

Chapter 11 Enzymes: Biological Catalysts

教師:余兆松

日期:2014/04/01

撰稿組:27 怪寢

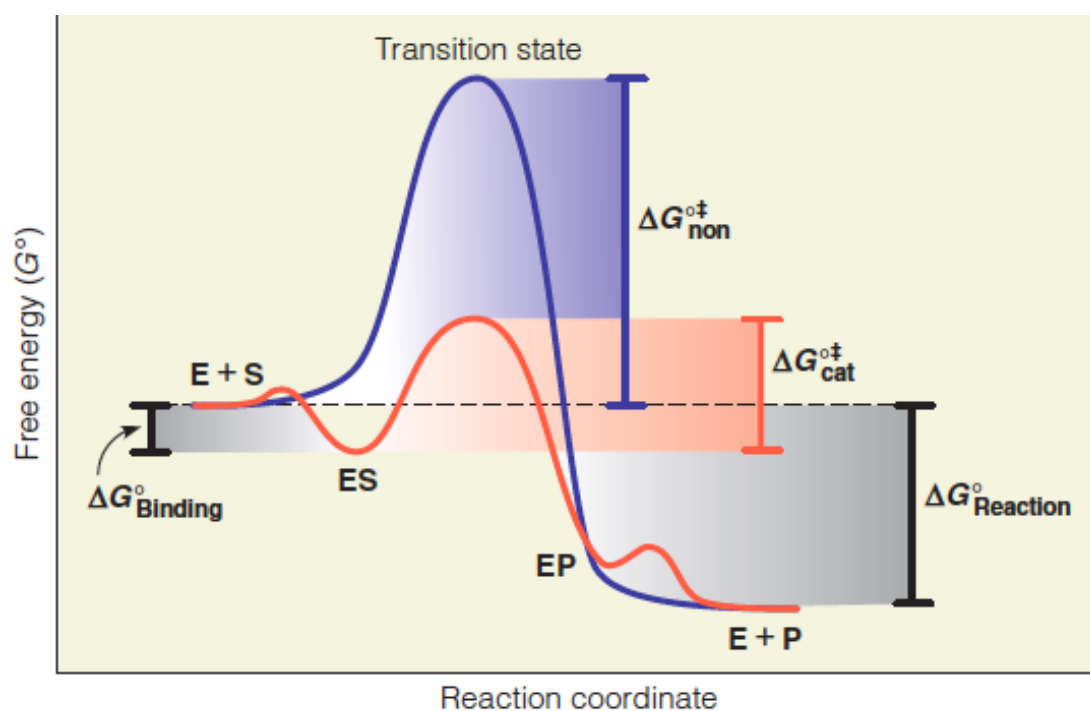
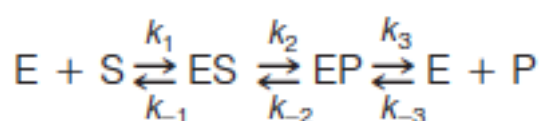
審稿組:28 蠹寢

林俞任、任君凱、林宗炫、鄭尚奇

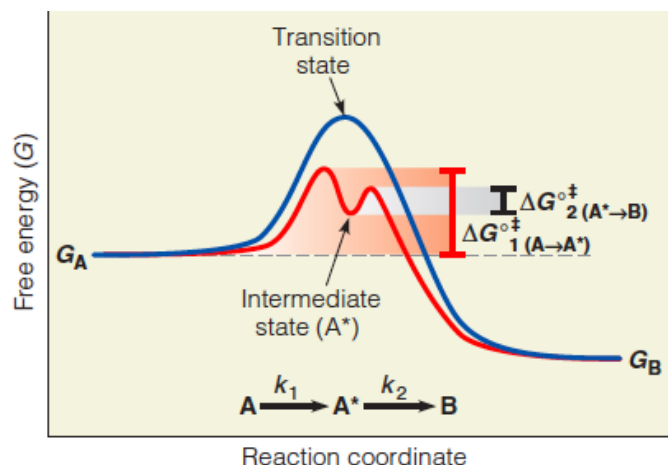
康碩文、王晨宇、王麒翔、羅笙維

零、名詞解釋

enzyme (E) ; substrate (S) ; product (P) ; ES the *enzyme - substrate complex*(ES) ; EP 是 enzyme-product *complex*(EP).



