

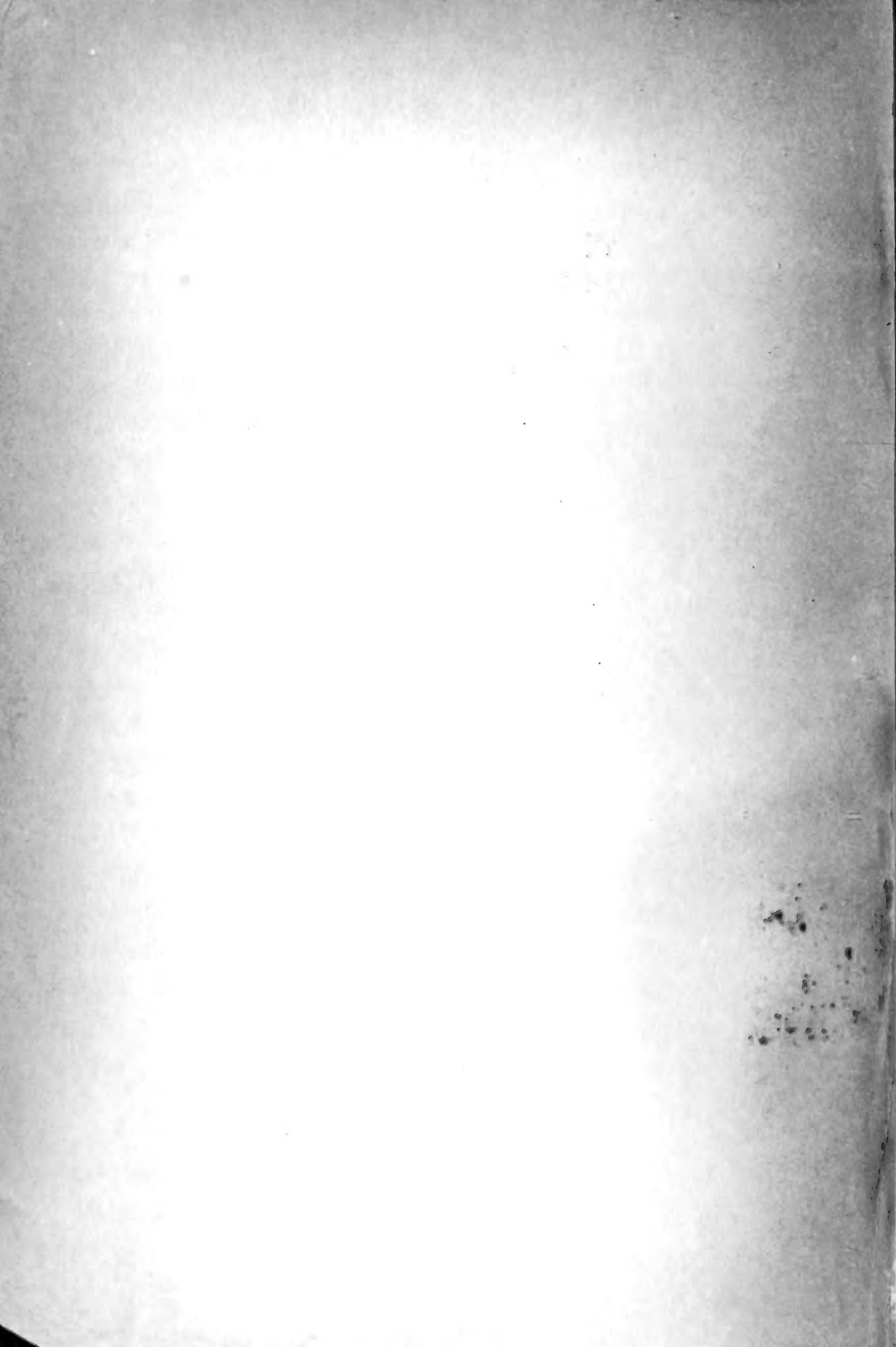
高等学校轻工专业试用教材

生物化学

(工业发酵专业用)

大连轻工业学院 主编

轻工业出版社



58.173
111

高等学校轻工专业试用教材

生 物 化 学

(工业发酵专业用)

