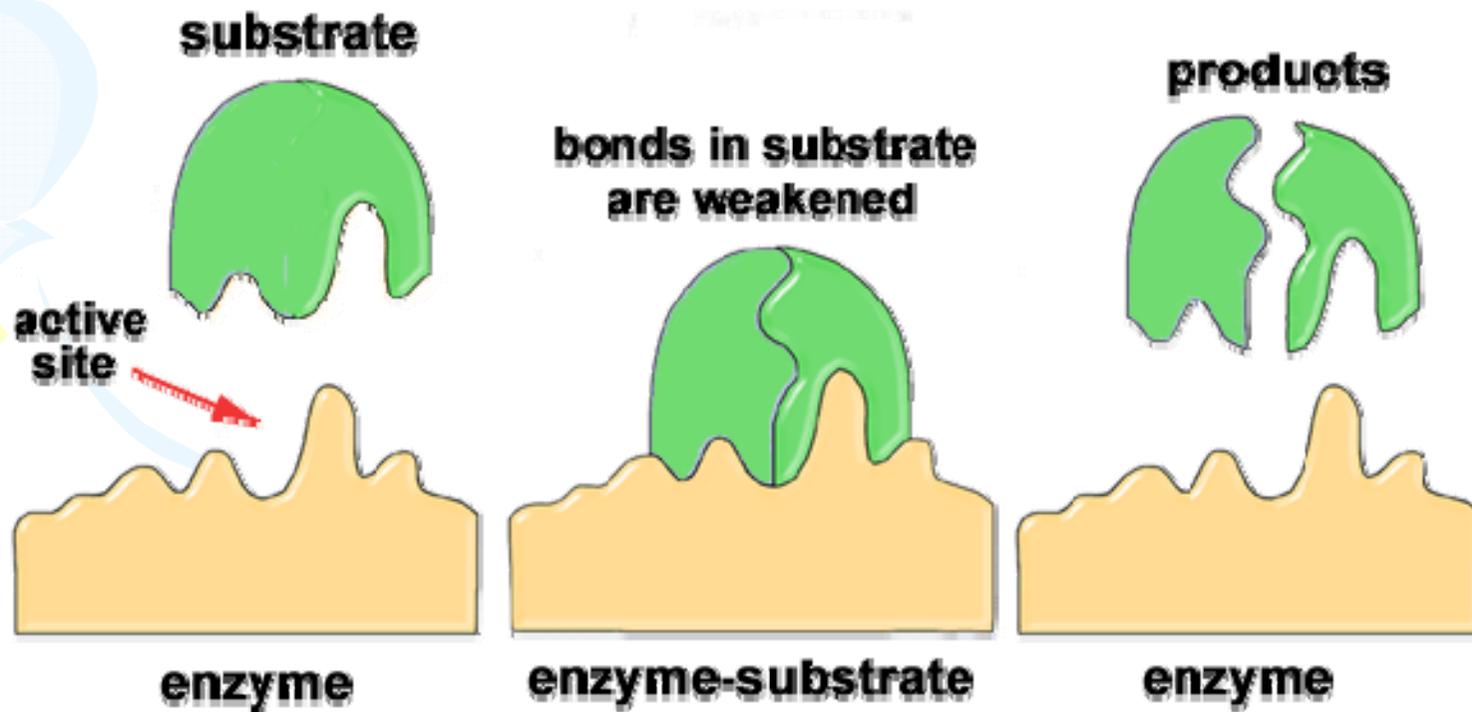


● 影响酶促反应的主要因素

- ✓ **浓度因素**（酶浓度，底物浓度，产物浓度等）
- ✓ **外部因素**（温度，压力，**pH**，溶液的介电常数，离子强度等）
- ✓ **内部因素**（效应物，酶的结构）

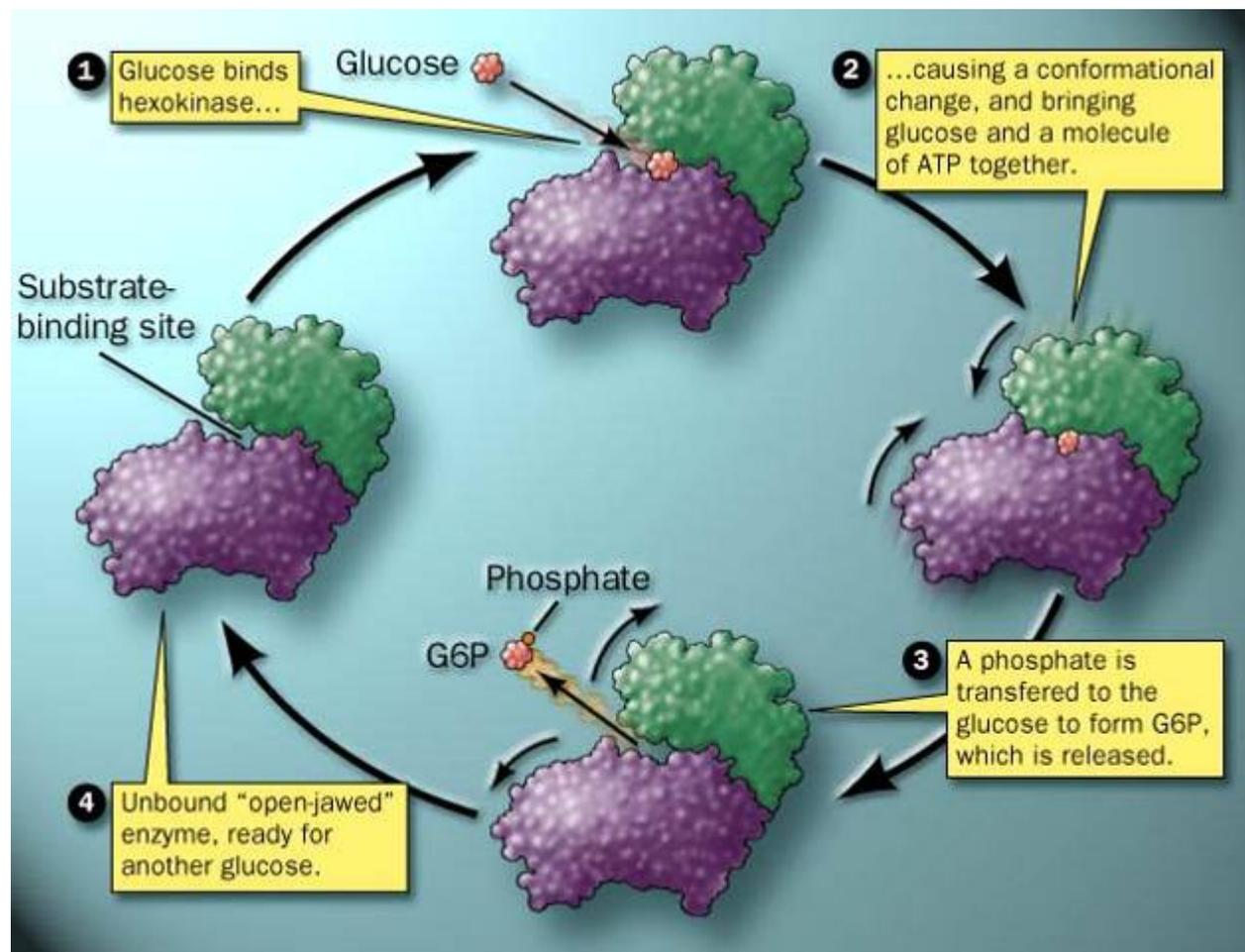
酶与底物的作用机理

- Lock and Key Model



Induced-Fit Model

- 手与手套的关系.
- 当底物接近酶的活性中心并与其结合时，酶的构象能发生改变，更适合于底物的结合。



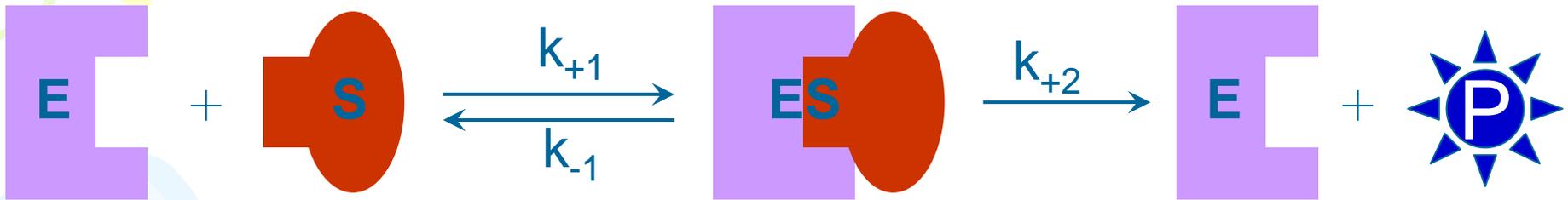
酶反应动力学

➤ 酶反应动力学的两点基本假设：

 反应物在容器中混合良好

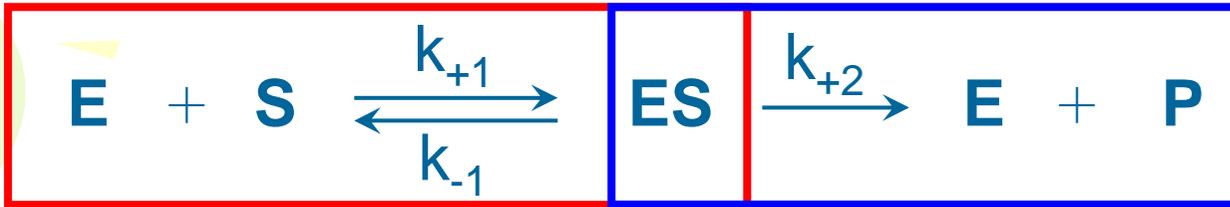
 反应速率采用初始速率

单底物酶促反应动力学



快速平衡学说的几点假设条件:

1. 酶和底物生成复合物[ES], 酶催化反应是经中间复合物完成的。
2. 底物浓度[S]远大于酶的浓度[E], 因此[ES]的形成不会降低底物浓度[S], 底物浓度以初始浓度计算。
3. 不考虑 $P+E \rightarrow ES$ 这个可逆反应的存在。
4. [ES]在反应开始后与E及S迅速达到动态平衡。



快速平衡学说

➤ 对于单底物的酶促反应：

$$\left. \frac{dP}{dt} \right|_{t=0} = - \left. \frac{dS}{dt} \right|_{t=0}$$

由假设4可得到： $k_{+1}[E][S] = k_{-1}[ES]$ (1)

由假设3可得到产物的合成速率为：

$$v_p = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \quad (2)$$

反应体系中**酶量守恒**:

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad (3)$$

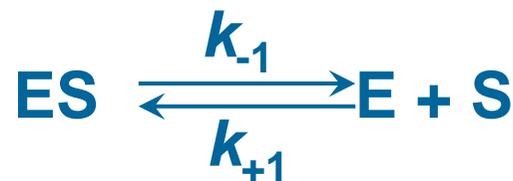
由前面的公式(1)得:

$$[E] = \frac{k_{-1}[ES]}{k_{+1}[S]}$$

代入公式(3), 变换后得:

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{[S] + \frac{k_{-1}}{k_{+1}}}$$

对于酶复合物**ES**的**解离平衡过程**来说,



其**解离常数**可以表示为,

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (4)$$

即,

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{[S] + K_s}$$

代入公式(2)得到

$$v_p = \frac{k_{+2}[E_0][S]}{[S] + K_s} \quad (5)$$

当反应初始时刻，底物 $[S] \gg [E]$ ，几乎所有的酶都与底物结合成复合物 $[ES]$ ，因此 $[E_0] \approx [ES]$ ，反应速率最大，此时产物的最大合成速率为：

$$V_{P_{\max}} = k_{+2}[E_0]$$

代入式(5)得：

$$v_p = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_{+2}[E_0][S]}{K_S + [S]} = \frac{V_{P_{\max}}[S]}{K_S + [S]} \quad (6)$$

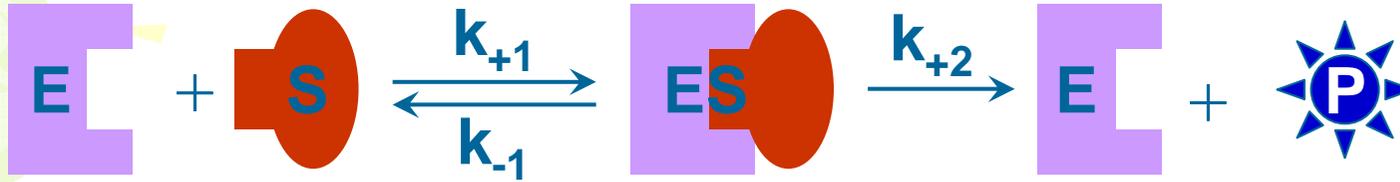
式中：

$V_{p,\max}$ ：最大反应速率

如果酶的量发生改变，最大反应速率相应改变。

K_S ：解离常数，饱和常数

低 K_S 值意味着酶与底物结合力很强，
(看看 K_S 的公式就知道了)。

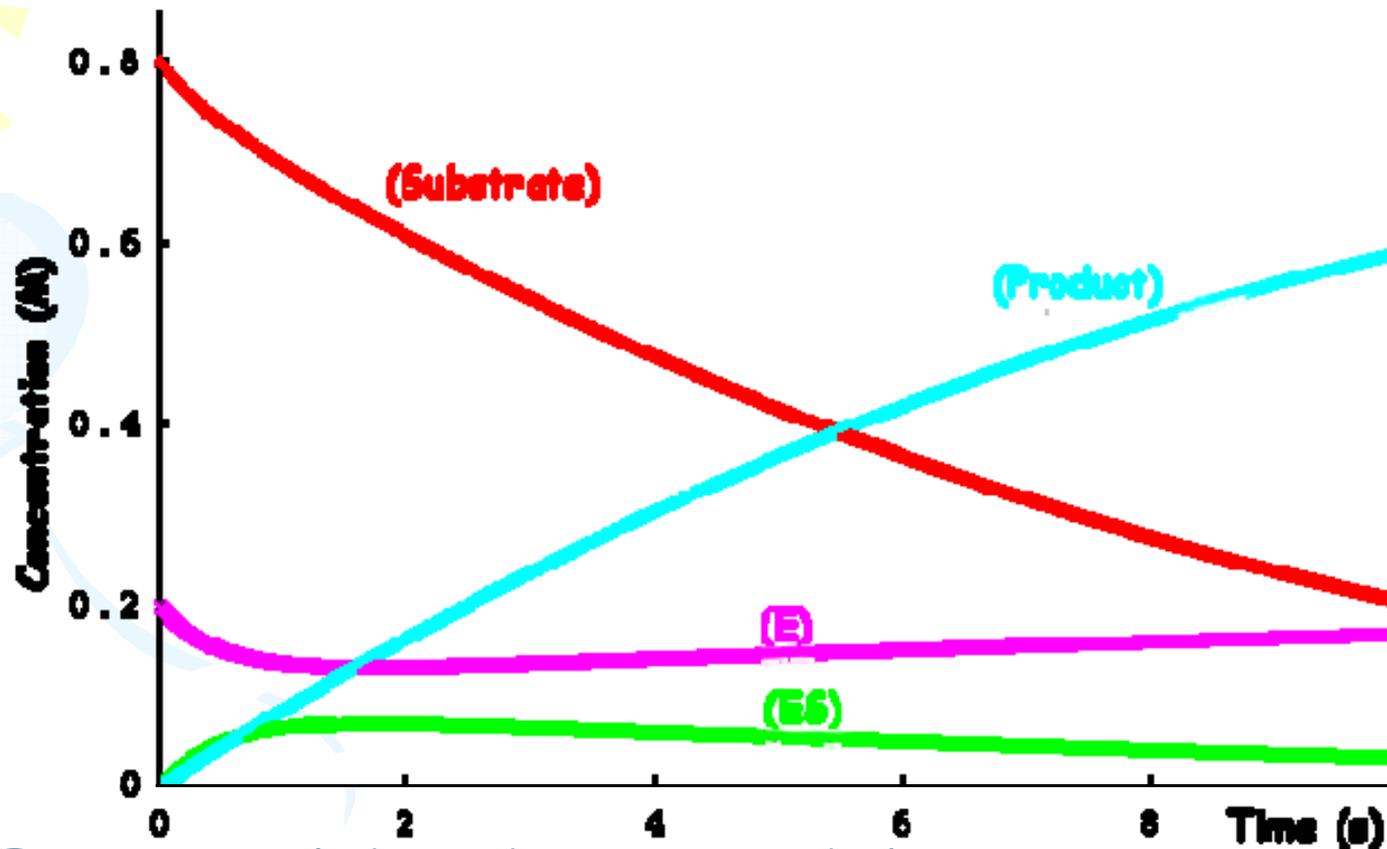


稳态学说

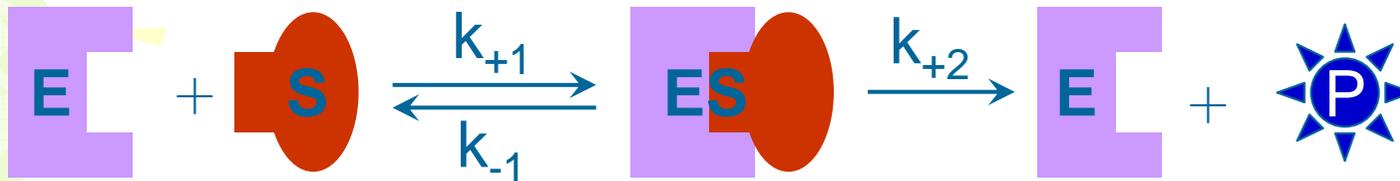
稳态学说的几点假设条件:

1. 酶和底物生成复合物[ES], 酶催化反应是经中间复合物完成的。
2. 底物浓度[S]远大于酶的浓度[E], 因此[ES]的形成不会降低底物浓度[S], 底物浓度以初始浓度计算。
3. 在反应的初始阶段, 产物浓度很低, $P+E \rightarrow ES$ 这个可逆反应的速率极小, 可以忽略不计。
4. [ES]的生成速率与其解离速率相等, 其浓度不随时间而变化。

当反应系统中 $[ES]$ 的生成速率与分解速率相等时， $[ES]$ 浓度保持不变的状态称为稳态。



Experimental data demonstrated the concentration profiles.