- 1.其中，加入催化劑後（紅線）所成波谷為 intermediate state（如下圖所示），較 transition state 穩定。
- 2.加入催化劑後可能不只一個的波峰，亦可能為 2,3...等數個波峰。



壹、速率決定步驟(rate-limiting step)

然而，通常多步驟的複雜反應圖形可以被簡化為以速率決定步驟來做為圖形的代表。速率決定步驟是多步驟反應中反應速率最慢的步驟，也因此，我們所觀察到的反應速率就是由速率決定步驟來決定。

一個酵素的活化位(active site)跟其受質的 transition state 在各方面(ex.形狀、電荷、極性)都有較高的互補性(complementarity,和受質原本的狀態相較)，也因此酵素能夠降低受質變為 transition state 所需的 ΔG 。

貳、從熱力學看: entropy(熵)→亂度、enthalpy(焓)→熱含量

The change in entropy (亂度) 當酵素和受質四散於水中時亂度大，酵素可以抓住受質，拉近受質間的距離來反應。維持這個狀態需要能量。分子間互相接近，亂度下降後，需要活農來彌補亂度損失，而後形成鍵結後放出能量，彌補了使亂度下降的損失，令整體反應有利產物生成。

※補充:

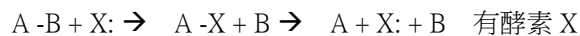
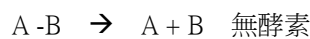
大部分的酵素會伴隨以下數種反應來提高反應速率：

1.酸鹼催化

離子性的中間產物常常不穩定，易發生逆反應回反應物。但酵素上的胺基酸側鏈可和中間產物發生質子的轉移，使中間產物可以快速的變為生成物(速率大於逆反應)，使產物有效的產生。這些胺基酸側鏈可使反應速率增加 100~100000 倍。

Amino acid residues	General acid form (proton donor)	General base form (proton acceptor)
Glu, Asp	$\text{R}-\text{COOH}$	$\text{R}-\text{COO}^-$
Lys, Arg	$\text{R}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{N}}}$	$\text{R}-\text{NH}_2$
Cys	$\text{R}-\text{SH}$	$\text{R}-\text{S}^-$
His	$\text{R}-\text{C}=\text{CH}$ $\text{HN} \quad \text{NH}$	$\text{R}-\text{C}=\text{CH}$ $\text{HN} \quad \text{N:}$
Ser	$\text{R}-\text{OH}$	$\text{R}-\text{O}^-$
Tyr	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	$\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}^-$

2. 共價催化



透過酵素的官能基先把 A-B 打斷，酵素進而和部分的受質形成共價鍵結，最後再釋出短暫鍵結的產物。

3. 金屬離子催化

有些酵素的 cofactor 為金屬離子，帶正電，會和帶負電的受質產生反應。金屬離子也可以催化電子轉移，接著產生氧化還原反應。(節錄自 M107 共筆)

參、Two models for enzyme:

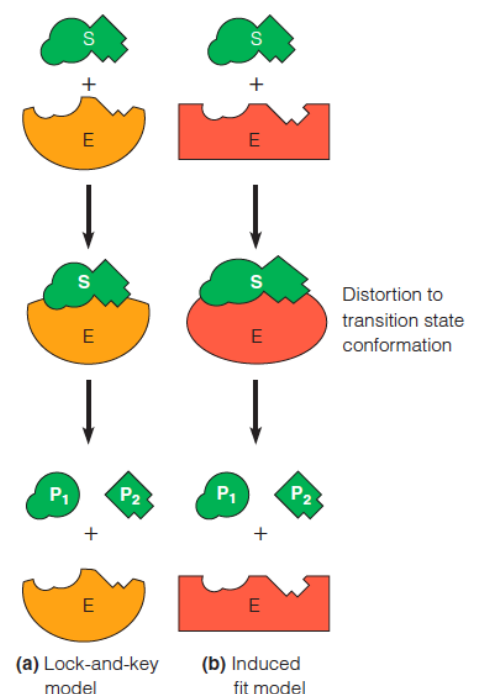
酵素和受質作用方式的兩種模型：

a) 1. 鎖鑰(lock and key)：

酵素的活化位和受質就像鑰匙和鎖一樣，是完全契合的。

b) 2. Induced-fit model：

鎖鑰模型的修正型，在這個模式中受質和酵素在結合的過程中都會被變形(distorted)——受質會被變形成近似 transition state 的形態，而酵素則負責提供受質變為 transition state 所需的一些作用力。