大连轻工业学院 主编



轻工业出版社

中科院植物所图书馆



S0017364

内 容 提 要

全书分三篇共十二章，第一篇为生物体内活性物质的化学，分为蛋白质、酶、核酸三章。第二篇为新陈代谢，分为新陈代谢概论、生物氧化、糖类代谢、脂类代谢、烃类代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢七章。第三篇为遗传的分子基础及代谢的调节控制，分为遗传的分子基础及代谢的调节控制二章。本教材为工业发酵专业生物化学课程教科书，也可供有关科研人员、工厂技术人员以及高等院校有关专业师生参考。

高等学校轻工专业试用教材

生 物 化 学

(工业发酵专业用)

大连轻工业学院 主编

*

轻工业出版社出版

(北京阜成路3号)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

*

850×1168 毫米 1/32 印张：16 $\frac{8}{32}$ 插页：2 字数：405 千字

1980年11月第一版第一次印刷

印数：1—13,000 定价：2.15 元

统一书号：15042·1557

编者说明

本教材由华南工学院、无锡轻工业学院、天津轻工业学院和大连轻工业学院根据四校共同制定的编写大纲，联合编写，由大连轻工业学院主编，并经工业发酵专业教材编审委员会审定。

编写分工如下：绪言、氨基酸代谢由严复编写；蛋白质、酶由彭志英编写；酶、烃类代谢由郭勇编写；核酸、脂类代谢由陈思斌编写；代谢总论、糖类代谢由全文海编写；生物氧化由王武编写；核苷酸代谢、遗传分子基础由张淑惠编写；代谢调节控制由高焕春编写。大连轻工业学院严复、陈思斌负责统稿。

本教材供工业发酵专业生物化学课程教学用，也可供有关研究人员、工厂技术人员和高等院校有关专业师生参考。

在编写过程中，我们得到了各有关高等院校领导的关怀和支持，保证了编写工作的顺利进行。轻工业部食品发酵研究所、沈阳药学院抗菌素专业、上海化工学院抗菌素专业对编写工作提供了宝贵意见，我们表示衷心感谢。

由于我们水平所限，编写中难免有错误、缺点，请读者批评指正。

编者



目 录

绪言	1
----	---

第一篇 生物体内活性物质的化学

第一章 蛋白质	4
第一节 概述	4
第二节 蛋白质的化学组成	5
一、蛋白质的元素组成	5
二、蛋白质的分子组成	6
第三节 氨基酸的结构、分类及性质	7
一、天然氨基酸的结构特点	7
二、氨基酸的分类	8
三、氨基酸的理化性质	15
第四节 蛋白质的结构	24
一、蛋白质的基本化学结构	24
二、蛋白质的空间结构	29
第五节 蛋白质的理化性质	34
一、蛋白质的分子量	34
二、蛋白质的两性解离及等电点	37
三、蛋白质的胶体性质	39
四、蛋白质的沉淀作用	40
五、蛋白质的变性作用	42
六、蛋白质的呈色反应	45
第六节 蛋白质的分类	46
一、单纯蛋白质	46

二、结合蛋白质	48
第二章 酶	51
第一节 概述	51
第二节 酶的化学本质与组成	52
一、酶的化学本质	52
二、酶的组成	52
三、几种重要的辅酶或辅基	53
第三节 酶的结构及其与催化功能的关系	61
一、酶的结构	62
二、酶的活性部位	63
三、酶的构象与催化功能的关系	65
第四节 酶的催化特性	68
一、酶的催化反应条件	68
二、酶的催化效率	68
三、酶的专一性	69
四、酶催化功能的转换	70
第五节 酶的催化作用机制	72
一、酶的催化本质	72
二、酶的催化机制	74
第六节 酶的反应动力学	77
一、酶反应速度的测定	77
二、酶浓度对反应速度的影响	79
三、底物浓度对反应速度的影响	80
四、抑制剂对酶促作用的影响	86
五、激活剂对酶促作用的影响	89
六、pH 对酶促作用的影响	92
七、温度对酶促作用的影响	93
第七节 酶的命名、分类及应用	95
一、酶的命名	95