由于 $[S] \gg [E_0]$, 所以 $[S] \gg [ES]$, $[S] - [ES] \approx [S]$

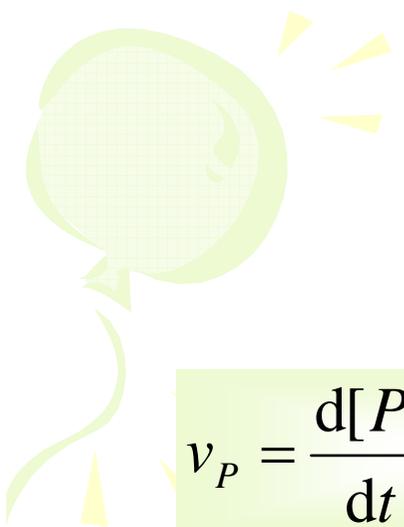
根据稳态假说,

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$$

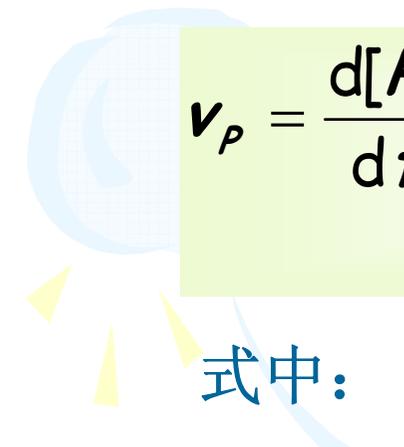
$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES] = 0 \quad (7)$$

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (3)$$

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + [S]} \quad (8)$$

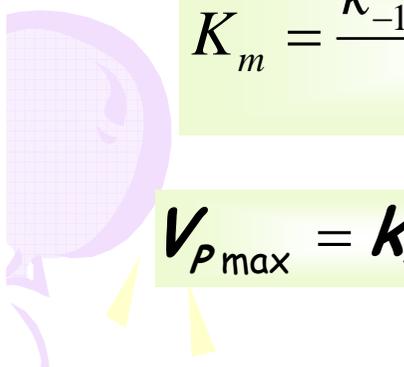

$$v_P = \frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES]$$

(9)


$$v_P = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_{+2}[E_0][S]}{\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} + [S]} = \frac{V_{P\max}[S]}{K_m + [S]}$$

(10)

式中:


$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}$$

(K_m 米氏常数)

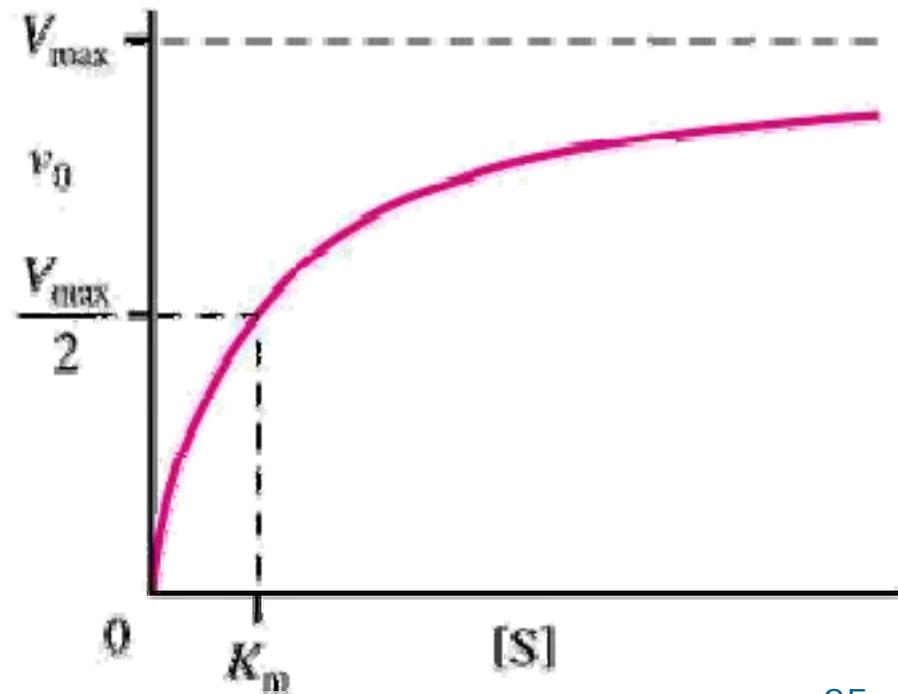
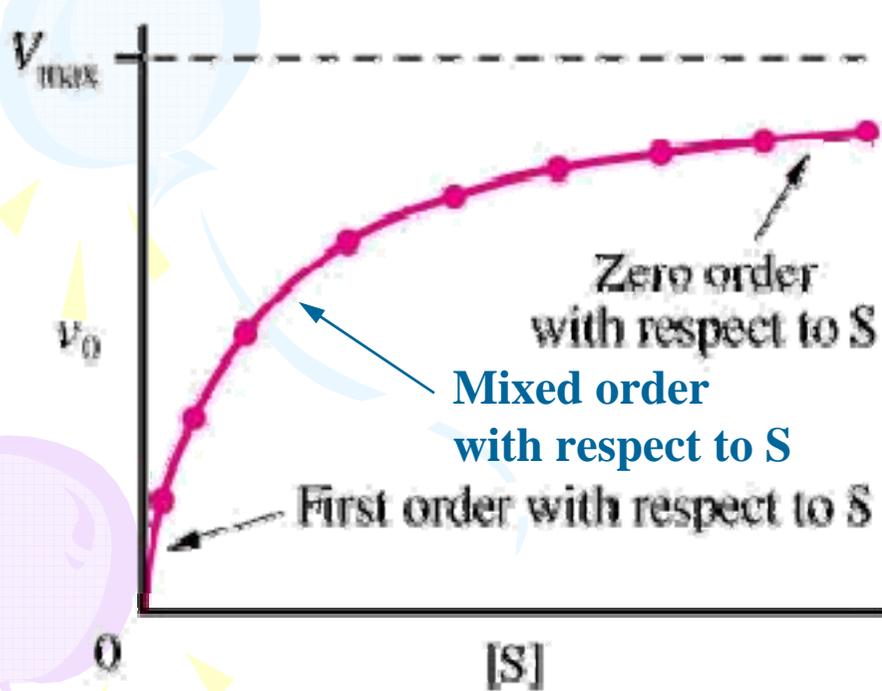
Michaelis-Menten

$$V_{P\max} = k_{+2}[E_0]$$

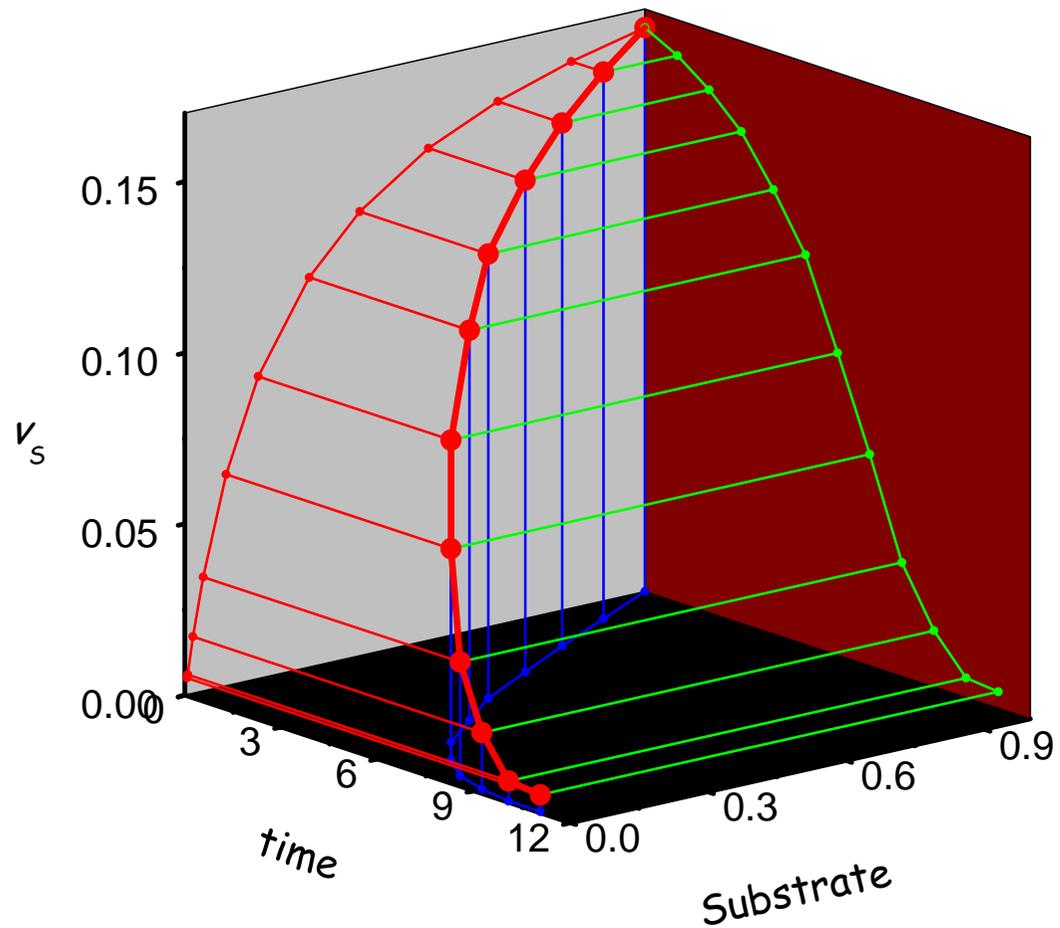
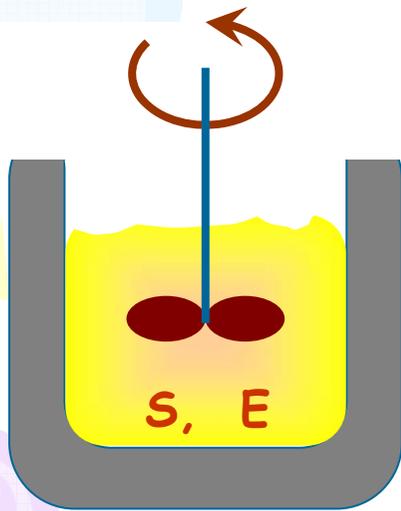
项目	快速平衡学说	稳态学说
假设	酶和底物生成不稳定复合物[ES]，酶催化反应是经该中间复合物完成的，即： $E+S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} [ES] \xrightarrow{k_{+2}} E+P$	
	[ES]在反应开始后与 E 及 S 迅速达到动态平衡 $K_S = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	[ES]的生成速率与其解离速率相等，其浓度不随时间而变化 $\frac{dC_{[ES]}}{dt} = 0$
	底物浓度远高于酶的浓度。 $C_S \gg C_E$	
酶量守恒	$C_{E0} = C_E + C_{[ES]}$	
产物生成速率	$\frac{d[P]}{dt} = k_{+2}C_{[ES]}$	
动力学方程	$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{Pmax}[S]}{K_S + [S]}$	$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{Pmax}[S]}{K_m + [S]}$
K_S 与 K_m	$K_S = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$	$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$

快速平衡学说与稳态学说在动力学方程形式上是一致的，但 K_m 和 K_S 表示的意义是不同的。

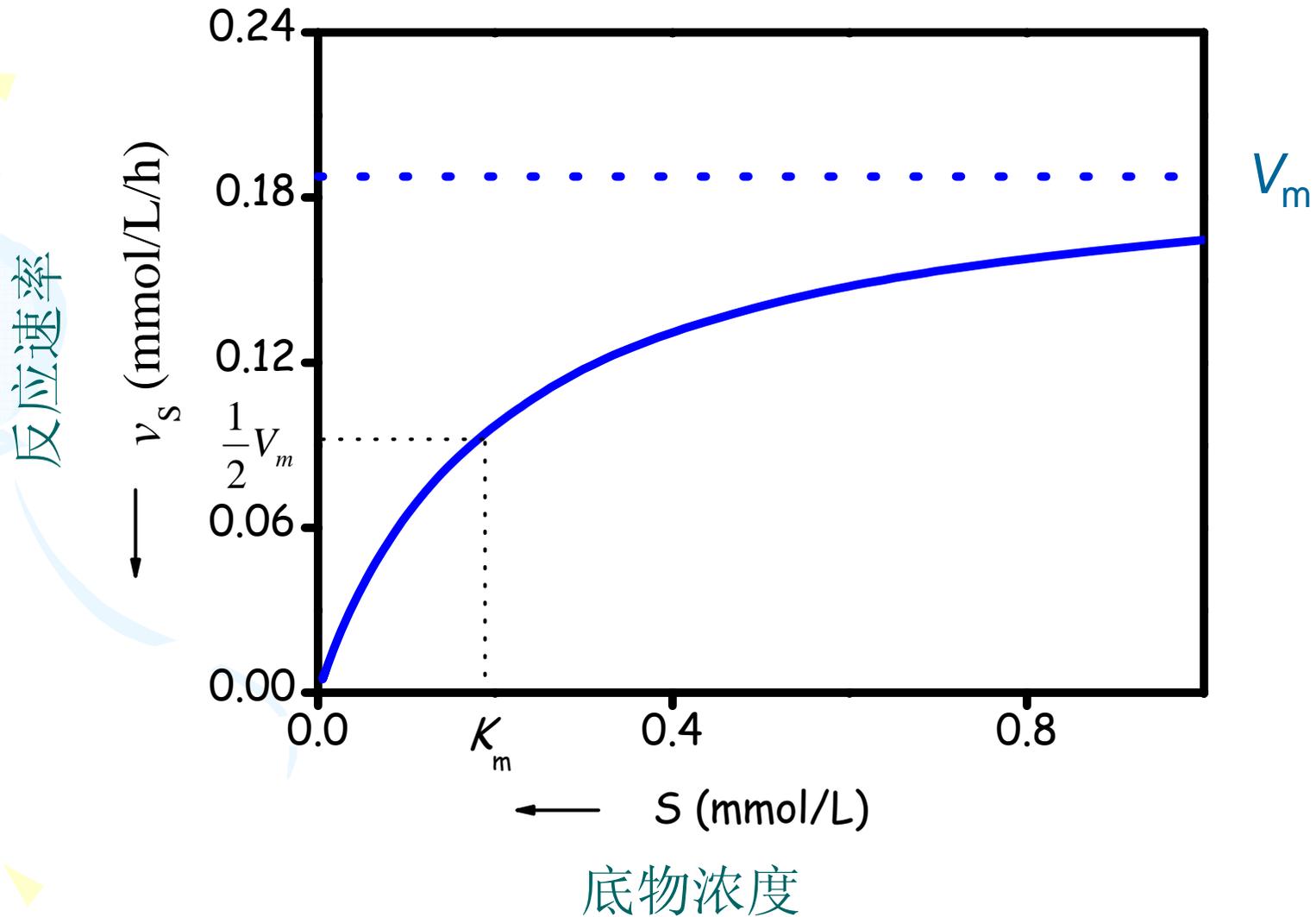
当 $k_{+2} \ll k_{-1}$ 时， $K_m = K_S$ 这意味着生成产物的速率远远慢于[ES]复合物解离的速率。这对于许多酶反应也是正确的。



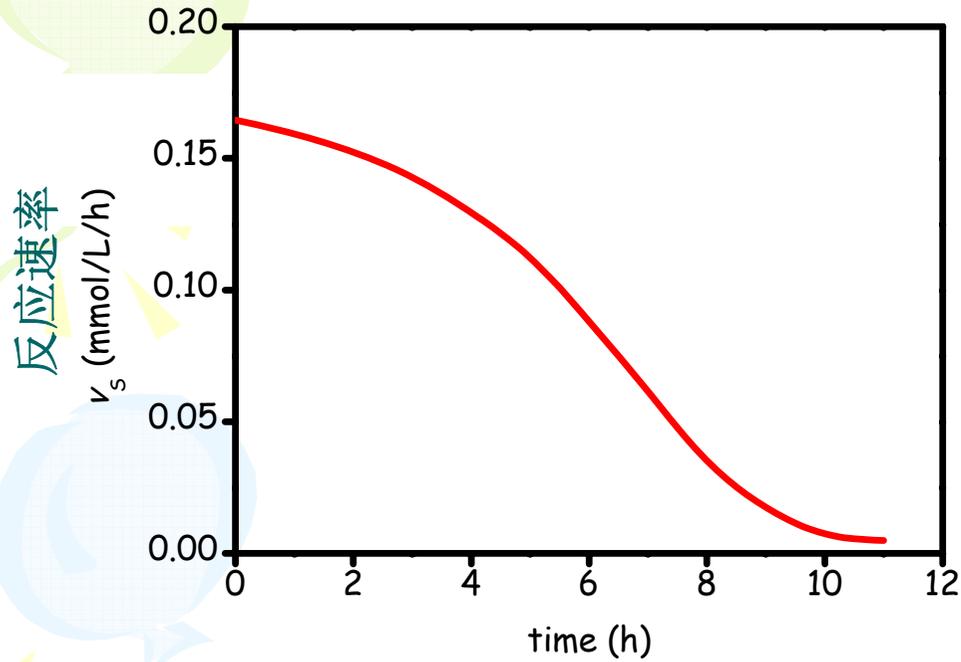
反应速率、底物浓度与时间的关系



底物浓度与反应速率的关系

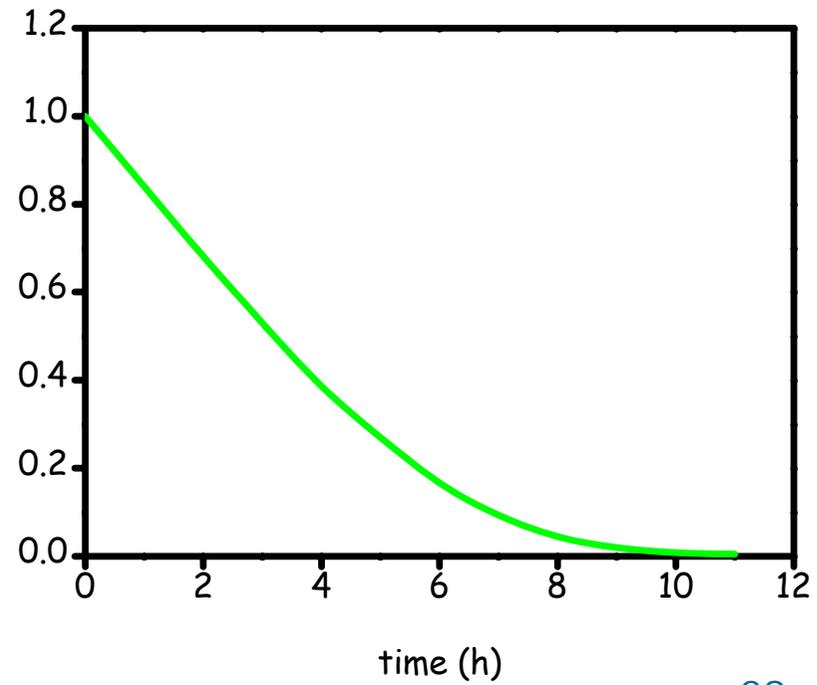


反应速率、底物浓度与时间的关系



反应时间

底物浓度



反应时间

米氏常数 K_m 的意义

- K_m 值代表反应速率达到 $V_{\max}/2$ 时的底物浓度。
- K_m 是酶的一个特性常数， K_m 的大小只与酶的性质有关，而与酶浓度无关。但底物种类、反应温度、pH 和离子强度等因素会影响 K_m 值。因此可以用 K_m 值来鉴别酶。
- K_m 值可以判断酶的专一性和天然底物。
- 当 $k_{+2} \ll k_{-1}$ 时， $K_m = K_s$ ，那么 K_m 可以作为酶和底物结合紧密程度的一个度量，表示酶和底物结合的亲合力大小。
- 若已知 K_m 值，可以计算出某一底物浓度时，其反应速率相当于 V_{\max} 的百分率。例如：当 $[S]=3 K_m$ 时，代入米氏方程后可求得 $v=0.75 V_{\max}$
- K_m 值可以帮助推断某一代谢反应的方向和途径。催化可逆反应的酶，对正逆两向底物的 K_m 值往往是不同的，例如谷氨酸脱氢酶， NAD^+ 的 K_m 值为 $2.5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ ，而 $NADH$ 为 $1.8 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 。测定这些 K_m 值的差别及正逆两向底物的浓度，可以大致推测该酶催化正逆两向反应的效率。

问题

为什么只有初始反应速率可以使用？

- a. 产物的积累使逆反应的影响不可忽略
- b. 产物可能会抑制或激活酶的活力
- c. 随着反应的进行，酶的活力可能会失活
- d. 反应体系中的一些杂质可能会影响到酶的活性
- e.