本寢分析：

lock-and-key model:

不完全對，因這 model 認為 Enzyme 與受質 substrate 互補。但許多實驗指出，Enzyme 與 substrate 連接後會變形(老師說磨合)。

induced fit model:

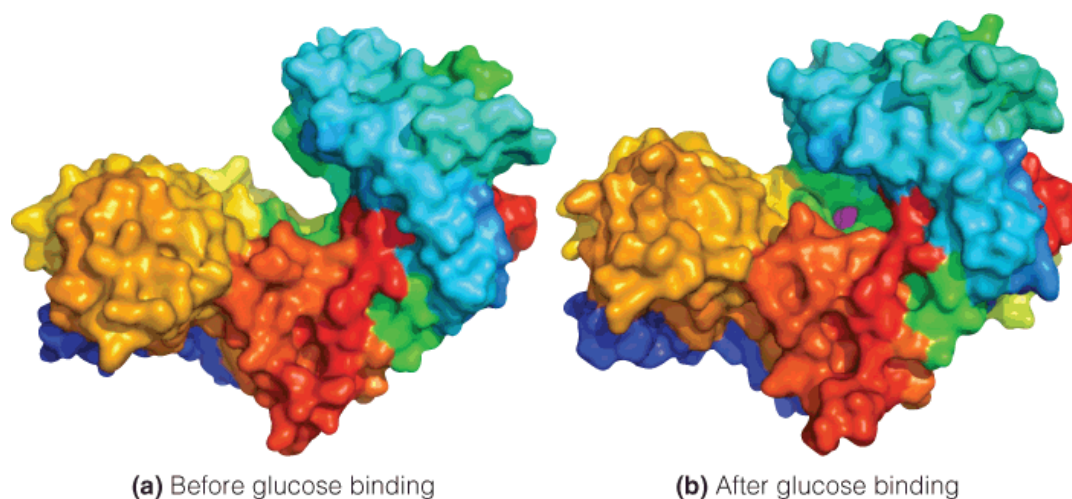
弱鍵結交互作用力在 transition state 時最大，即酵素的 active site 不跟受質本身互補，而是跟 transition state 互補，故酵素與受質結合，釋放結合能，且 transition state 是結合最好的時候。(節錄自 m107 共筆)

例如 hexokinase 在結合後構型上的變化。

補充：(老師未強調)

構型篩選機制(conformational selection)：induced-fit model 認為未結合的酵素是具有結構上的同質性的(conformational homogeneity)，然而構型篩選認為酵素 E 會在各種不同的構型間相互轉換，而只有當 E 的構型是 ES 附合體的 E 的型態時，受質才能與之結合。此外，受質和酵素的結合會打亂 E 在各狀態間原本的平衡，由勒沙特列原理可知，平衡會向 E 成為 ES 構型的方向前進。

參又壹、hexokinase 在結合後構型上的變化



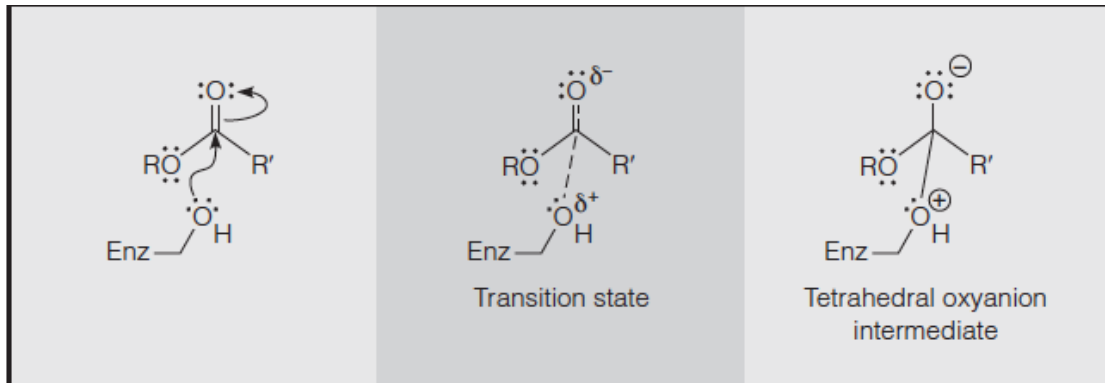
Copyright © 2013 Pearson Canada Inc.