二、酶的分类及应用	96
第八节 酶在细胞内的分布	101
第九节 酶的分离、提纯及保存	102
一、酶的抽提	102
二、酶的纯化	103
三、纯度鉴定	108
四、酶的保存	109
第十节 固相酶与模拟酶简介	110
一、固相酶	110
二、模拟酶	115
第三章 核酸	117
第一节 概说	117
第二节 核酸的化学组成	119
一、核酸的化学组成	119
二、核酸水解产物的化学结构	120
第三节 核酸的分子结构	129
一、核酸分子中核苷酸的连接方式(一级结构)	129
二、DNA 的双螺旋结构(DNA 的立体结构)	131
三、RNA 的立体结构	137
第四节 核酸在生物体内的存在方式	139
一、DNA 在细胞内的存在方式	139
二、单链 DNA 和环状 DNA	140
三、细胞中的 RNA	141
第五节 核酸的理化性质	141
一、一般物理性质	141
二、核苷酸与核酸的解离性质	142
三、紫外吸收性质	146
四、核酸的变性作用	149
五、核酸的显色反应	150

第六节 核苷酸及其衍生物	152
一、ATP 与 ADP	153
二、环-磷酸腺苷(简称 cAMP).....	155
三、次黄嘌呤核苷酸与黄嘌呤核苷酸	157

第二篇 新陈代谢

第四章 新陈代谢概论	159
第一节 新陈代谢概念	159
第二节 微生物新陈代谢的特点	161
第三节 新陈代谢与发酵工业	162
第四节 研究中间代谢的方法	162
一、试验材料处理	163
二、代谢途径的探讨	165
第五章 生物氧化	169
第一节 概说	169
一、生物氧化概念	169
二、生物氧化方式	169
三、生物氧化特点	170
第二节 生物氧化体系和酶类	171
一、生物氧化体系	171
二、生物氧化酶类	176
三、生物氧化体系中的传递体	178
第三节 生物氧化过程中能量的转移和利用	179
一、氧化还原电位及自由能的变化	179
二、氧化磷酸化	182
三、线粒体与氧化磷酸化的关系	187
第六章 糖类代谢	190
第一节 概说	190
第二节 多糖的分解	191

一、淀粉和淀粉酶	192
二、纤维素和纤维素酶	199
第三节 双糖的分解	200
一、蔗糖的分解	200
二、麦芽糖的分解	201
三、乳糖的水解	202
第四节 葡萄糖的降解	203
一、葡萄糖的酵解	203
二、丙酮酸的有氧降解	222
三、单磷酸己糖途径 (HMP 途径)	240
四、脱氧酮糖酸途径 (ED 途径)	249
五、葡萄糖降解途径的相互联系	252
第五节 其它己糖的降解	254
一、果糖的降解	254
二、半乳糖的降解	256
三、甘露糖的降解	260
第六节 戊糖的降解	261
一、D-木糖的降解	261
二、D-核糖的降解	262
三、L-阿拉伯糖的降解	263
四、戊糖乳酸发酵	263
第七章 脂类代谢	266
第一节 脂类	266
一、脂类的组成及其类别	266
二、脂类的存在形式与生理功能	267
第二节 脂肪的分解代谢	269
一、脂肪的组成与脂肪的乳化作用	269
二、脂肪酶	272
三、脂肪的水解	273

四、甘油的降解	274
五、脂肪酸的降解—— β -氧化作用	275
第三节 脂肪的合成代谢	280
一、 α -磷酸甘油的合成	281
二、脂肪酸的合成	281
三、脂肪(甘油三酯)的合成	289
四、酯(低级脂肪酸酯)的合成	291
第四节 磷脂及其代谢	293
一、磷脂的结构与在生物膜中的位置	293
二、磷脂的代谢	295
第八章 烃类代谢	300
第一节 链烃的代谢	300
一、基质的特异性	300
二、正烷烃的代谢	301
三、异构烷烃的代谢	305
四、不饱和链烃的代谢	305
五、辅氧化作用	307
六、烃类的代谢机制	307
第二节 环烃的代谢	309
一、脂环烃的代谢	309
二、芳香烃的代谢	311
第三节 石油发酵的生化特点	319
一、石油微生物的菌体成分	319
二、氧气的需要量	320
三、生物合成热	322
四、毒性问题	324
第九章 氨基酸代谢	326
第一节 概述	326
第二节 蛋白质的水解与蛋白质水解酶类	327