为什么说低 K_m 值意味着酶与底物的结合力强？

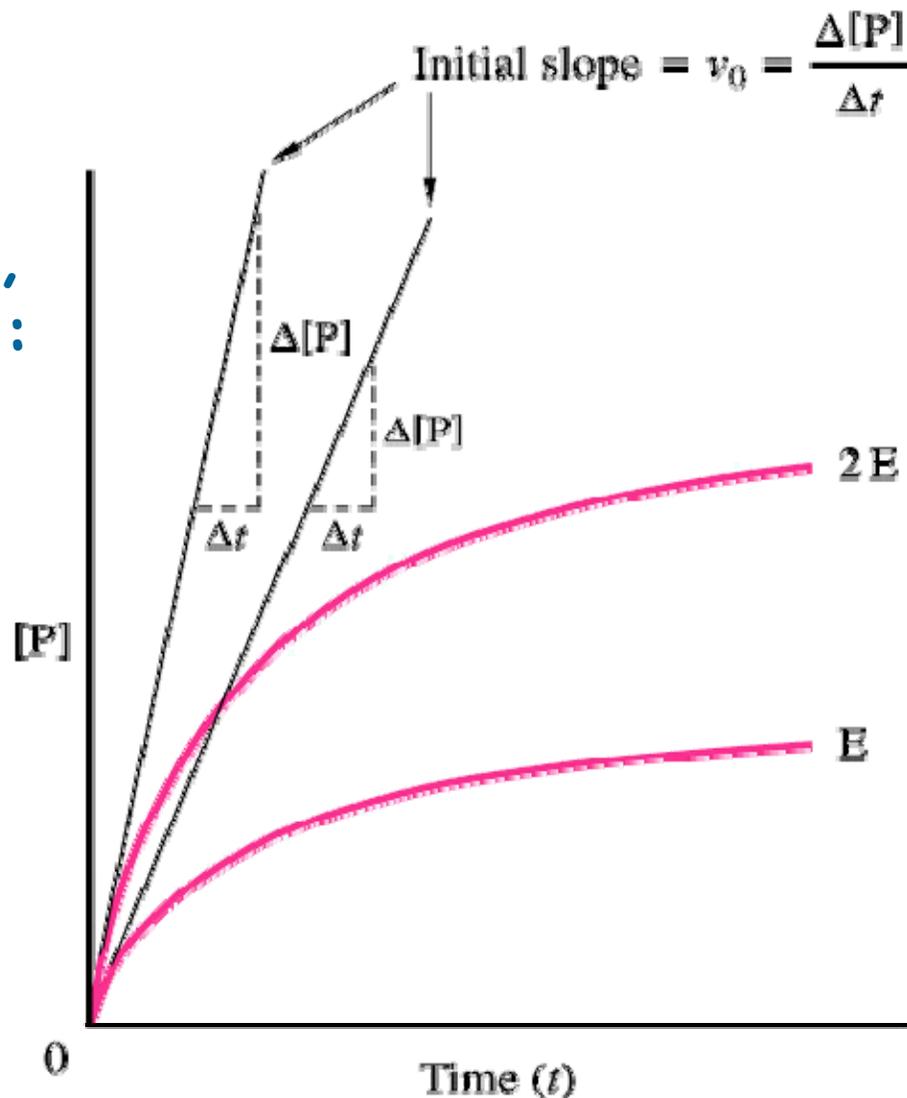
考虑一下 K_m 的定义：

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}}$$

实验测定 Michaelis-Menten 动力学参数

根据已知的 $[S_0]$ 和 $[E_0]$,
能计算出初始的反应速率:

$$v_{init} = \left. \frac{d[P]}{dt} \right|_{t=0} = - \left. \frac{d[S]}{dt} \right|_{t=0}$$





动力学参数的求解

- 作图法(通过方程变换, 将方程线性化)

- ✓ L-B法

- ✓ H-W法

- ✓ E-H法

- ✓ 积分法

- 非线性最小二乘法回归处理

- ✓ 信赖域法(Matlab的优化工具箱)

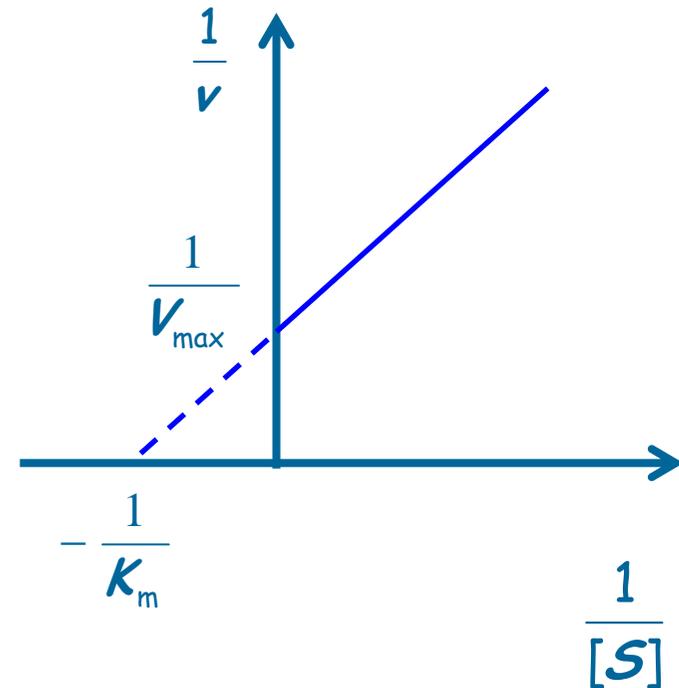
- ✓ 遗传算法(不依赖于初值, 可并行计算)

L-B双倒数法

- 将米氏方程式两侧取双倒数，得到下列方程式：

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

- 以 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图，得到一
以直线



- 缺点：实验点过分集中在直线的左下方，影响 K_m 和 V_{\max} 的准确测定。

积分法

分批酶反应体系中[S]随时间的变化过程可以用表示为:

$$v_s = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]}$$

积分得到,

$$V_m t = [S_0] - [S] + K_m \ln \frac{[S_0]}{[S]}$$

或,

$$\frac{[S_0] - [S]}{t} = V_m - K_m \cdot \frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]}$$

$$\frac{[S_0] - [S]}{t}$$

与 $\frac{1}{t} \ln \frac{[S_0]}{[S]}$ 对应作图, 得到一直线,

斜率为 $-K_m$, 截距为 V_m

实例

The data below was from an enzyme activity determination.

1. [S] 3 μ M ----- v = 10.4 μ mol/min
2. [S] 5 μ M ----- v = 14.5 μ mol/min
3. [S] 10 μ M ----- v = 22.5 μ mol/min
4. [S] 30 μ M ----- v = 33.8 μ mol/min
5. [S] 90 μ M ----- v = 40.5 μ mol/min

Question:

a). what is the value of V_{\max} and K_m ?

B). make a double reciprocal plot (Lineweaver-Burk)

1/v vs 1/[S].

抑制剂对酶促反应速率的影响

● 几个概念

✓ 失活 与 抑制

【失活】(inactivation): 由于酶蛋白分子**变性**而引起的酶活力丧失的现象称为失活。

【抑制】(inhibition): 由于酶的必需基团化学性质的改变，但酶未变性，而引起酶活力的降低或丧失，称为抑制作用

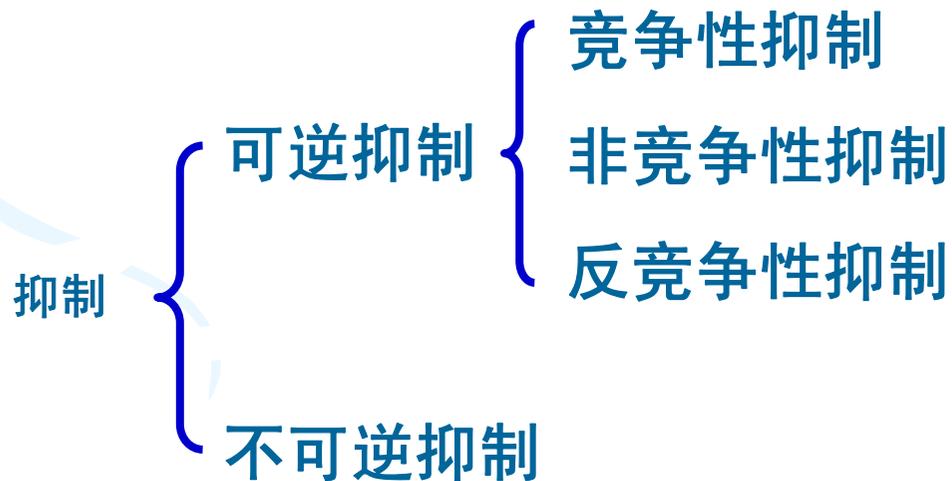
✓ 底物 与 效应物

【效应物】(Effector): 凡能使酶分子发生**别构作用**的物质叫效应物，通常为小分子代谢物或辅因子。如因别构导致酶活性降低的物质称为负效应物。

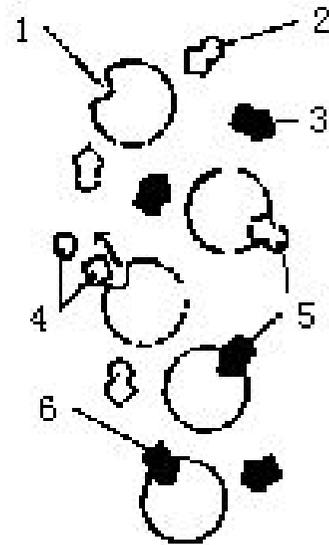


✓ **可逆抑制** 和 **不可逆抑制(如铅和汞等重金属)**

【可逆抑制】(reversible inhibition): 抑制剂与酶以**非共价键**结合而引起酶活力降低或丧失，能用物理方法除去抑制剂而使酶复性，这种抑制作用是可逆的，称为可逆抑制。



竞争性抑制：竞争性抑制剂往往和底物在结构上相似



竞争性抑制

1. 酶的活性部位
2. 底物
3. 抑制剂
4. 产物
5. 底物和抑制剂能与酶的活性部位结合
6. 抑制剂妨碍底物和酶结合

- 丙二酸 ($\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$) 抑制琥珀酸脱氢酶催化的琥珀酸 ($\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$) 脱氢作用。
- 对氨基苯甲酸逆转磺胺药物对细菌生长的抑制作用(二氢叶酸合成酶)，对氨基苯甲酸是细菌的一种维生素，细菌依赖它合成代谢所必需的叶酸。
- 许多抗代谢的抗癌药物如5-氟尿嘧啶和6-巯基嘌呤几乎都是酶的竞争性抑制剂。

非竞争性抑制： 非竞争性抑制剂和底物可能分别与酶的不同部位结合。抑制剂与酶的结合并不妨碍酶再与底物结合，但所形成：酶—底物—抑制剂复合物



非竞争性抑制

1. 酶的活性部位
2. 抑制剂与酶的结合部位
3. 抑制剂与酶的结合使酶变形
4. 底物与抑制剂能同时与酶结合
5. 无抑制剂时生成产物
6. 抑制剂的存在使产物生成的作用减慢



反竞争性抑制： 反竞争性抑制剂只结合到ES复合物。



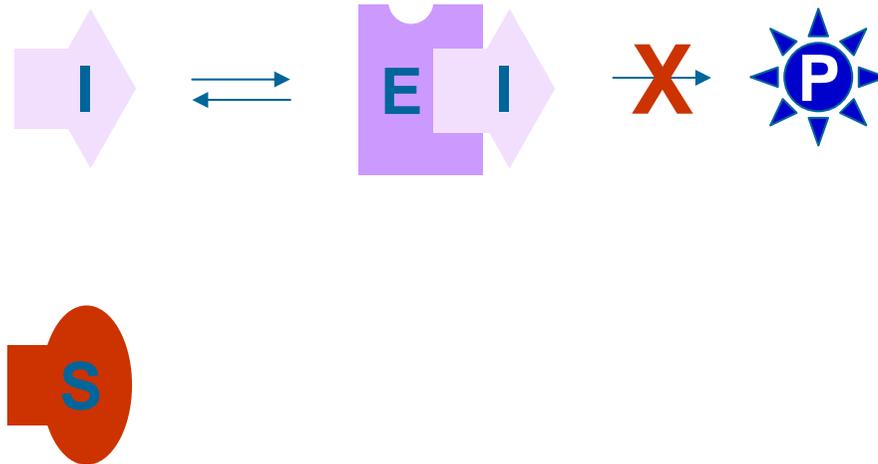
酶—底物—抑制剂复合物

这种抑制剂仅能与**ES复合物**结合，而与**游离酶**不能直接结合

竞争性抑制(competitive inhibitions)



+
I



抑制剂是底物的类似物

利用快速平衡假说:

$$K'_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

和酶的浓度方程,

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI]$$

产物速率方程,

$$v_p = k_2[ES]$$

综合以上方程,消除[ES]得到:

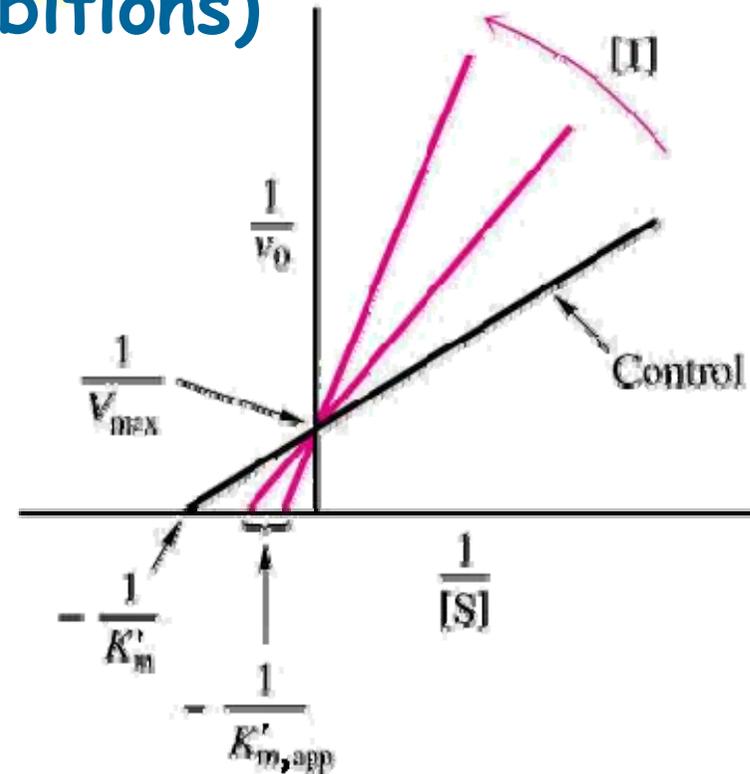
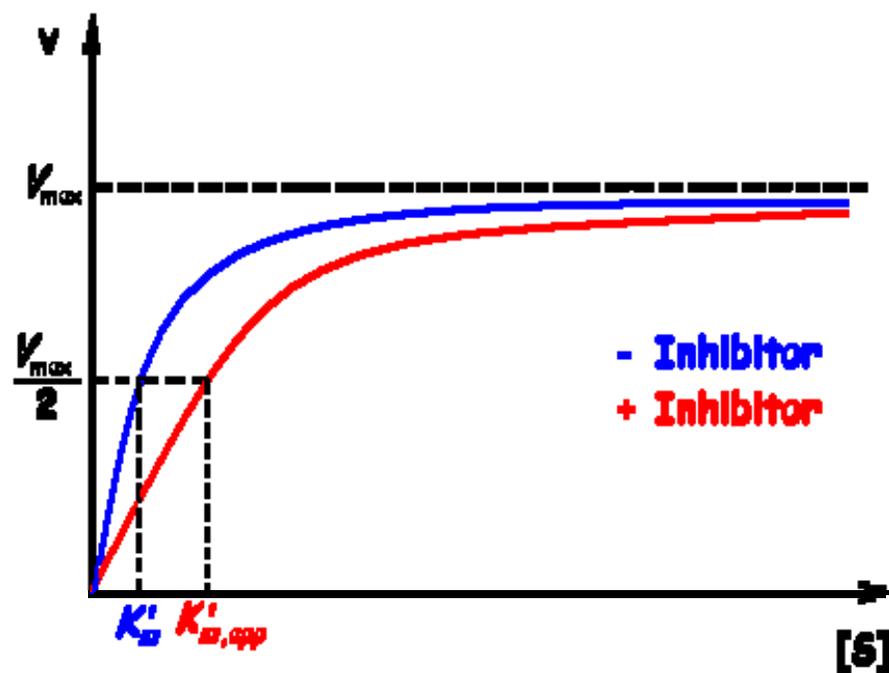
$$v_p = \frac{V_m[S]}{K'_{m,app} + [S]}$$

where

$$V_{p,m} = k_2[E_0] \text{ and}$$

$$K'_{m,app} = K'_m \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right).$$