圖中,左圖為 hexokinase 未接上 glucose 前,右圖為接上 glucose 以後所誘發的構型改變(conformational change)。為 Induced fit model 的證明。

肆、Phillips mechanism

前情提要：general acid catalysis (GAC)、general base catalysis(GBC)，兩者差異在於 GAC 在催化過程中擔任釋放 H⁺者(即為 proton donor)；GBC 在羧化過程中擔任接收 H⁺者 proton acceptor。此處酵素催化之能力來自於 H⁺之轉移達正負分布，

以利反應進行。如下圖：



由於 intermediate state 之正負分布明顯（不穩定），以利其反應進行，故其所需之活化能較 transition state 低。

正文：

下圖為 lysozyme 的有分左右途徑(左→黑箭頭；右→綠箭頭)Phillips 推測左者，意即認為 lysozyme 催化之方法來自 H^+ 之轉移(先為 GAC,接著再身兼 GBC 回歸原型，行催化反應)。

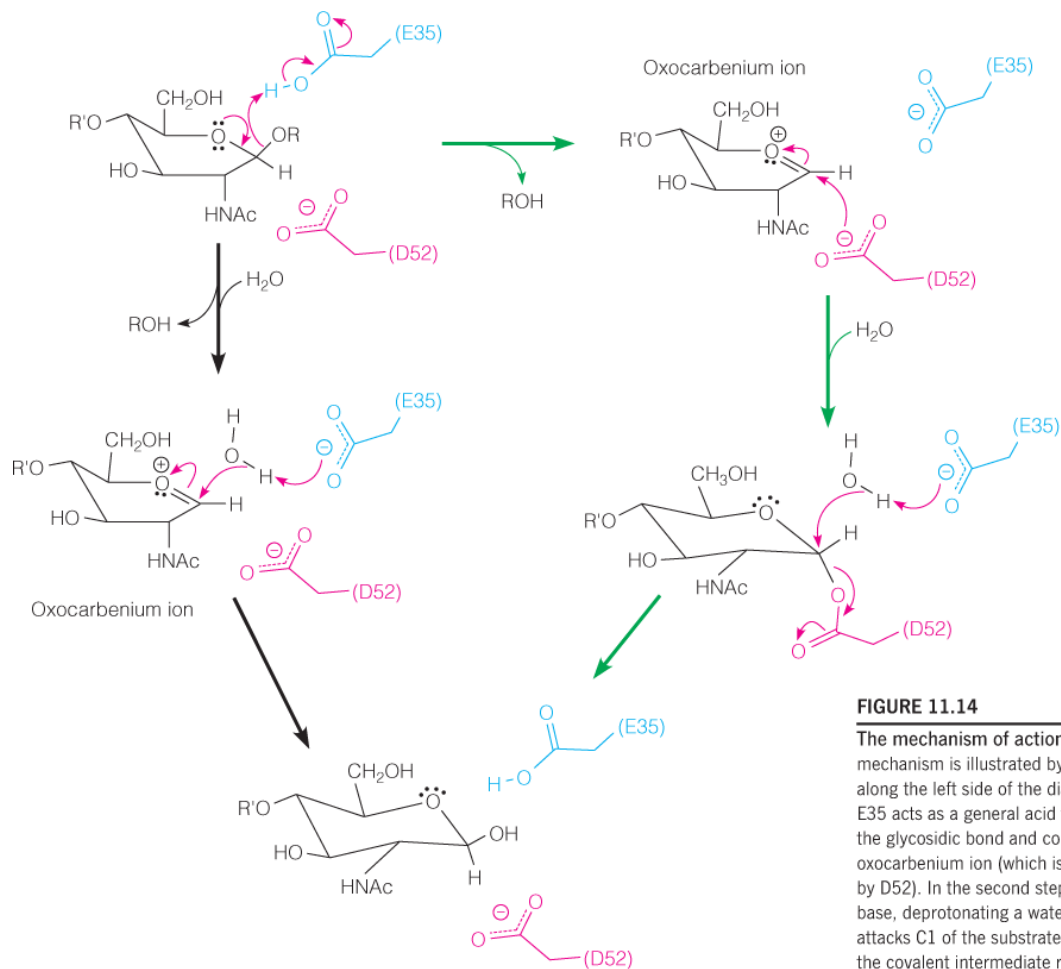
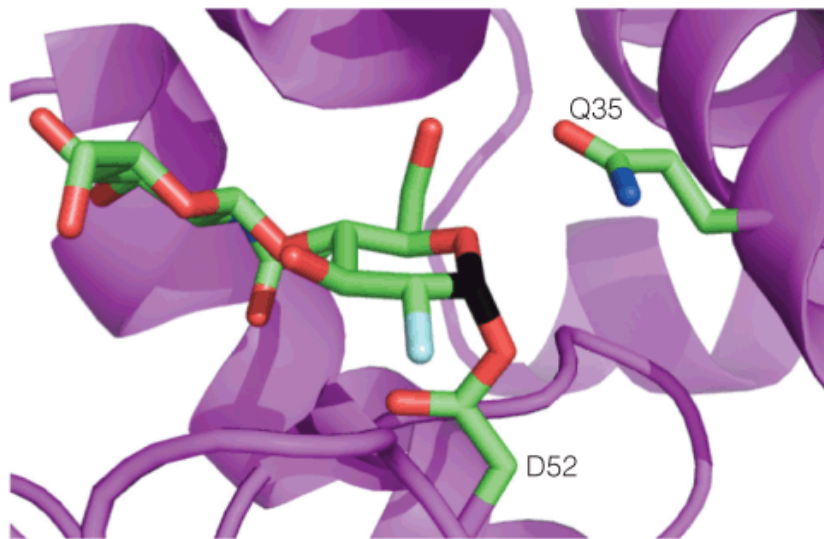
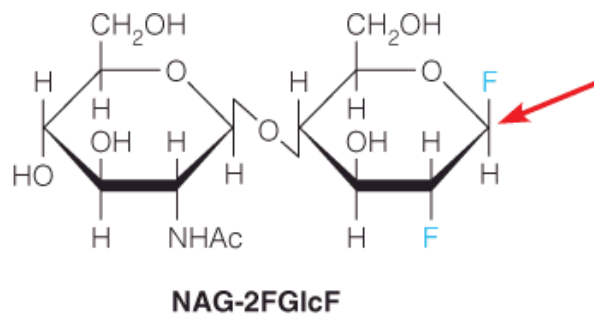