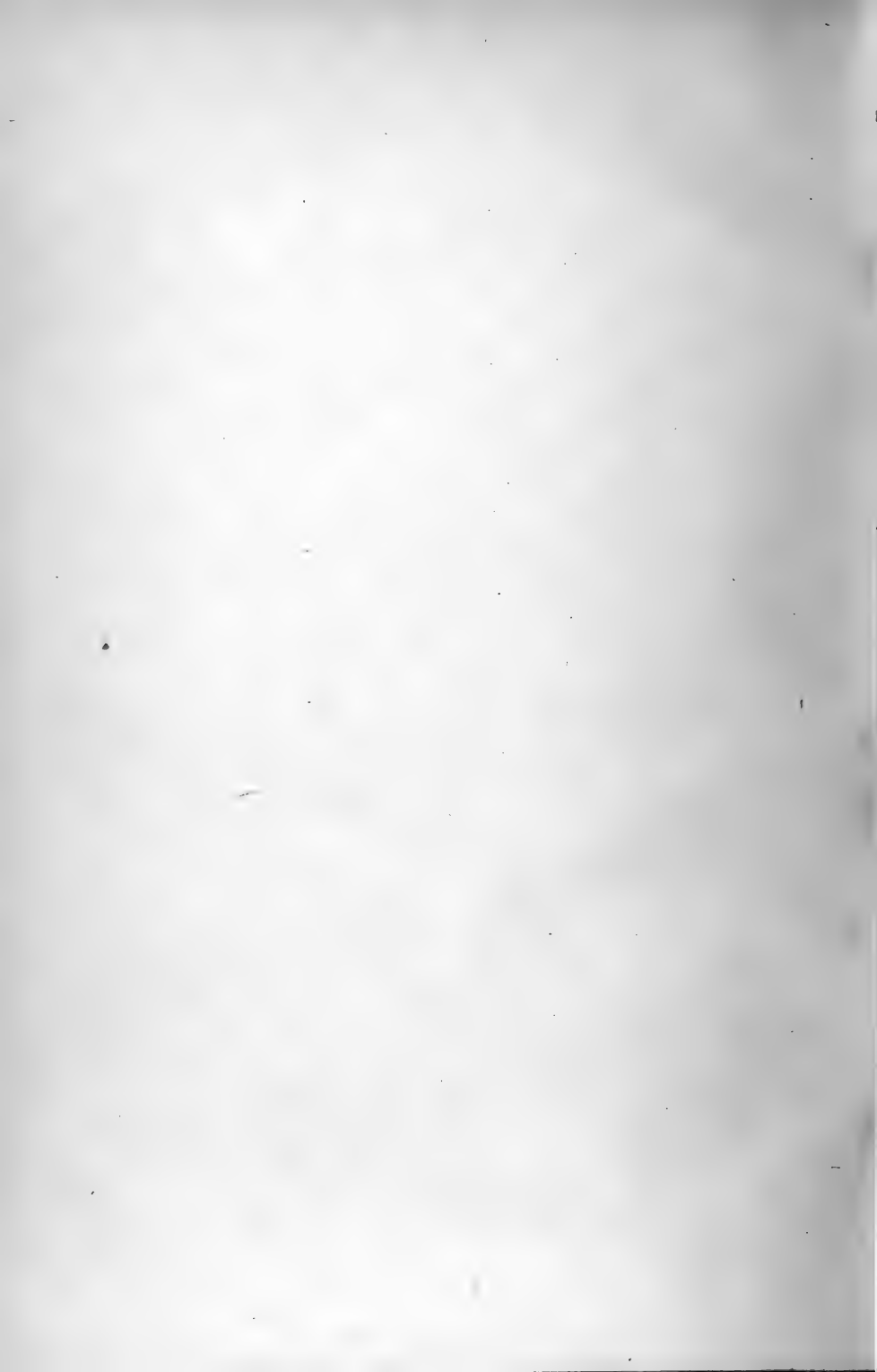
一、蛋白质的水解	327
二、蛋白质水解酶类	328
第三节 氨基酸分解代谢的共同途径	332
一、脱氨基作用	332
二、转氨基作用	339
三、联合脱氨基作用	341
四、氨基酸的脱羧基作用	342
第四节 氨基酸分解产物的代谢途径	346
一、 α -酮基酸的代谢	346
二、氨的代谢	347
三、 CO_2 的去路	349
四、胺的去路	350
第五节 氨基酸的生物合成	350
一、氨基化作用	351
二、转氨基作用	355
三、氨基酸间的相互转化	356
四、氨基酸合成的其他方式	367
第六节 谷氨酸发酵	379
一、概述	379
二、谷氨酸生产菌的主要生化特点	380
三、谷氨酸生物合成的代谢途径	381
四、环境条件对谷氨酸发酵的影响	384
第七节 氨基酸与糖、脂肪代谢的相互联系	386
一、氨基酸与糖代谢的联系	387
二、氨基酸与脂肪代谢的联系	387
三、糖与脂肪代谢的联系	387
第十章 核苷酸代谢	390
第一节 核酸的降解与有关的酶	390
一、核酸的解聚作用	390