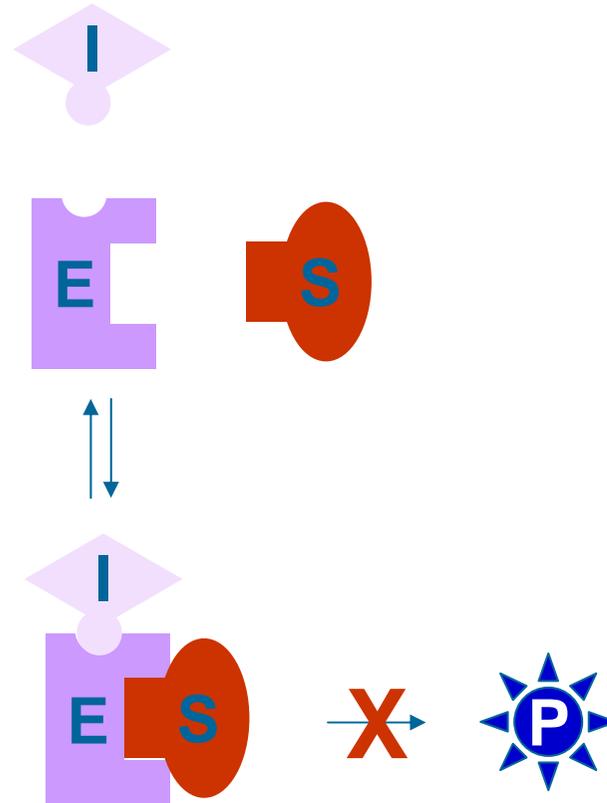
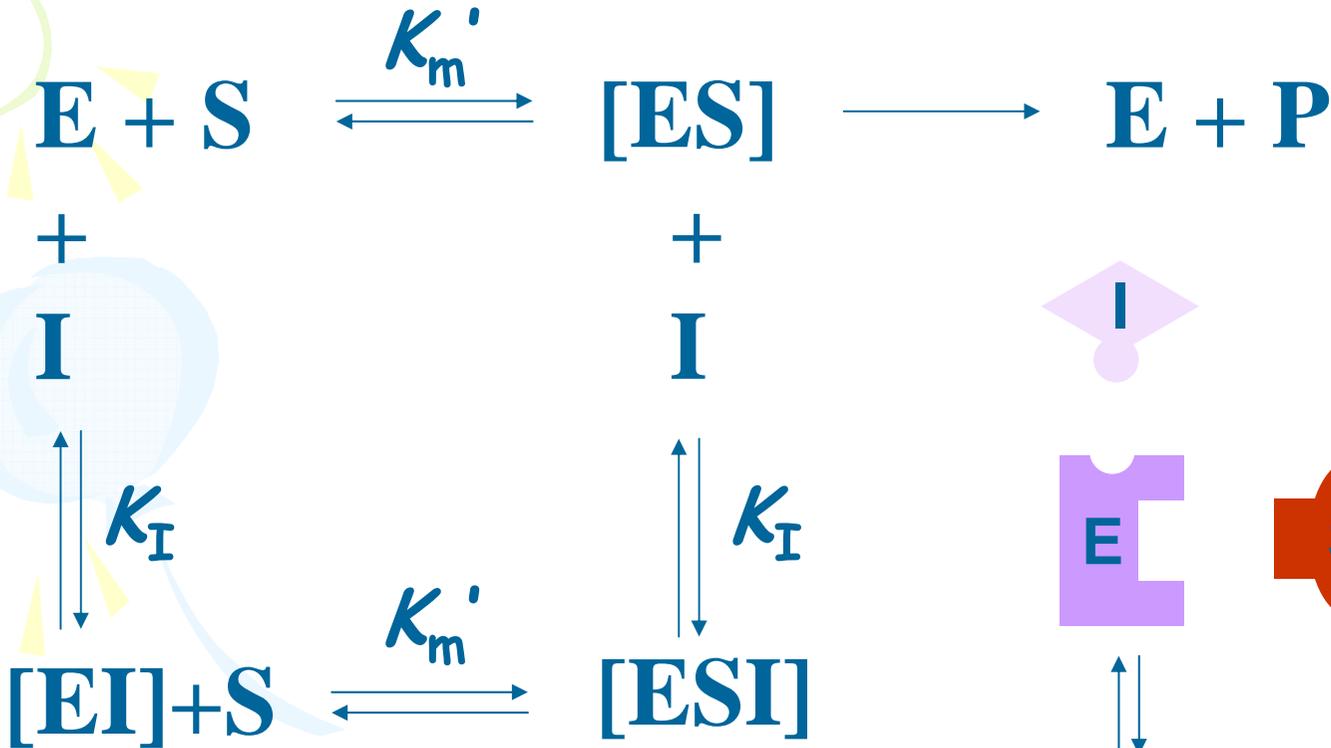
竞争性抑制(competitive inhibitions)



The net effect of competitive inhibitions is an **increased** value of $K'_{m,app}$ with **reduced** reaction rate, but **same** maximum reaction rate.

Furthermore, the competitive inhibition **can be overcome** by **high substrate concentration**.

非竞争性抑制(Non-competitive Inhibitions)



这种抑制剂能结合于酶的非活性中心，但能降低酶与底物的亲和力。

With similar equations and derivations as before,

$$K'_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

$$v_p = k_2[ES]$$

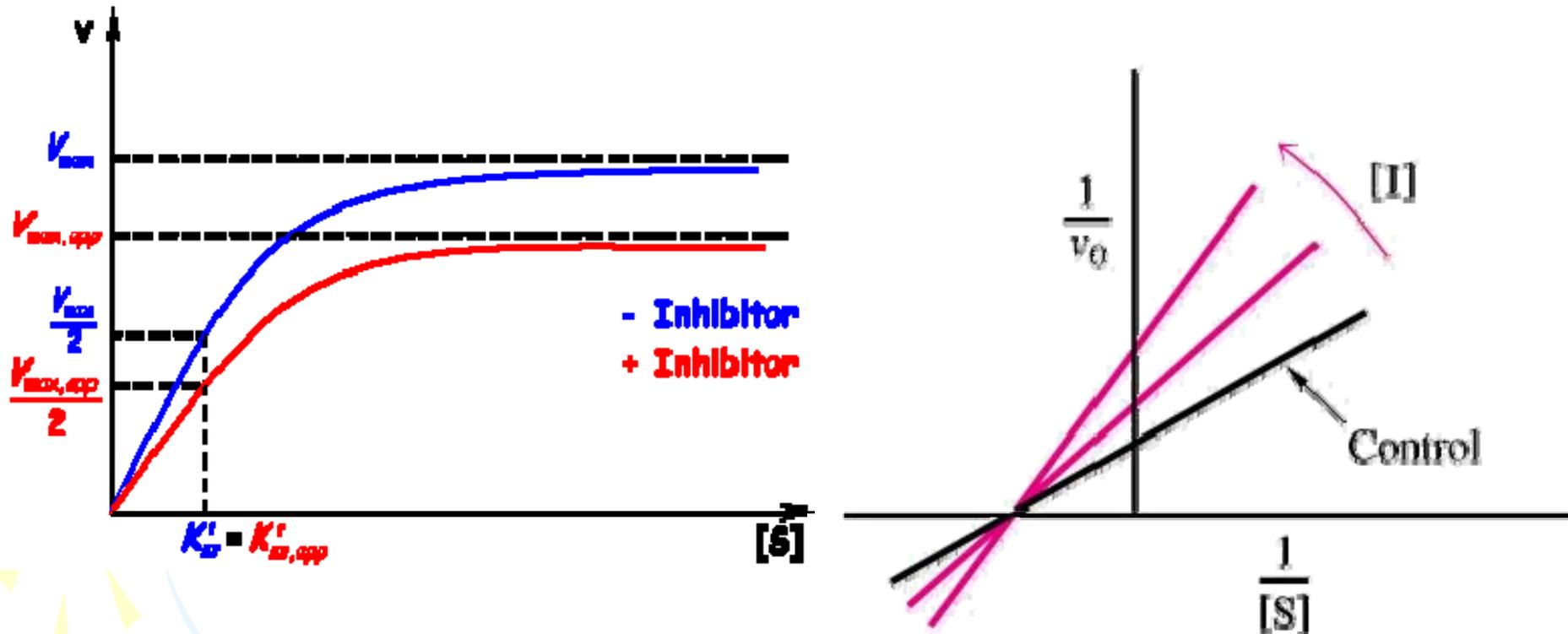
we can get,

$$v_p = \frac{V_{p,m}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)(K'_m + [S])}$$

Where

$$v_{p,m,app} = \frac{V_{p,m}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

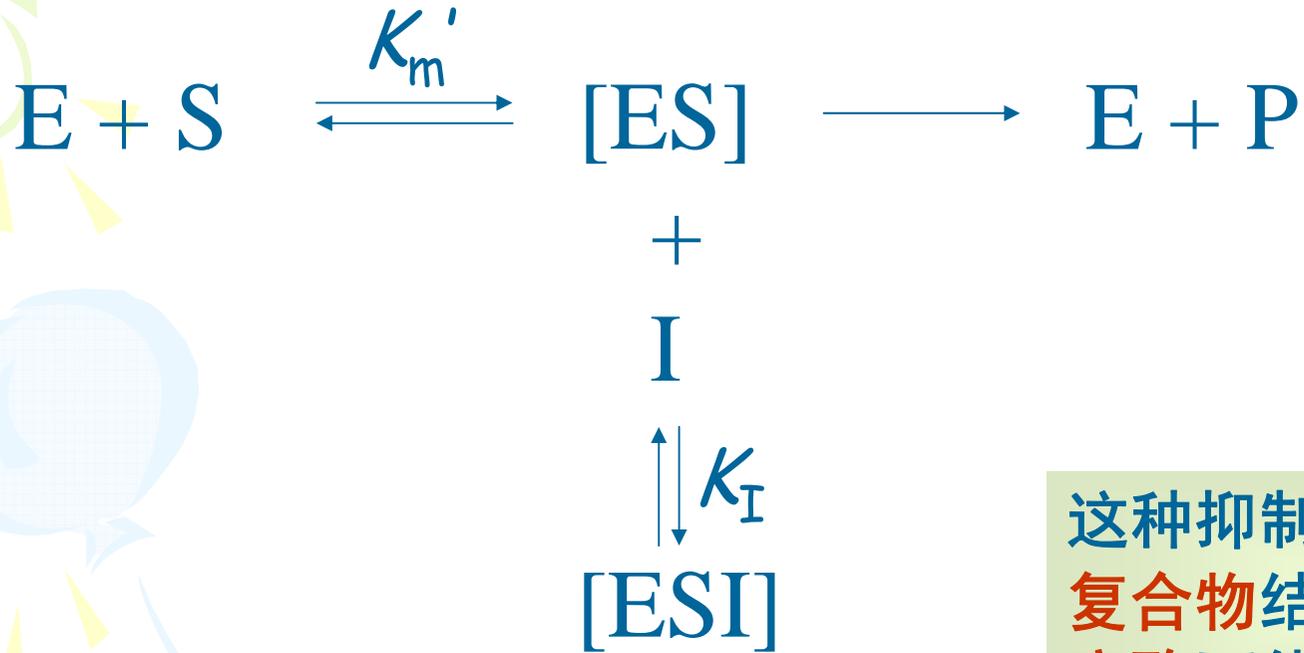
Plots on Non-competitive Inhibitions



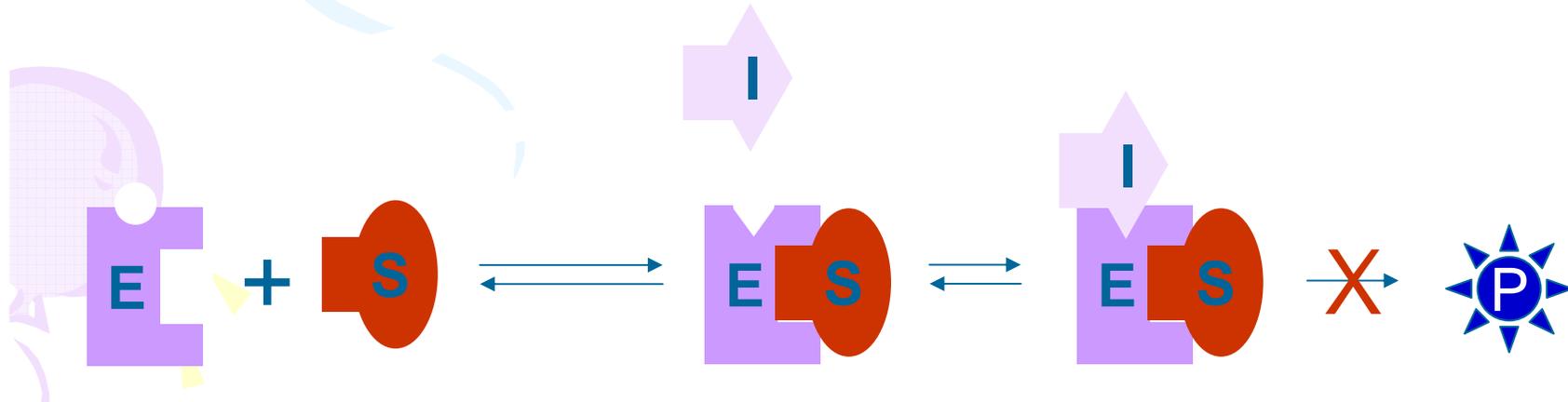
The net effect of non-competitive inhibitions is a **reduction** in $V_{m,app}$ with **same** Michaelis-Menten constant.

High substrate concentration **would not** overcome non-competitive inhibitions. **Other reagents** need to be added to block binding of it to the enzyme.

反竞争性抑制(Uncompetitive Inhibitions)



这种抑制剂仅能与ES复合物结合，而与游离酶不能直接结合。



With similar equations and derivatives as before,

$$K'_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [EI]$$

$$v = k_2[ES]$$

we can get,

$$v = \frac{V_{m,app} [S]}{K'_{m,app} + [S]}$$

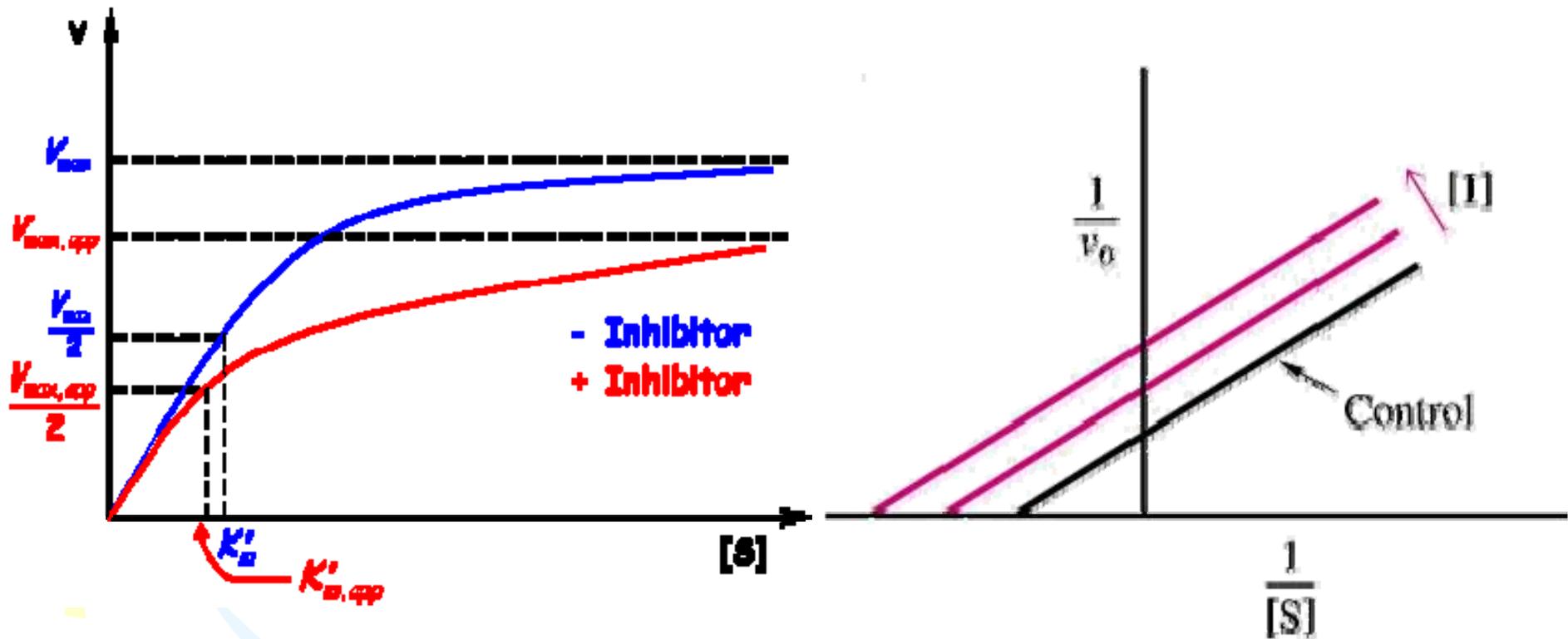
where

$$V_{m,app} = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

and

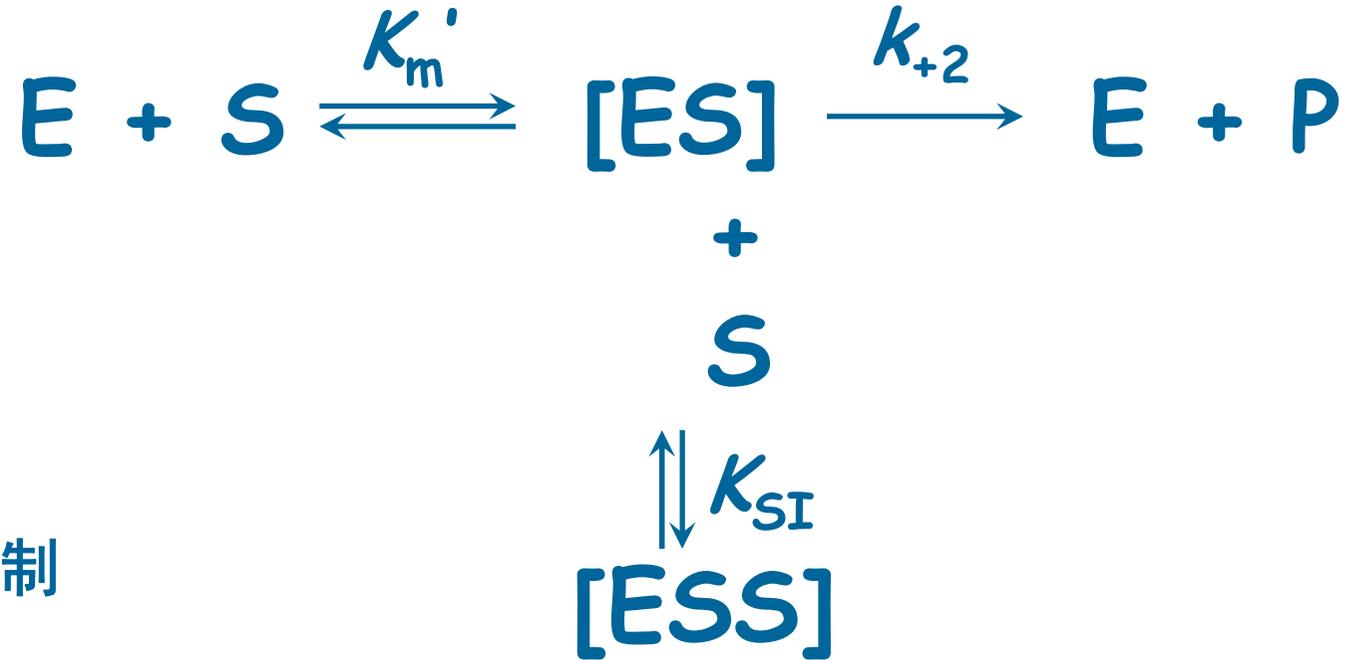
$$K'_{m,app} = \frac{K'_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}$$