FIGURE 11.14

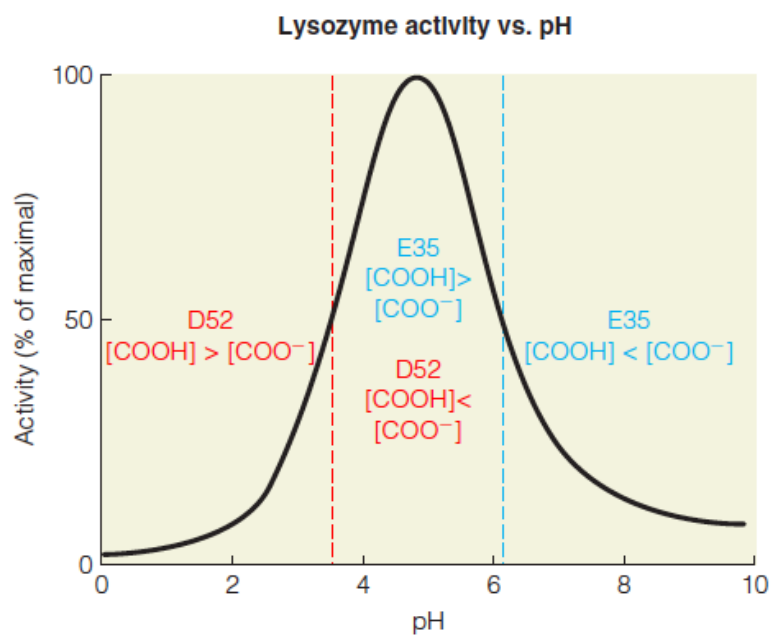
The mechanism of action of lysozyme is illustrated by the diagram. Along the left side of the diagram, E35 acts as a general acid to protonate the glycosidic bond and concomitantly forms an oxocarbenium ion (which is stabilized by D52). In the second step, E35 acts as a general base, deprotonating a water molecule that attacks C1 of the substrate. The covalent intermediate reported follows the green reaction arrow.