二、核苷酸的降解	392
第二节 核苷酸的生物合成	393
一、嘌呤核糖核苷酸的合成	393
二、嘧啶核糖核苷酸的合成	401
三、脱氧核糖核苷酸的合成	404

第三篇 遗传的分子基础及代谢的调节控制

第十一章 遗传的分子基础	409
第一节 核酸的生物合成	409
一、DNA 的生物合成	410
二、RNA 的生物合成	417
第二节 核酸与蛋白质的生物合成	421
一、遗传信息及其传递	422
二、信使 RNA 与遗传密码	423
三、与蛋白质生物合成有关的 RNA	425
四、蛋白质的生物合成	428
五、蛋白质与基因	435
第十二章 代谢的调节控制	438
第一节 调节控制的一般概念	438
第二节 细胞水平的调节机制	440
一、两个反馈体系控制酶的活动	440
二、细胞水平调节控制模式	442
三、关于酶合成的调节(诱导、阻遏作用) —— 操纵子学说(operon theory)	443
四、酶活性的调节——反馈抑制和激活	455
五、调节的分子基础——变构蛋白与调节酶	456
六、分枝合成途径的反馈调节模式	464
七、微生物中几种效应的调节控制解释	473
第三节 工业发酵是微生物代谢调节的措置过程	481

第四节 代谢调节控制与育种	484
一、减低末端产物浓度营养缺陷型及其在生产上的 应用	484
二、抗代谢物类似物突变种的饰选与应用	488
第五节 细胞通透性的调节作用及其在发酵工业上的 意义	491
专门名词简写代号	500
主要参考材料	505



绪 言

生物化学是关于生命的化学。

生物化学是以生物体为对象，从化学的观点，研究生命本质的科学。它是用化学、物理和生物学的方法研究生命物质的化学性质和功能的科学。

生物化学的任务是用辩证唯物主义的观点研究生物体的化学组成，以蛋白质、核酸为主的生命物质的结构、功能，及其在生命活动过程中的化学变化，以及从分子水平阐明生长、分化、繁殖、遗传等生命现象的化学本质。

恩格斯早就指出：“生命是蛋白体的存在方式，这个存在方式的基本因素在于和它周围的外部自然界的不断的新陈代谢，而且这种新陈代谢一停止，生命就随之停止，结果便是蛋白质的分解”^{*}。恩格斯对生命的这一辩证唯物主义的光辉论断，揭示了生命的本质问题：即蛋白体是生命的物质基础，新陈代谢是生命的基本特征。半个多世纪以来，生物化学已经深入揭示了糖类、脂类、蛋白质、核酸等物质的新陈代谢过程。一九五三年以来，又搞清了脱氧核糖核酸的双螺旋结构，证实了核酸是遗传物质、信息大分子，蛋白质合成是以核酸为模板；并形成了以蛋白质、核酸为中心的生物化学基本理论，充分证实并发展了恩格斯的伟大预见，阐明了生命本质，批判了生命神秘论的唯心主义观点，及把生命本质归结为物理化学现象的机械论观点。今后生物化学将进一步揭示生命活动的机制与规律，阐明生命物质的结构与功能，并将以其丰硕的成果为其他各学科及工农业生产服务。

^{*} 恩格斯：《自然辩证法》P 277，人民出版社，1971年8月第一版。

生物化学是一门迅速发展的现代自然科学。生物化学不断从化学、物理、生物学等有关学科的新成就、新技术中吸收丰富的研究成果，互相渗透发展而成为独立的学科。同位素示踪法促进了物质代谢中间过程的了解，X-光衍射推动了蛋白质空间构型的了解；各种现代技术，例如层析、电泳、超速离心、红外、紫外分光光度法、质谱、核磁共振等实验方法，解决了物质的分离提纯与分析检定。这些都促进了生物化学的发展。此外，生物化学与农业、工业(特别是发酵工业、食品工业)、医药卫生的关系都很密切。由于生产实践发展的需要，向生物化学提出各种各样的要求也推动了生物化学向前发展。几十年来，生物化学已成为自然科学中发展很快，在社会主义建设中起重大作用的很引人重视的基础理论学科之一。生物化学的发展正在推动着工农业、医药卫生事业的发展。