Plots on Uncompetitive Inhibitions

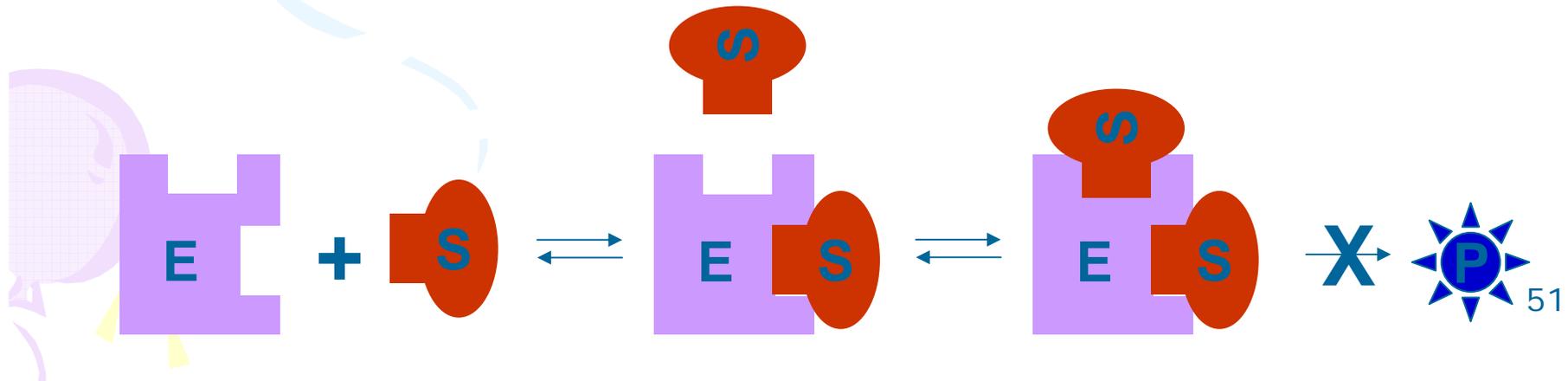


Obviously, the net effect of uncompetitive inhibitions is a reduction in both $K'_{m,app}$ and $V_{m,app}$, and the net result is a reduction in reaction rate.

底物抑制(Substrate Inhibitions)



高浓度的底物会抑制一些酶促反应。



With similar equations and derivations as before,

$$K'_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad K_{SI} = \frac{[ES][S]}{[ESS]}$$

变换方程得:

$$[E] = \frac{K'_m [ES]}{[S]} \quad [ESS] = \frac{[ES][S]}{K_{SI}}$$

$$[E_0] = [E] + [ES] + [ESS]$$

$$[ES] = \frac{[E_0]}{1 + \frac{K'_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_{SI}}}$$

$$v = k_{+2} [ES]$$

$$V_{\max} = k_{+2} [E_0] \quad k_{+2} = V_{\max} / [E_0]$$

Then,
we can get,

$$v = \frac{V_m}{\frac{K'_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_{SI}}}$$
$$= \frac{V_m [S]}{K'_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_{SI}}}$$

Discussions about Substrate Inhibitions

- Low substrate concentration

Namely $\frac{[S]}{K_{SI}} \ll 1$, then $v = \frac{V_m}{1 + \frac{K'_m}{[S]}} = \frac{V_m[S]}{[S] + K'_m}$ or $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K'_m}{V_m} \frac{1}{[S]}$

The origin Michaelis-Menten equation obtained, thus no inhibition observed.

- High substrate concentration

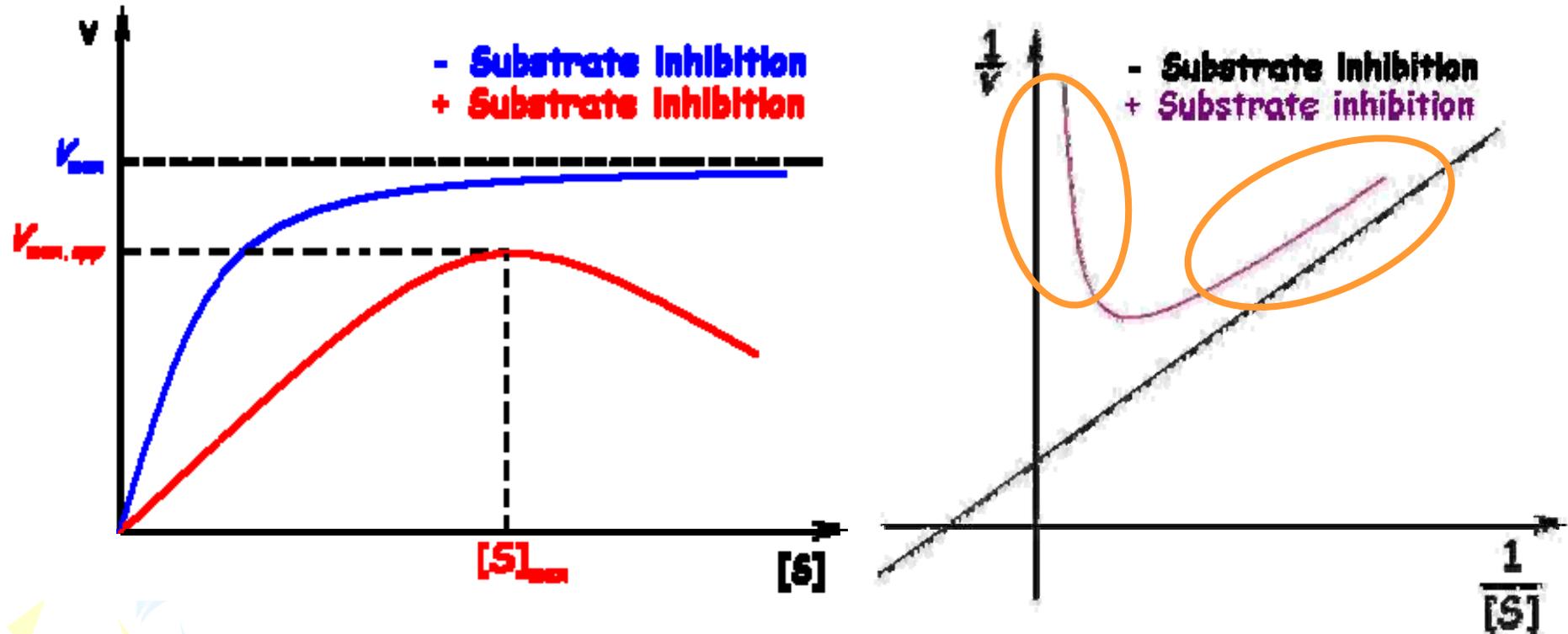
Namely $\frac{K'_m}{[S]} \ll 1$, then $v = \frac{V_m}{1 + \frac{[S]}{K_{SI}}}$ or $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{[S]}{V_m K_{SI}}$

The inhibition effect is dominant.

- The substrate concentration at which the maximum reaction rate achieves can be obtained by setting $\frac{dv}{d[S]} = 0$, and we can get,

when $[S]_{\max} = \sqrt{K'_m K_{SI}}$, $v_{\max, app} = \frac{V_m}{2 \sqrt{\frac{K'_m}{K_{SI}} + 1}}$.

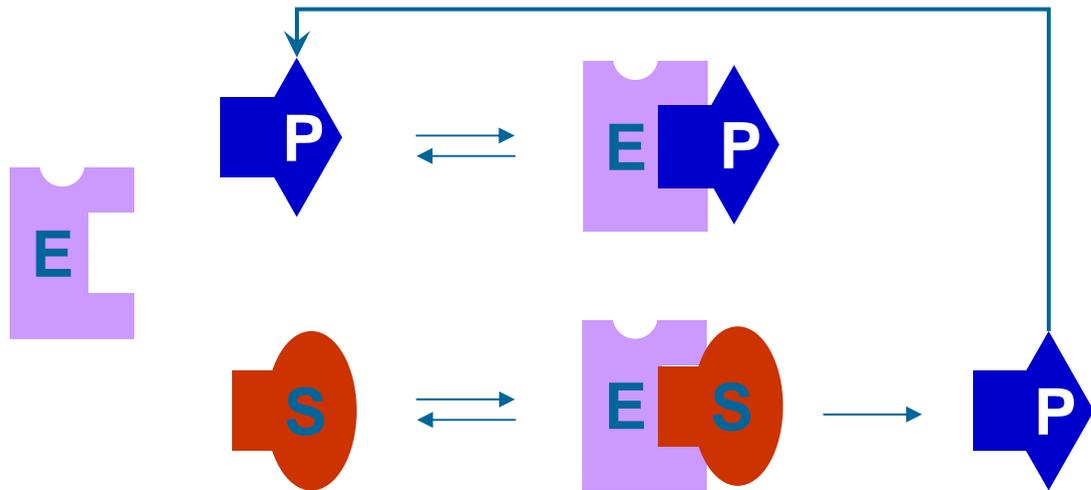
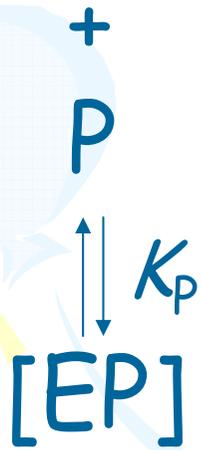
Plots on Substrate Inhibitions



At low substrate concentration, the rate expression approximates to the Michaelis-Menten equation, then the curve in double-reciprocal plot is **parallel** with the linear line denoted the instance without substrate inhibition.

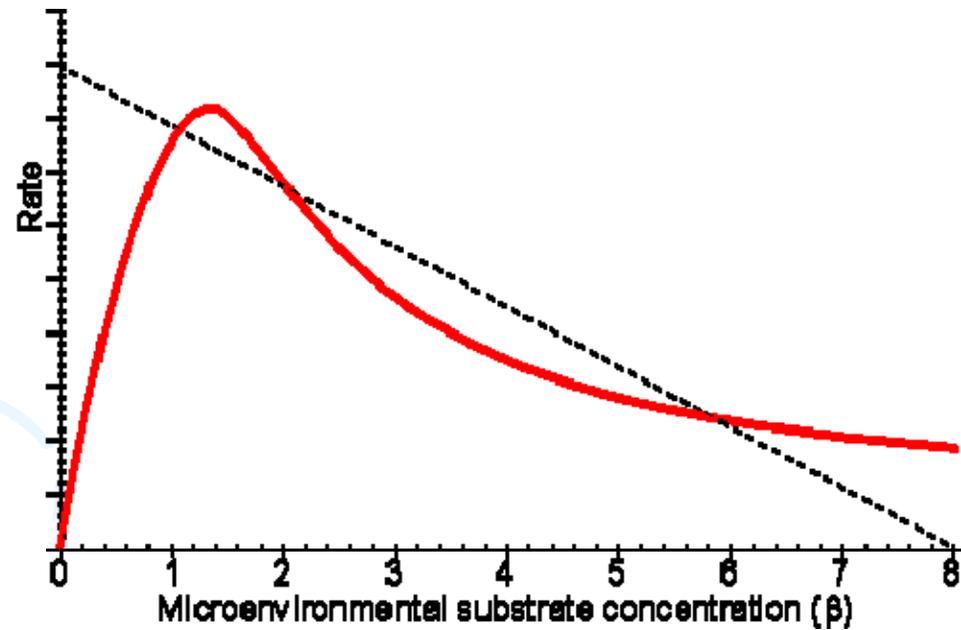
Similarly, at high substrate concentration, the curve in double-reciprocal plot is in **hyperbolic** mode.

产物抑制 (product inhibitions)



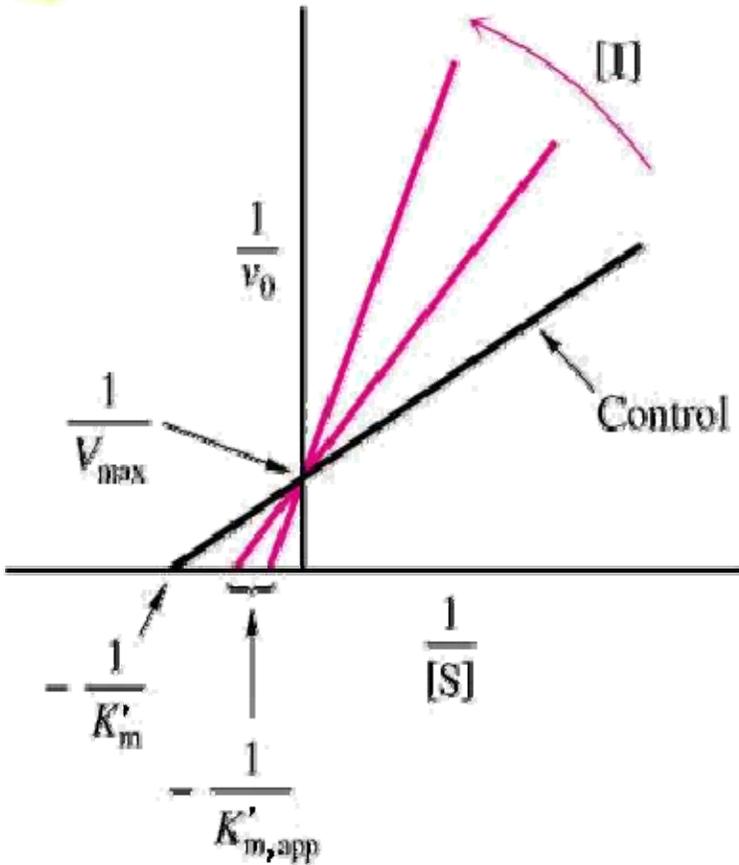
With similar equations and derivations as before,

$$v = \frac{V_m[S]}{K'_m \left(1 + \frac{[P]}{K_p}\right) + [S]}$$

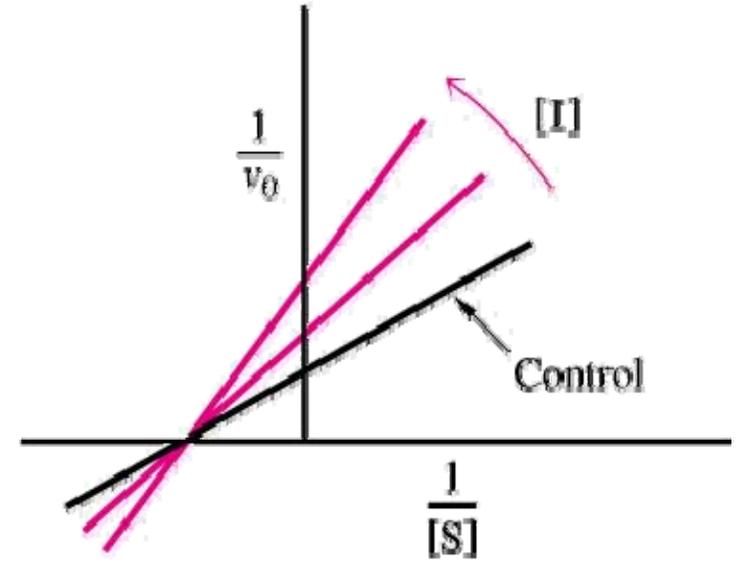


各种抑制的比较

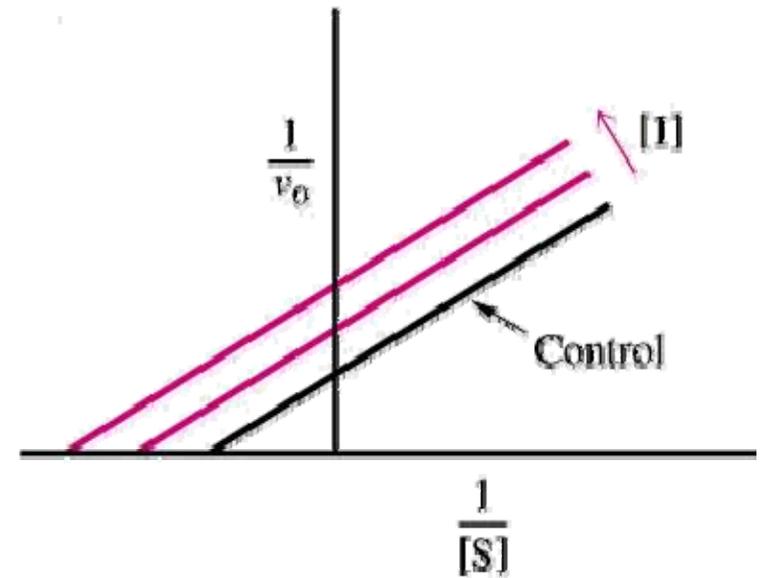
- 参见 戚以政, 《生物反应工程》, 第19页, 表2-3和图2-11。



竞争性抑制



非竞争性抑制



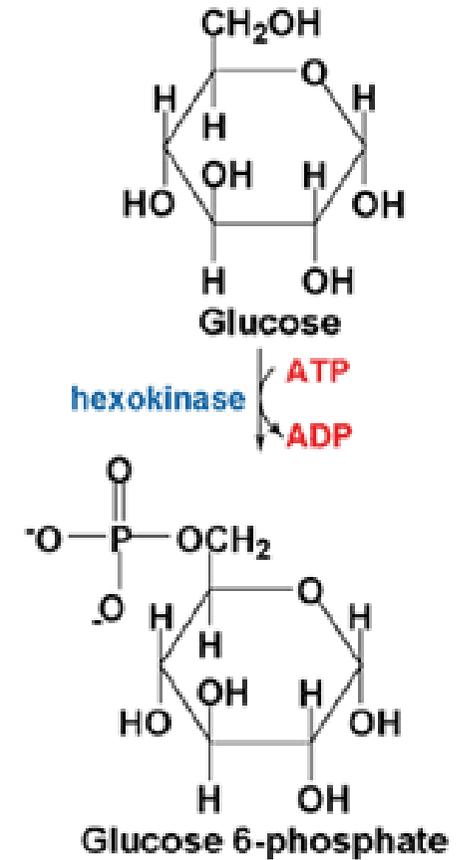
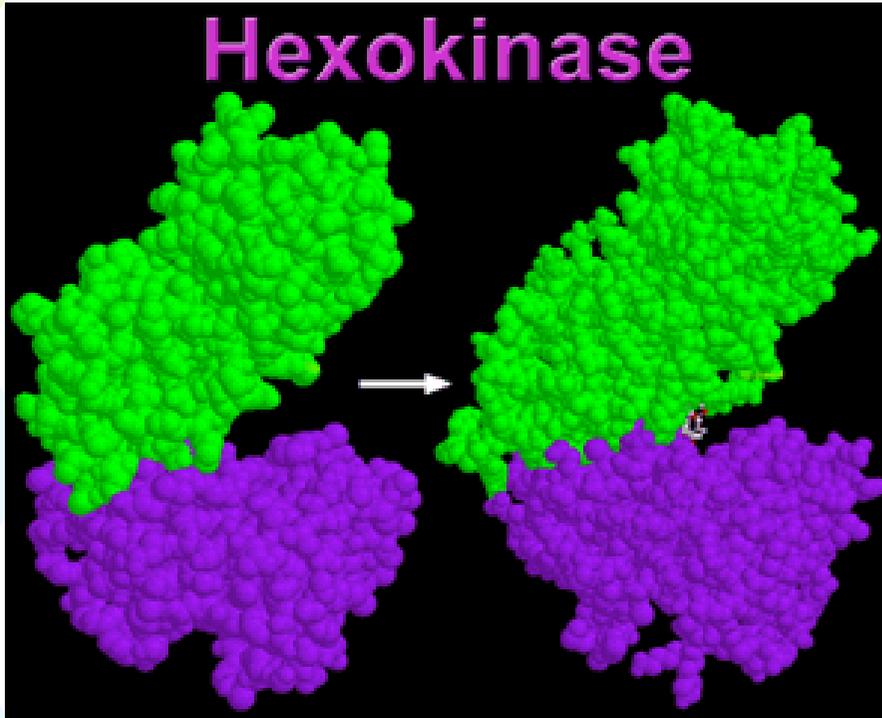
反竞争性抑制