而此推測(Phillips mechanism)受 covalent intermediate in the mechanism of lysozyme 的研究結果所支持,透過結晶構造確認 Phillips 的推測正確。從而解釋了為何維持在

弱酸弱鹼才是酵素最佳活性(因酵素催化之能力來自於 H^+ 之轉移達正負分布,以利反應進行)。



上圖 covalent intermediate in the mechanism of lysozyme 之結構。

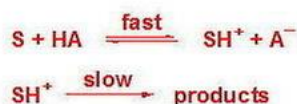


※補充：general acid-base catalysis 與 specific acid-base catalysis 差異
 general acid-base catalysis 或 specific acid-base catalysis 都是在討論酸、鹼的催化反應差別在反應速率決定步驟不一樣(參見下圖)specific 的反應速率決定於 pH 而非 HA 本身濃度而 general 的反應速率與 HA 本身濃度有關(酸的強度)。一般而言，一反應並非全然是 general 或 specific 當 pH、pOH 太低；HA、AOH 濃度高時，有利於 general 當 H⁺轉移到 O、N 陰電性較高的原子，有利於 specific。

Two mechanisms for acid catalysis

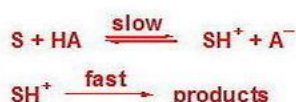
Specific acid catalysis:

- 質子(H⁺)快速轉移到受質(S)，接著SH⁺緩慢反應得到產物



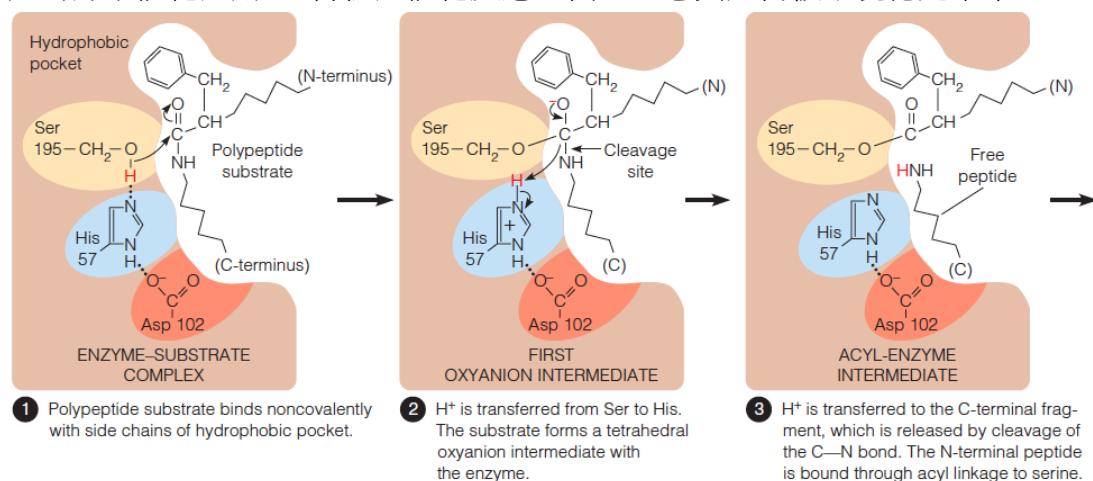
General acid catalysis:

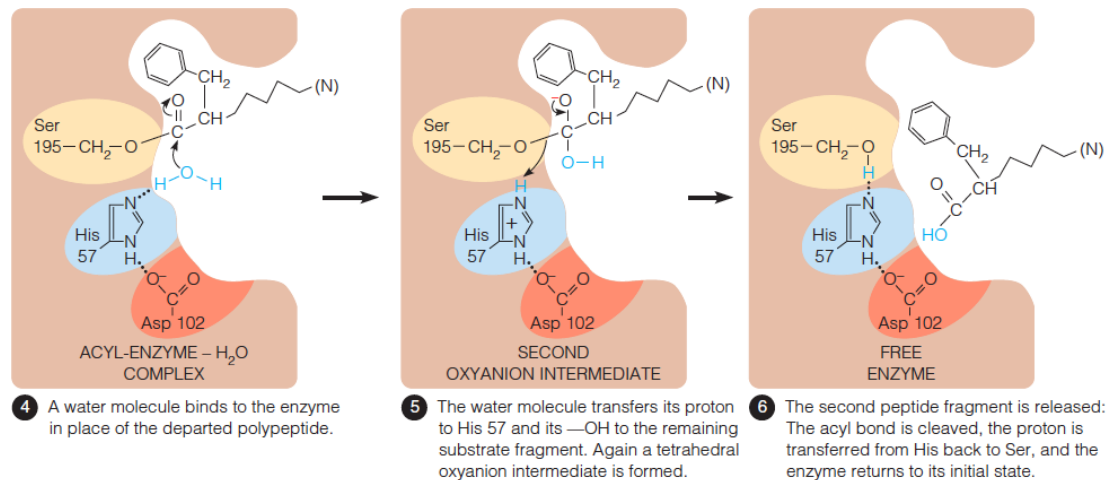
- 反應過程與上述一樣，但是第一步驟是速率決定步驟



伍、Chymotrypsin 的反應機制(p426)

此為酵素催化運用 H⁺轉移達催化反應之例。注意其如何被環境穩定下來。





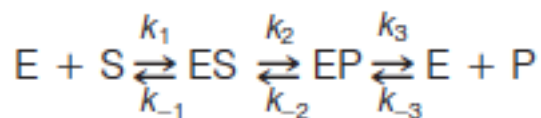
1. 受質的苯環進入 Hydrophobic pocket，讓整個 substrate 對位進行反應。
2. Ser195 支鏈上的-OH 和 His57 的支鏈因氫鍵使 Ser195 支鏈的-OH 上的 O 帶 δ^- ；C=O 和 Ser195 的主鏈上的 N-H 因為氫鍵使 C=O 上的 C 帶 δ^+ ，受質與酵素在 Gly193 和 Ser195 骨幹處稱為 oxyanion hole 鍵結，成為 ES complex。
3. 此中間產物不穩定，oxyanion hole 的 O 再度將電子打回形成 C=O，於是肽鍵斷裂，N-C 之間的電子轉而提供給 His57 的 N-H 上的 H 生成第一個產物。
4. 脫去第一個產物的 ES complex 仍不穩定，此時水分子進來參與反應，將 H⁺補回給 His57(general base catalysis)，OH 交給 C=O 上的 C。
5. oxyanion hole 上的 O 電子跳回成 C=O，C 與 Ser195 支鏈的 O 斷裂，其上的電子與 His57 上的 H 鍵結，His57 的 N-H 斷裂。
6. 完成第二個產物，酵素恢復原狀。(節錄自 M107 翻譯)

陸、從酵素動力學(Enzyme Kinetic)了解酵素的作用機制

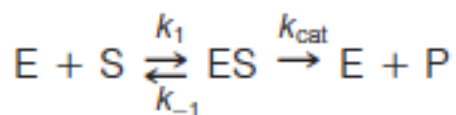
1.基礎認知

a.)Kinetics of Enzymatic Catalysis

涉及一個受質及酵素的完整反應過程可以被表示如下 假如我們分析這個酵素催化反應的初速率，並且假設 k_1 , k_{-1} , 和 k_3 皆 $\gg k_2$ ，那麼上式可被簡略成下：

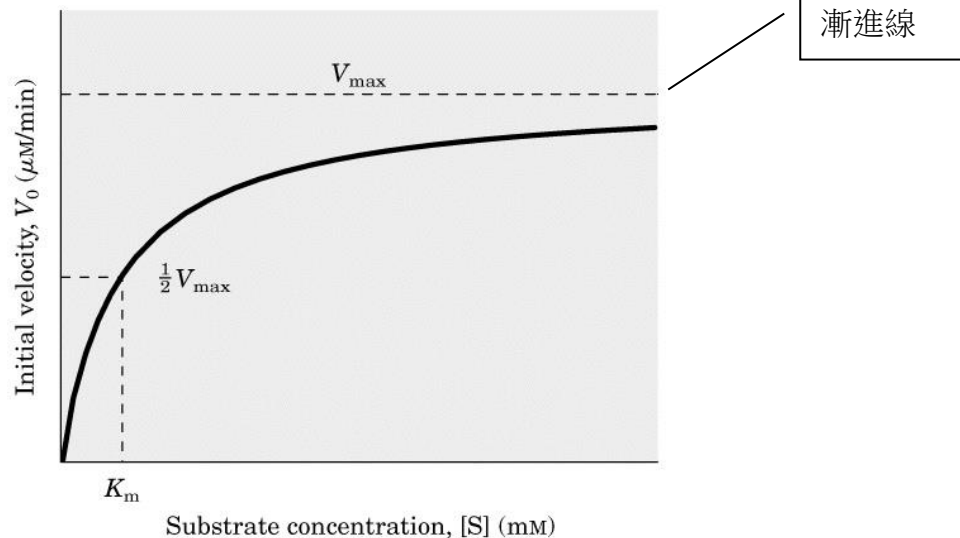


而 k_{cat} 是受質到產物之速率決定步驟的表觀速率常數(apparent rate constant)