生物化学是发酵工业的重要理论基础。发酵工业是利用微生物的生命活动，生产人类所需要的产品的工业。由原料到产品的生成，是在人工控制的条件下，通过微生物的新陈代谢(生物化学变化)而实现的。由于微生物细胞内酶系统的种类和性质的差别，带来微生物代谢类型的多样性和复杂性。这就使发酵工业的产品多种多样，对原料也有不同的选择及要求，生产工艺过程也各具特色。

此外，物质代谢的调节及控制对提高产品的质和量提供重要的理论根据。所以生物化学是工业发酵专业的专业基础课。它是阐明发酵机理，选择合理工艺途径，提高产品质量，探索新工艺，研制新产品的理论基础。

本教材分为三篇。

第一篇 生物体内活性物质的化学。

蛋白质和核酸是构成生物体的活性高分子物质，哪里有生命，哪里就有蛋白质和核酸的物质运动。按目前科学发展看来，蛋白质和核酸是生命的物质基础，酶是具有催化性的蛋白质。体内的

物质代谢靠酶催化完成。所以本教材首先介绍主要生命活性物质蛋白质、酶和核酸的化学。

第二篇 新陈代谢。

新陈代谢是生命的基本特征。生物体内各种成分和周围环境进行不断的物质交换，进行同化和异化作用。新陈代谢包括物质代谢和能量代谢。异化作用以分解代谢为主，释放能量；同化作用以合成代谢为主，需要能量。二者同时发生，紧密联系，进行物质代谢同时进行能量代谢。为使内容系统性，本教材将能量代谢放在前。随后是糖类及脂类产能物质的代谢。糖类代谢和工业发酵关系最为密切。糖类是微生物主要的碳源，是工业发酵的重要原料。工业发酵的各种各样产物大都通过糖代谢生成。本教材着重介绍糖类分解代谢的各种途径及重要发酵产品生成的机理。脂类代谢中介绍了脂类的分解与合成。

由于蛋白质合成与核酸关系密切，故将蛋白质合成与核酸合成移入第三篇中介绍，而将氨基酸的代谢及核苷酸代谢各单列一章，分别介绍氨基酸的分解合成途径，核苷酸的分解与合成。鉴于石油发酵的发展，本教材中增加了烃类的代谢一章。

第三篇 遗传的分子基础及代谢的调节控制。

近代生化成就越来越显示出核酸在生命活动中的重要地位。核酸是信息大分子、是合成蛋白质及酶的模板。核酸与蛋白质的相互作用体现了生长、分化、繁殖、遗传等生命现象。因此本篇介绍了核酸合成、蛋白质合成、遗传分子基础、代谢的调节控制机制。为在工业发酵中提高产品质量、培育新菌种、研制发酵新产品提供有关的理论基础，使生物化学理论成为运用自然规律改造客观世界为人类服务的有力工具。

第一篇 生物体内活性物质的化学

第一章 蛋白质

第一节 概 述

蛋白质是一类复杂的高分子含氮化合物，其分子量一般在一万至一百万之间，有的可达数百万或数千万。它是极为重要的活性物质。

自然界中一切生物，包括动物、植物及微生物均含有蛋白质。就微生物而言，其蛋白质含量尤为丰富，若按菌体的干重计算：酵母菌含蛋白质 50~75%；霉菌含蛋白质 14~50%；细菌含蛋白质 50~80%；噬菌体和病毒除含少量核酸外，几乎都是蛋白质。

蛋白质在生物体内的生理功能是多种多样的。酶是一种具有特殊催化功能的蛋白质，它几乎催化着机体内一切化学变化；核蛋白与生物的遗传变异紧密相关； α -角蛋白和 α -纤维状蛋白分别作为维持机体的弹性及非弹性结构；肌肉收缩是肌动蛋白和肌球蛋白的束状物彼此之间发生滑动的结果，有些微生物的鞭毛活动也类似于肌球蛋白的活动；某些激素蛋白或多肽作为新陈代谢调节的一个因子；机体内产生的抗体为免疫球蛋白；使机体致病的病毒也仅由蛋白质和核酸组成；具有载氧功能的血红蛋白是氧气和二氧化碳的运载工具；生物氧化中电子的得失也靠某些色素蛋