别构酶 (Allosteric Enzyme)

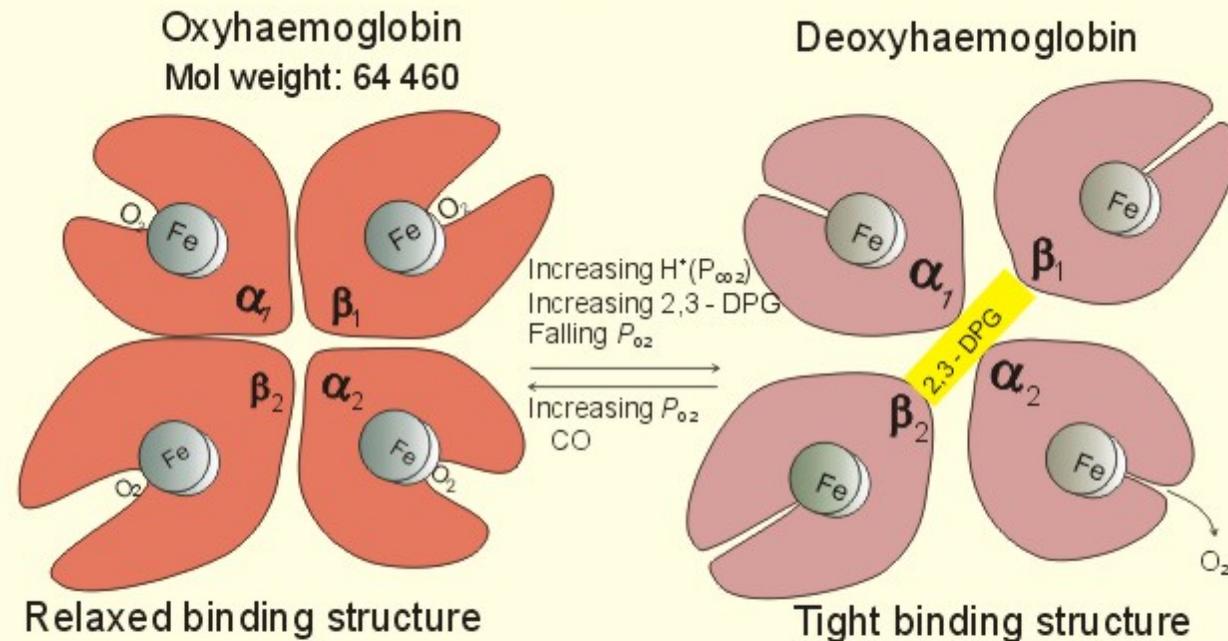
- 别构酶又称变构酶，调节酶，它是一种寡聚酶(由多个亚基组成)。这类酶具有别构部位和活性部位。
- 当底物分子与别构酶结合时，能诱导酶的结构改变，增加酶与底物的结合能力，表现出底物对酶的激活效应。
- 如：己糖激酶、血红蛋白(参见王镜岩，《生物化学》第三版，第**259-266**页)。

己糖激酶



Hexokinase: Left: without glucose (shown the Glc binding pocket) ; Right: with glucose

Oxygen Binding and Unloading



Normal oxygen binding capacity (20 kPa): 1.34 ml STPD g^{-1} (theoretical: 1.39)

One mol of gas has a STPD volume of 22.4 l. Thus, 1 g of haemoglobin in theory binds: $(1/64\ 460) * 4 * 22\ 400\ \text{ml STPD } g^{-1}) = 1.39\ \text{ml } O_2\ g^{-1}$.

Arterialized blood contains: $1.34 * 149\ (g\ l^{-1}) = 200\ \text{ml } O_2\ \text{STPD } l^{-1}$.

Fig. 8-3

KMc

血红蛋白

➤ Allosteric Enzyme

The rate expression:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_m[S]^n}{K_m'' + [S]^n}$$

Hill 方程

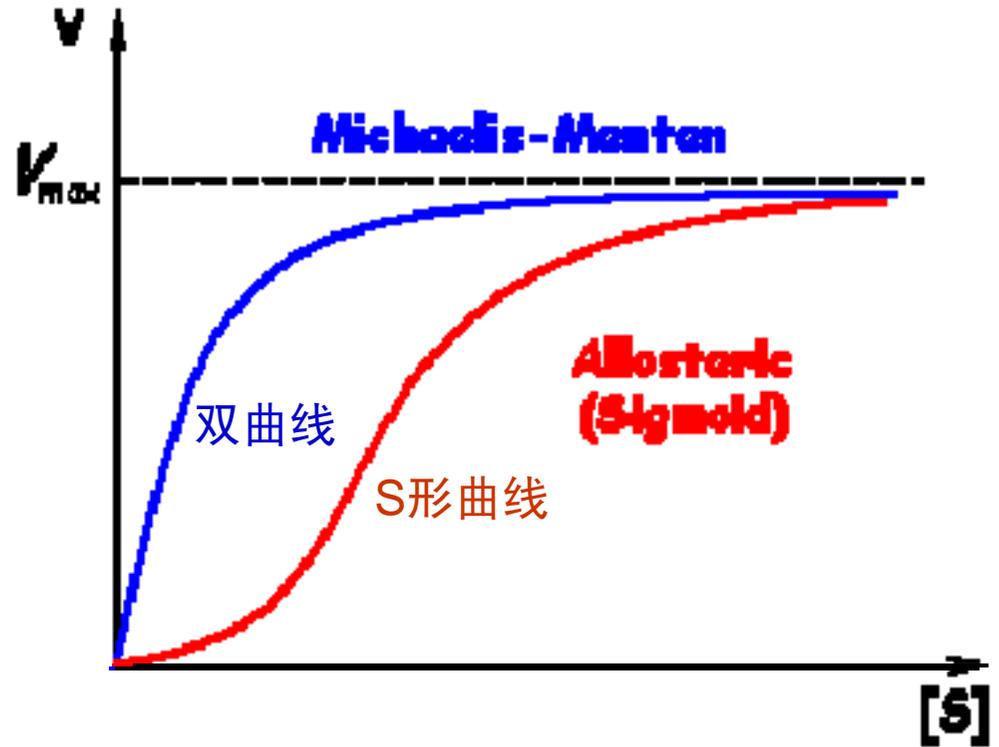
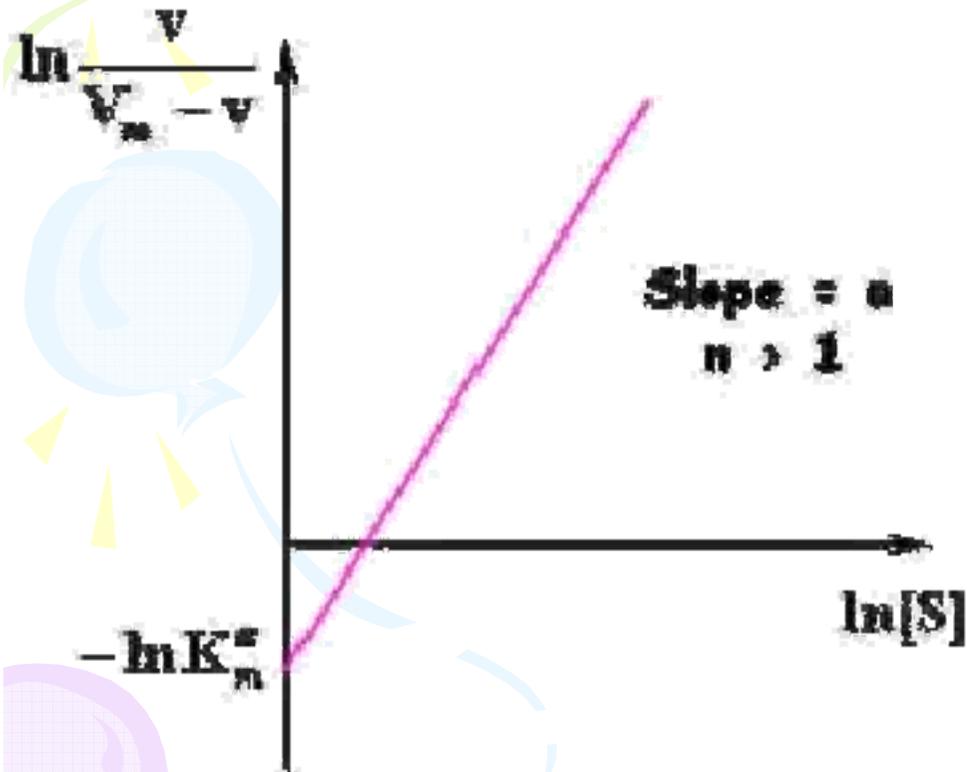
where n is the **cooperativity coefficient**(协同系数), and $n > 1$ indicates positive cooperativity. (1-3.2)

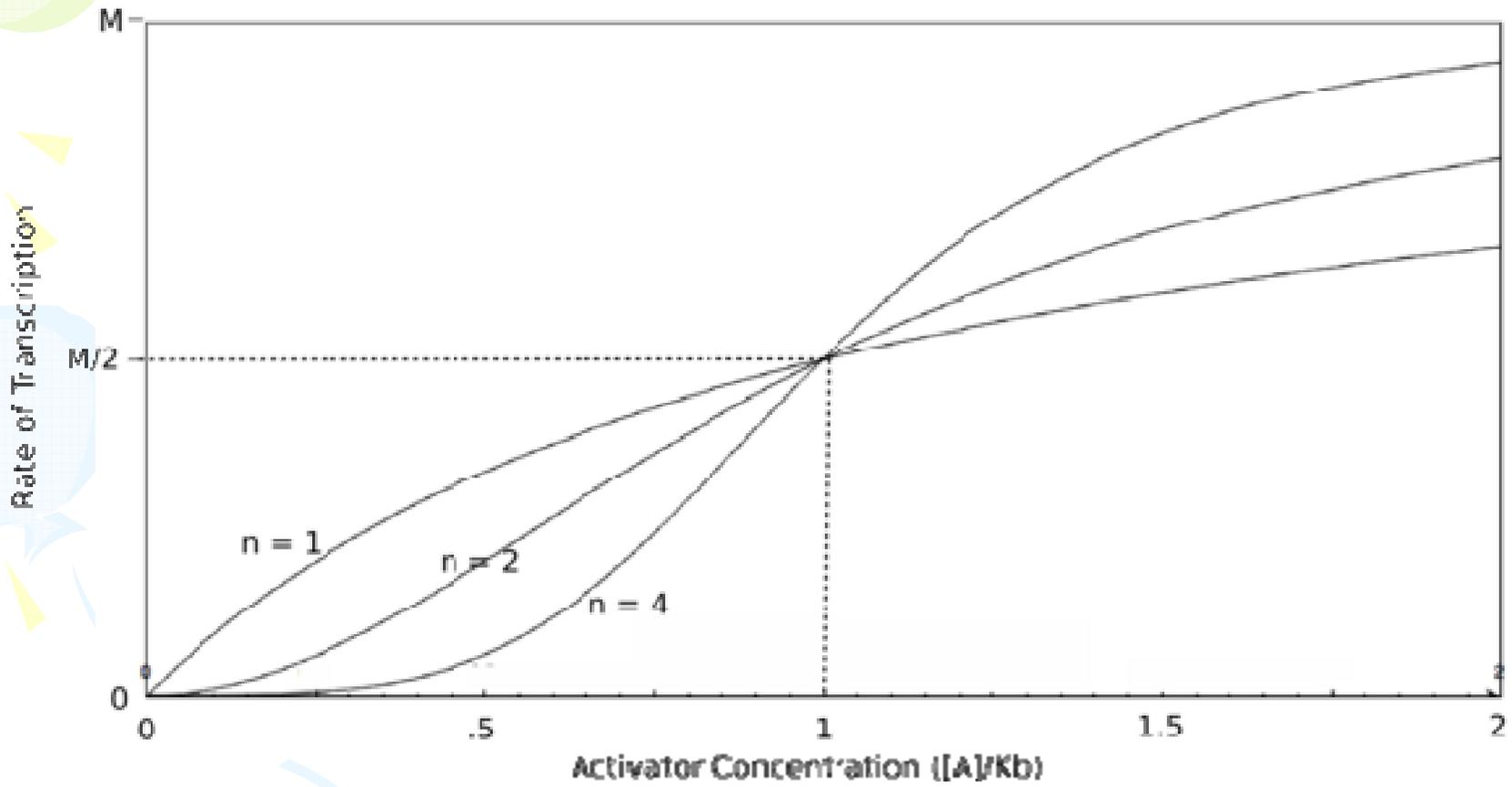
By rearranging, we have,

$$\ln \frac{v}{V_m - v} = n \cdot \ln[S] - \ln K_m''$$

实例： 血红蛋白 2.53

Plots on Allosteric Enzymes





影响酶催化反应速率的因素

影响酶催化反应速率的因素有很多，它们会影响到酶的结构或化学状态。

pH

温度

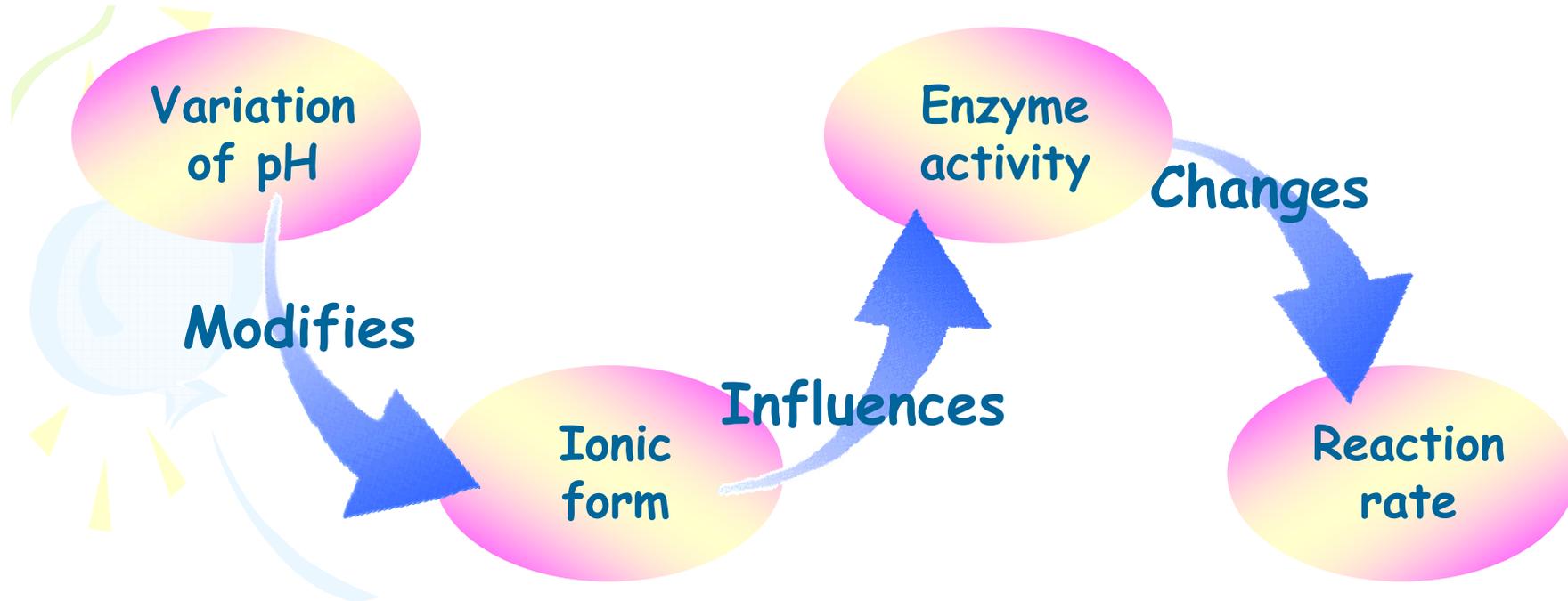
表面张力

化学试剂(醇, 脲和过氧化物)