b.)Enzyme Kinetic：決定酵素的反應速率，以及改變實驗參數時，反應速率會如何改變。

(1) 給予定量的酵素，不同的受質濃度([S])的反應速率，其曲線如下：

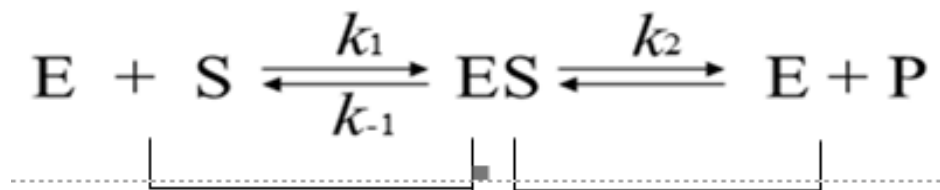


(2) 主要測量數據

- a. 初速率 V_0 ：在很短的時間內，受質濃度遠大於酵素濃度([S]>>[E])，所呈現產物的生成速率。
- b.最大反應速率 V_{\max} ：當受質濃度無限大([S]→∞)，而酵素量有限，所有的酵素都能在最短時間內和受質作用。 V_{\max} 通常為一定值。(節錄自 M107 共筆)

2.Michaelis-Menten equation(必考!!請學會自行推導)

$$V_0 = V_{\max} [S] / ([S] + K_m)$$

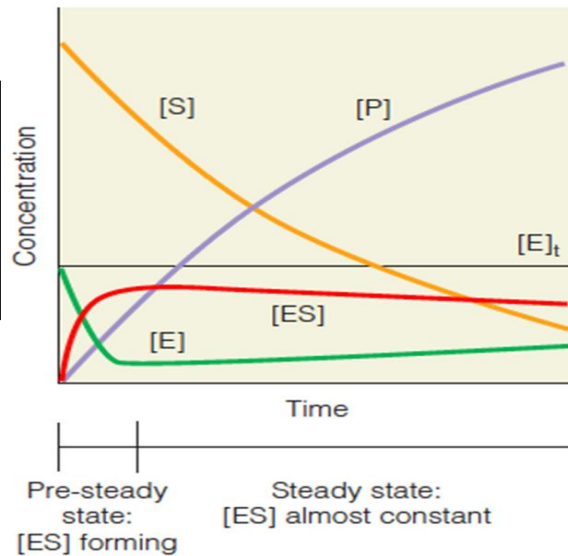


(k=反應速率常數，E=enzyme，S=substrate，P=product，Et=酵素總量)

ES 的形成(Rate of ES formation) = $k_1 \text{E} [\text{S}] = k_1([\text{Et}] - [\text{ES}])[\text{S}]$ ---- (A)

ES 的消失(Rate of ES breakdown) = $k_{-1}[\text{ES}] + k_2[\text{ES}]$ ---- (B)

由左圖即 **Steady state assumption**，假設在穩定狀態下 ES 的濃度維持穩定，故可得 (A)=(B)，將上式帶入－



$$k_1([E]_t - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad \text{---- (A) = (B)}$$

$$k_1[E]_t[S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

移項整理 $k_1[E]_t[S] = \frac{(k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES]}{k_1}$

$$[ES] = k_1[E]_t[S] / (k_1[S] + k_{-1} + k_2) \quad k_1 \text{ 移到分母}$$

$$[ES] = [E]_t[S] / \{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1\} \quad \text{-----[2]}$$

令 $(k_{-1} + k_2)/k_1 = K_m$ (Michaelis constant)，可得

$$[ES] = [E]_t[S] / ([S] + K_m) \quad \text{-----[3]}$$

[3]代入[1] $\Rightarrow V_0 = k_2[ES] = k_2[E]_t[S] / ([S] + K_m)$

因 $V_{\max} = k_2[E]_t \Rightarrow V_0 = V_{\max} [S] / ([S] + K_m) \quad \text{---- Michaelis-Menten equation}$