辐射(光, 微波, 离子化, γ 射线等)

pH对酶促反应的影响

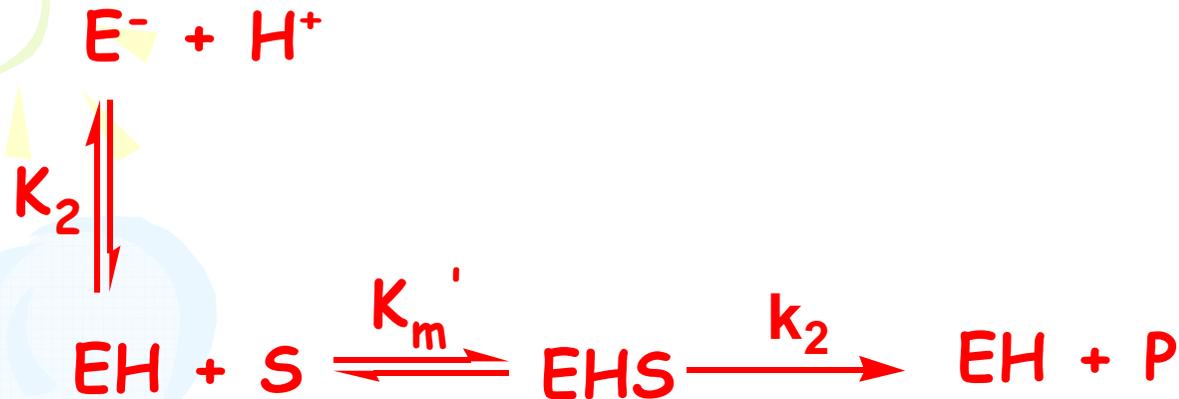
I. 一些酶的活性中心存在离子基团，因此



II. 另一方面，底物分子中包含离子基团，反应体系的pH也有可能影响到底物与酶结合的亲合力。

For CASE I (Ionic Enzyme):

The reaction scheme is as follow:



Where the meanings of the denotations are:

- EH: active form
- E^- , EH_2^+ : inactive form
- E^- : deprotonation form
- EH_2^+ : protonation form

With similar analysis and derivations as before,

$$K'_m = \frac{[EH][S]}{[EHS]} \quad K_1 = \frac{[EH][H^+]}{[EH_2^+]} \quad K_2 = \frac{[E^-][H^+]}{[EH]}$$

$$[E_0] = [E^-] + [EH] + [EH_2^+] + [EHS]$$

$$v = k_2[EHS]$$

we can get,

$$v = \frac{V_m[S]}{K'_{m,app} + [S]}$$

where

$$K'_{m,app} = K'_m \left(1 + \frac{K_2}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_1} \right)$$



为什么酶反应的最佳pH会是在pK1和pK2之间？

考虑到酶发挥最佳的活力状态是EH，最佳pH应该是唯一的，而在最佳pH时，EH的浓度应该达到最大。

因此，我们现在只要考察酶与质子H⁺的相互作用。



根据解离常数的定义和酶的质量守恒可得：

$$K_1 = \frac{[EH][H^+]}{[EH_2^+]} \quad K_2 = \frac{[E^-][H^+]}{[EH]}$$

$$[E_0] = [E^-] + [EH] + [EH_2^+]$$

消除 $[E^-]$ 和 $[EH_2^+]$ 项, 可得到:

$$\frac{[EH]}{[E_0]} = \frac{1}{\frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]} + 1}$$

令 $\frac{d([EH]/[E_0])}{d[H^+]} = 0$ 得到,

$$[H^+]_{\text{opt}} = \sqrt{K_1 K_2}$$

即,

$$pH_{\text{opt}} = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2)$$

For CASE II (Ionic Substrate)

The reaction scheme is as follow:



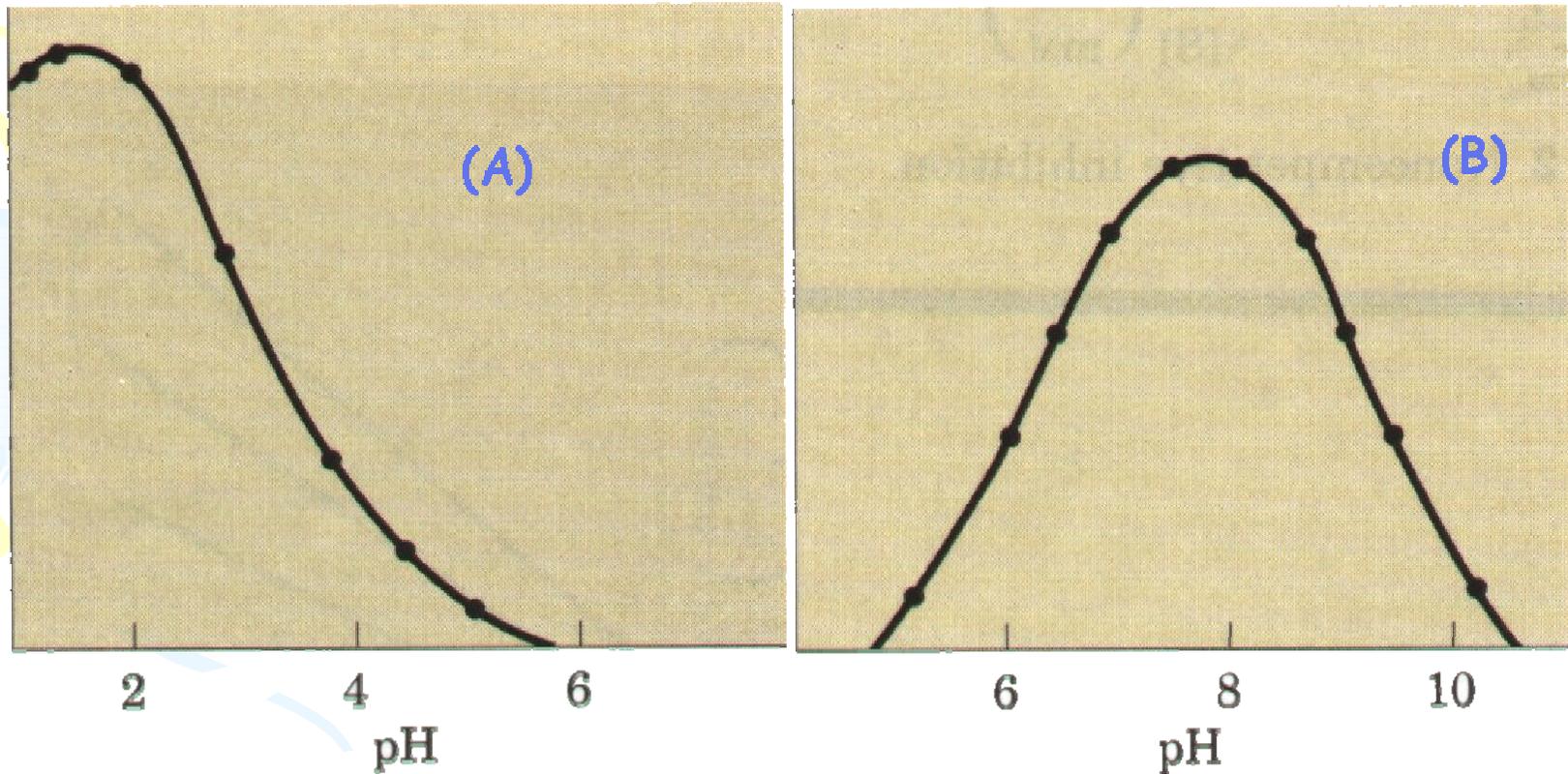
Similarly, we can get,

$$v = \frac{V_m [S]}{K'_{m,app} + [S]}$$

where

$$K'_{m,app} = \frac{K'_m K_1}{[H^+]}$$

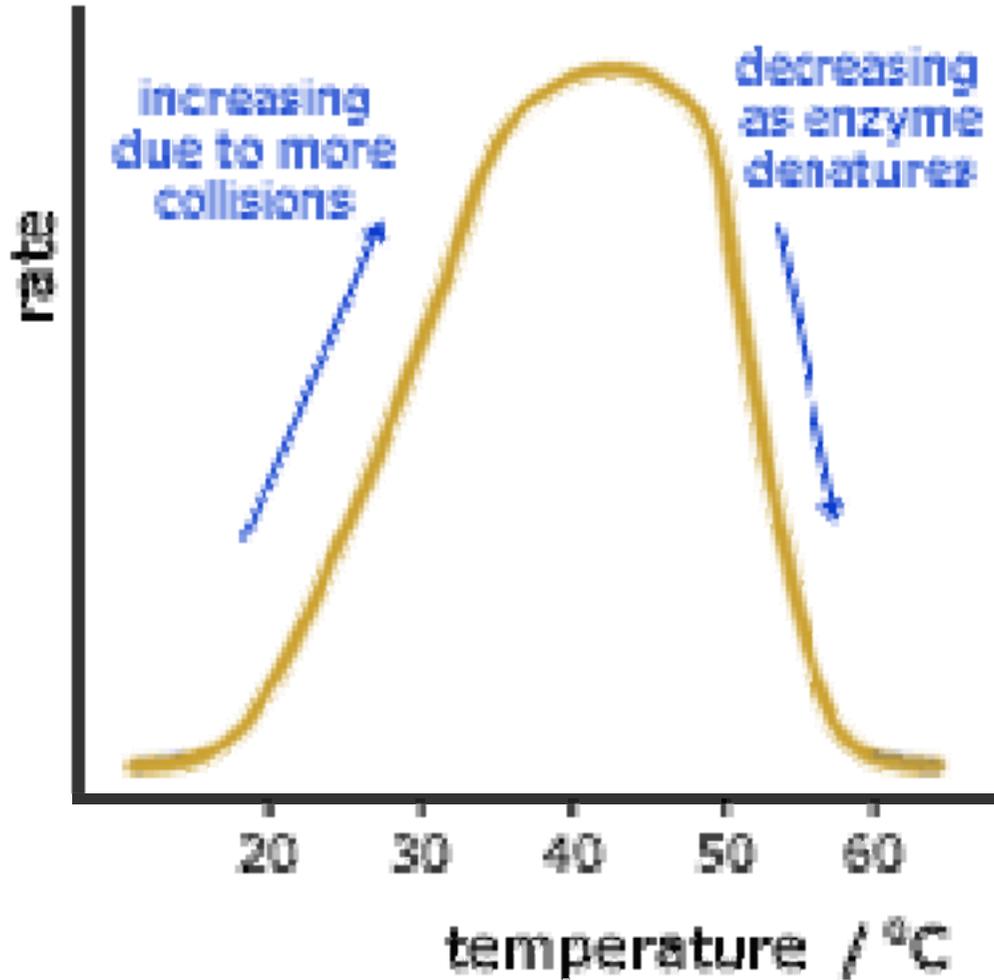
一般来说中，酶促反应的最佳pH还是很难预测的，通常需要通过**实验**来确定。



pH-activity profiles of two enzymes.

(A)胃蛋白酶; **(B)** 延胡索酸酶(以苹果酸为底物时)

温度对酶促反应的影响



在较低的温度范围内，酶催化反应速率会随着温度的升高而加快，超过某一温度，即酶被加热到**生理允许温度**以上时，酶的反应速率反而随着温度的升高而下降。

这是由于温度升高，虽然可加速酶的催化反应速率，同时也加快了酶的热失活速率。

1. 温度激活作用 (上升区).

酶催化反应速率常数中的 k_2 与温度的关系符合Arrhenius方程:

$$v = k_2[E]$$

$$k_2 = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

$$\therefore v = A \cdot e^{-E_a/RT} \cdot [E]$$

即,

$$\ln v = \ln A + \ln[E] - \frac{E_a}{RT}$$

式中 $[E]$ 活性酶的浓度;

E_a 是反应活化能 (kcal/mol).

R 是气体常数

T 是绝对温度, A 是前因子

2. 热失活作用 (下降区).

(酶的热变性作用)

酶的热变性失活符合一级反应动力学方程:

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_d[E]$$

积分得到, $[E] = [E_0] \cdot e^{-k_d t}$

式中 $[E_0]$ 酶的初始浓度; k_d 变性常数.

此外, $k_d = A_d \cdot e^{-E_d/RT}$

式中 E_d is the denaturation energy (kcal/mol).

$$\therefore v = A e^{-E_a/RT} [E] = A [E_0] e^{-E_a/RT} \cdot e^{-k_d t}$$

例2-1: 将底物和酶加入到分批式反应器中,底物初始浓度为 2mmol/L ,经反应,转化率为 90% ,求反应所需的时间和 t . 已知反应速率方程为:

$$-v_s = \frac{[S]}{1 + [S]}$$

解: 在分批式反应器中

$$\therefore -v_s = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{[S]}{1 + [S]}$$

即:

$$\int_0^t dt = -\int_{S_0}^S \frac{1 + [S]}{[S]} d[S]$$

积分得到:

$$t = \ln \frac{[S_0]}{[S]} + ([S_0] - [S])$$

转化率为 90% , 即 $([S_0] - [S])/[S_0] = 0.9$, $[S] = 0.2$

$$t = \ln \frac{2}{0.2} + (2 - 0.2) = 4.1 \text{ min}$$

变换方程可以得到以下两式:

$$[ES] = \frac{[E_0]}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_{SI}}}, \quad [ESS] = \frac{[ES][S]}{K_{SI}} = \frac{\frac{[E_0][S]}{K_{SI}}}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_{SI}}}$$

$$\therefore \frac{dP}{dt} = k_{+2}[ES] + k_{+2}[ESS]$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_{+2}[E_0]}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_{SI}}} + \frac{k_{+2}[E_0]}{\frac{K_m K_{SI}}{[S]^2} + \frac{K_{SI}}{[S]} + 1}$$

当反应速率达到最大时,
所有的酶都以复合物的形式存在,
则 $[E_0] = [ES] + [ESS]$,
 $V_{\max} = k_{+2}([ES] + [ESS]) = k_{+2}[E_0]$

$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{V_{\max} \left(1 + \frac{S}{K_{SI}}\right)}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_{SI}}}$$

例2-3: 某酶催化反应, 其 $K_m=0.01 \text{ mol/L}$, 现测得该反应进行到10 min时, 底物浓度为 3.4×10^{-5} , 已知 $[S_0]=3.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. 假定该反应可用M-M方程表示。试求:

(1) 最大反应速率是多少?

(2) 反应20min后, 底物浓度为多少?

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

及题中条件知 $[S_0] \ll K_m$

则米氏方程可表示为

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m} \Rightarrow V_{\max} t = K_m \ln \frac{[S_0]}{[S]}$$

10 min时, $[S]=3.4 \times 10^{-5}$, 代入上式可得:

$$V_{\max} = (0.01 \times \ln 10) / 10 = 0.0023 \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

当 $t=20 \text{ min}$, $\ln[S] = \ln[S_0] - V_{\max} t / K_m$

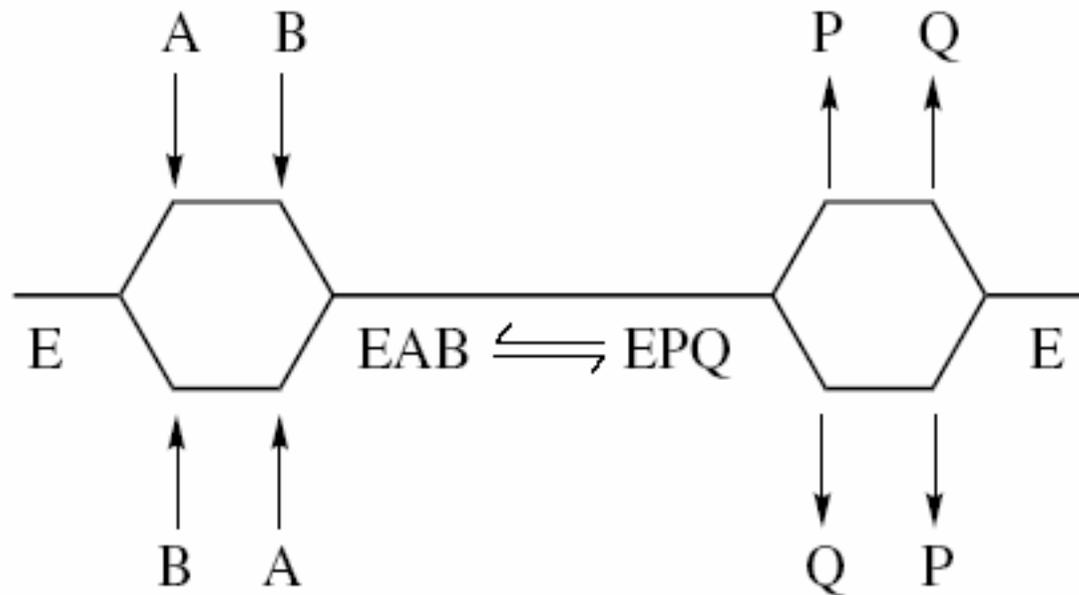
$$= \ln(3.4 \times 10^{-4}) - 0.0023 \times 20 / 0.01$$

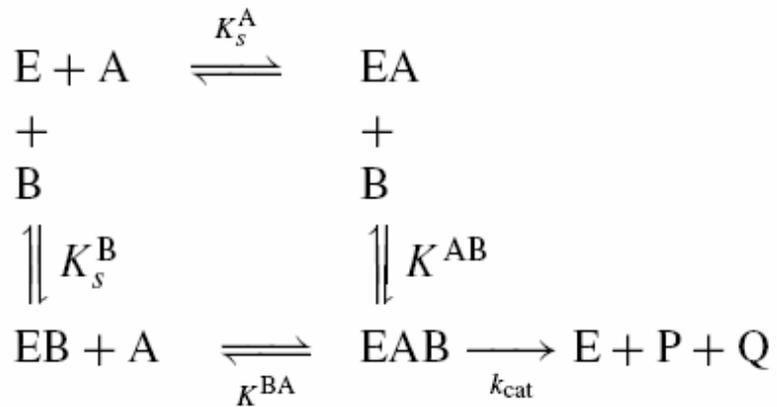
$$[S]_{20\text{min}} = 3.42 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

Two-Substrate Reactions

I. Random sequential mechanisms 随机机制

底物





$$K' = \frac{K_s^A K^{AB} + K^{BA}[\text{B}]}{K^{AB} + [\text{B}]} = \frac{K_s^B K^{BA} + K^{BA}[\text{B}]}{K^{AB} + [\text{B}]} = \frac{K^{BA}(K_s^B + [\text{B}])}{K^{AB} + [\text{B}]}$$

$$\frac{v}{V_{\text{max}}} = \frac{[\text{A}][\text{B}]}{K_s^A K^{AB} + K^{AB}[\text{A}] + K^{BA}[\text{B}] + [\text{A}][\text{B}]}$$

where $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[\text{E}_T]$

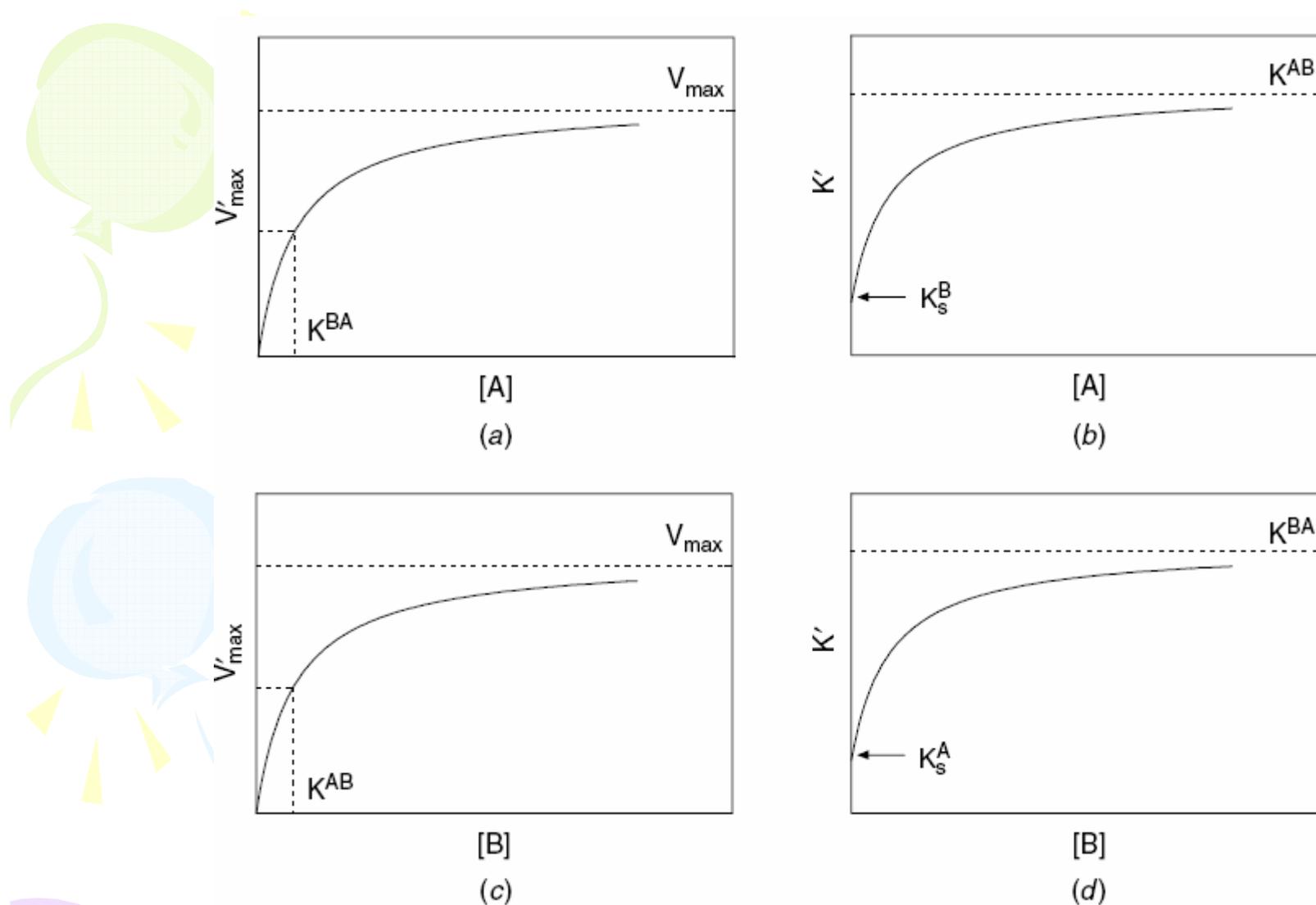
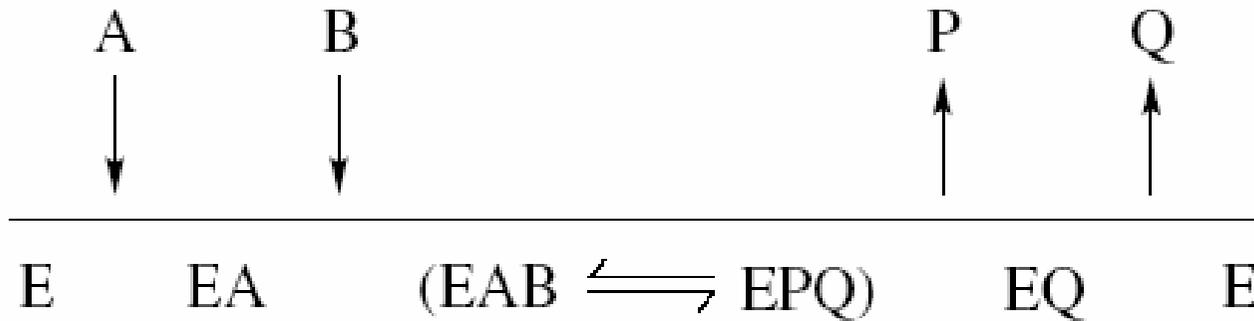


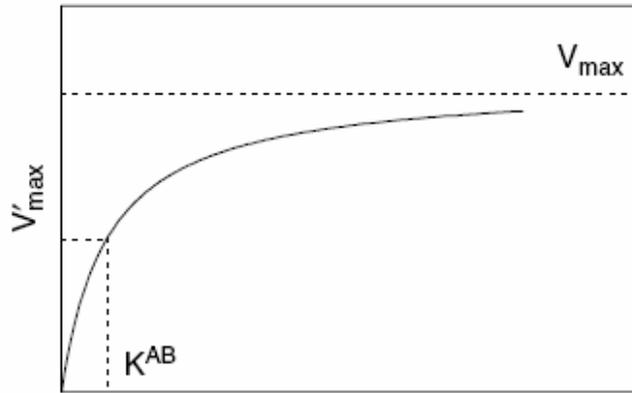
Figure. Fixed substrate concentration dependence for enzymes displaying random sequential mechanisms:
(a) Dependence of V_{max} on $[A]$; (b) dependence of K on $[A]$;
(c) dependence of V_{max} on $[B]$; (d) dependence of K on $[B]$

II. Ordered sequential mechanisms 顺序机制

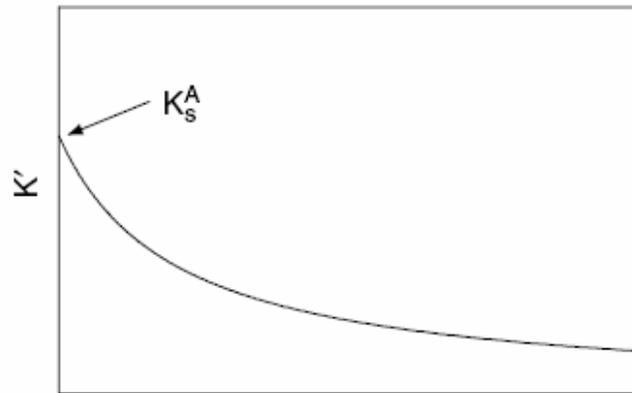


$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_s^A K^{AB} + K^{AB}[A] + [A][B]}$$

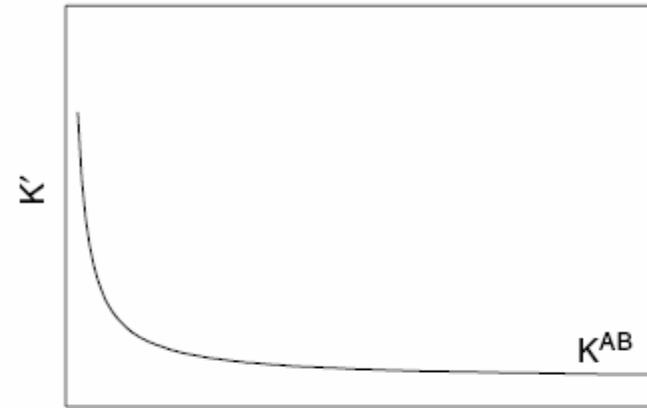
where $V_{\max} = k_{cat}[E_T]$



[B]
(a)



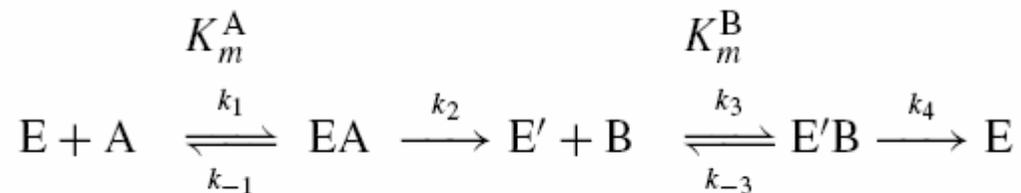
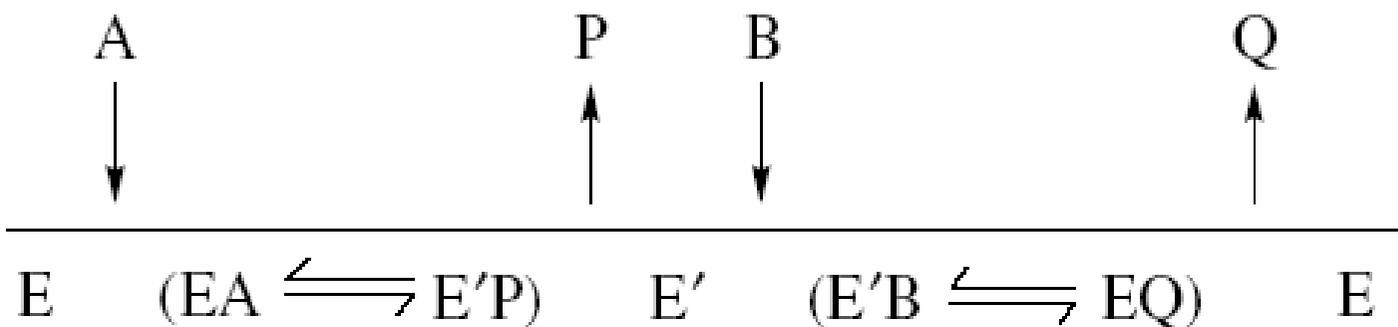
[B]
(b)

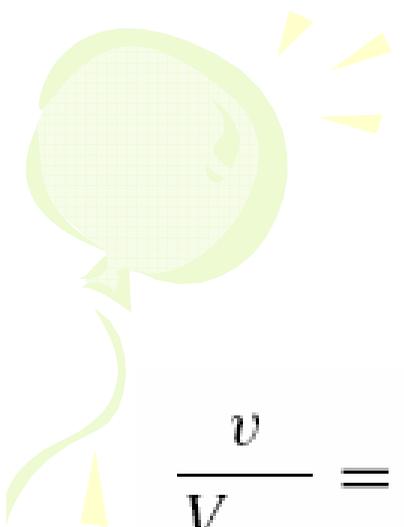


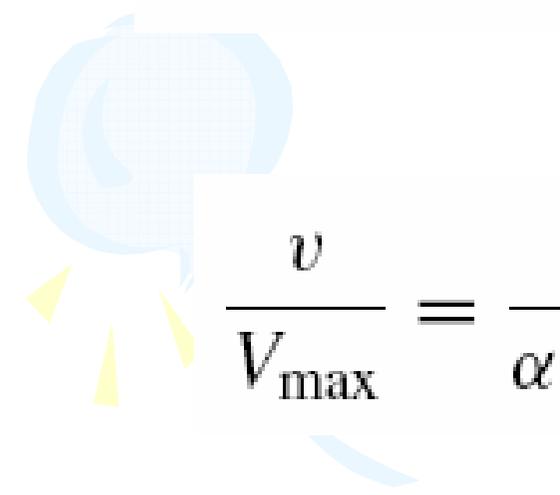
[A]
(c)

III. ping-pong mechanisms

底物A和B始终不同时与酶结合。




$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{(k_4/k_2)K_m^A[B] + K_m^B[A] + [A][B](1 + k_4/k_2)}$$


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

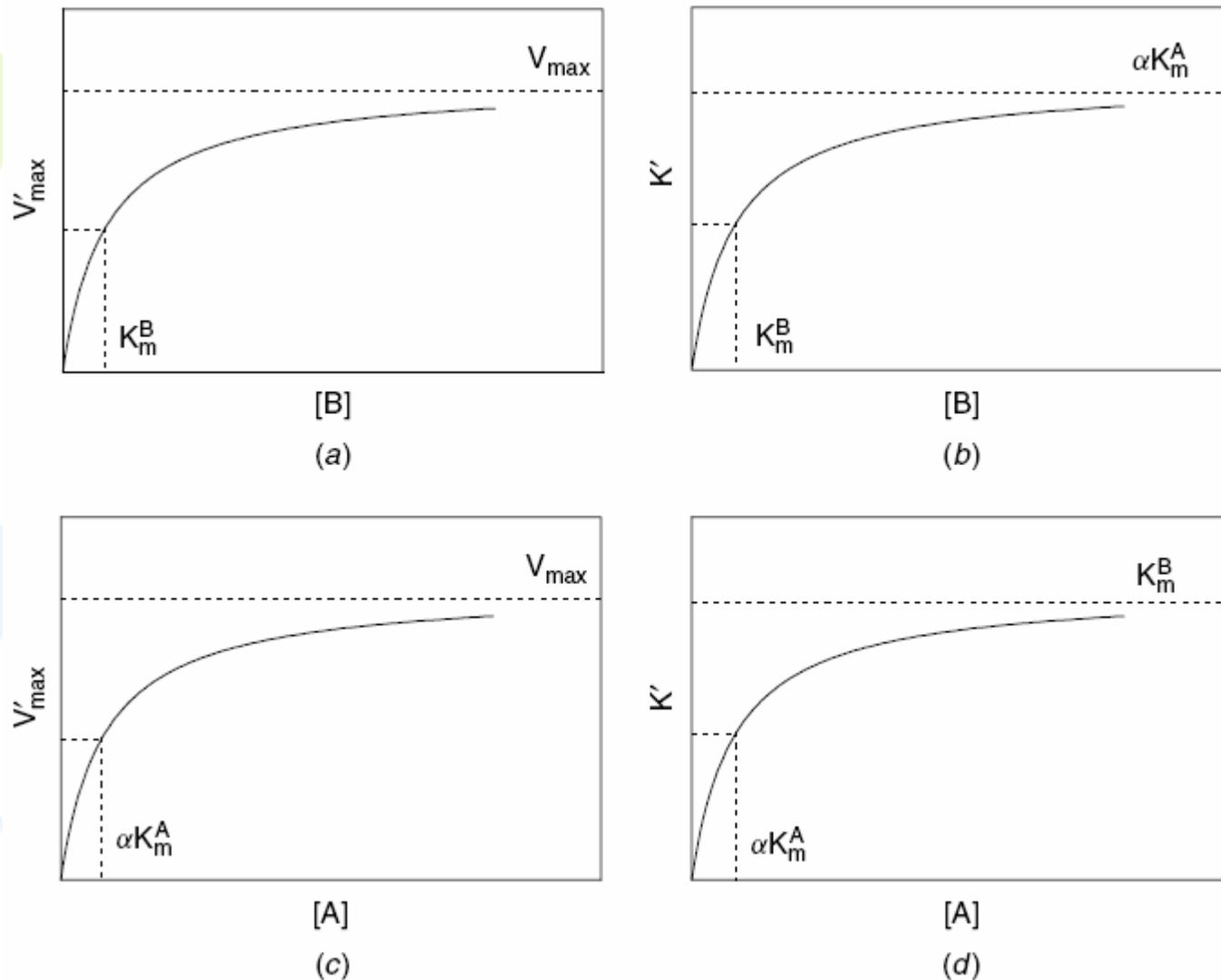
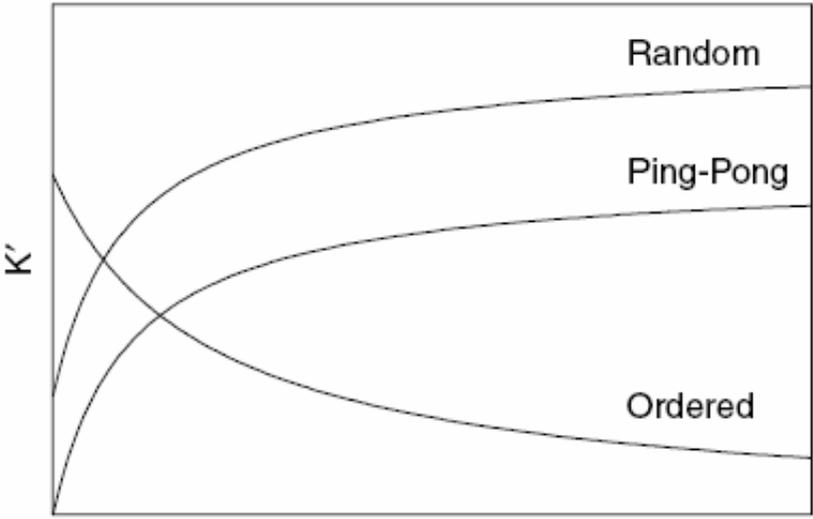


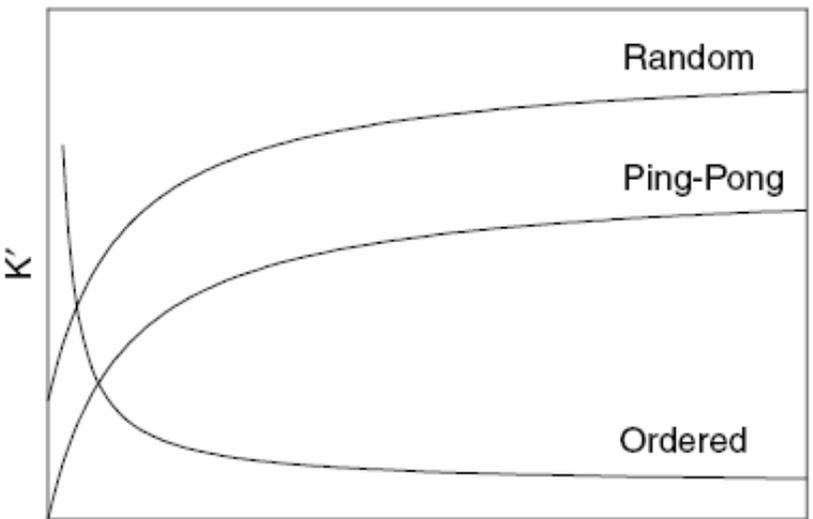
Figure 7.3. Fixed substrate concentration dependence for enzymes displaying ping-pong mechanisms:

(a) Dependence of V_{\max} on $[B]$; (b) dependence of K on $[B]$; (c) dependence of V_{\max} on $[A]$; (d) dependence of K on $[A]$.

Differentiation Between Mechanisms



[B]
(a)



[A]
(b)