白来完成；细胞膜是蛋白质-脂类的复合物，具有半透膜的特点，且对所传送的分子及方向具有选择性，能更好地吸收营养物质和释放代谢产物；蛋白质也是蛋白质自我更新所需氨基酸的来源，这主要由机体内贮存性蛋白质来供应。总之，蛋白质体现了生命活动中的多种生物学功能。

由此可见，蛋白质与生命活动息息相关，没有蛋白质存在，任何生命活动是难于想象的。早在一百多年前革命导师恩格斯就揭示了生命的本质和特征，他指出：“生命是蛋白体的存在方式。这种存在方式本质上就在于这些蛋白体的化学组成部分的不断的自我更新。”现代生物化学和分子生物学的发展，完全证实了这一科学论断。蛋白质和核酸是生命的主要物质基础。

第二节 蛋白质的化学组成

一、蛋白质的元素组成

从化学元素分析表明，不同来源的蛋白质，其分子大小虽不同，其化学元素的组成、数量大致是相似的。它们除含氮(N)外，尚含有碳(C)、氢(H)、氧(O)，同时含有少量的硫(S)、磷(P)；有的还含有铁(Fe)、铜(Cu)、锰(Mn)、锌(Zn)等金属元素，个别还含碘(I)。

蛋白质含氮有一定的比例，这是一个重要的特点。一般蛋白质含氮(N)在15~17.6%，其平均值为16%。故在任何生物样品中，每克氮的存在，大约表示该样品含有 $\frac{100}{16}$ 即6.25克蛋白质。因此只要测定样品中氮量[一般用凯氏(Kjeldahl)定氮法]就能算出其中蛋白质的含量。

$$\begin{aligned} & \text{每克样品中含 N 的克数} \times 6.25 \times 100 \\ & = \text{蛋白质的含量(克\%)} \end{aligned}$$

二、蛋白质的分子组成

从蛋白质的水解产物就可得知其分子组成。因为，蛋白质可受酸、硷或酶的催化作用，将其大分子逐次水解为分子量较小的胨、胨、肽，最终生成 α -氨基酸。

蛋白质 \rightarrow 胨 \rightarrow 胨 \rightarrow 肽 \rightarrow α -氨基酸

胨、胨和肽均为蛋白质水解的中间产物，它们还可进一步水解，最终生成 α -氨基酸。因此， α -氨基酸为蛋白质分子组成的基本单位。

根据蛋白质的水解程度，可分为完全水解和不完全水解。完全水解一般采用加酸(酸法)或加硷(硷法)在高温($100\sim 110^{\circ}\text{C}$)下进行，水解较为迅速彻底，水解的最终产物为 α -氨基酸；而不完全水解则在稀酸、稀硷或用酶法在较温和的条件下进行，所得水解产物中除含有 α -氨基酸外，尚含有一定数量的胨、胨和肽等中间产物。例如，微生物培养基中用的蛋白胨和医药上应用的水解蛋白均为蛋白质的不完全水解产物。

硷法水解的作用比较强烈，常使水解产物中一些含硫、含羧基或胍基的氨基酸受到破坏，同时使某些氨基酸失去旋光性。

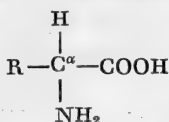
酸法水解时，将蛋白质与相当于蛋白质 $10\sim 15$ 倍体积的 25% 浓度的 H_2SO_4 或 30% 浓度的 HCl ，在 $100\sim 110^{\circ}\text{C}$ 的条件下加热，约经 $12\sim 48$ 小时即可完全水解为 α -氨基酸。此法水解的优点是比较稳定，但个别氨基酸(如色氨酸)也会受到破坏。

采用蛋白酶对蛋白质进行水解，其作用条件温和，可避免前两法的缺点。但酶法的完全水解，尚需多种蛋白酶的联合催化作用，在技术上仍有许多问题有待研究解决。

第三节 氨基酸的结构、分类及性质

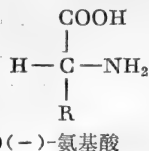
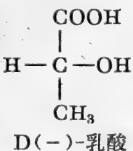
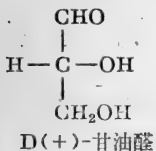
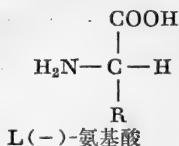
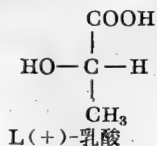
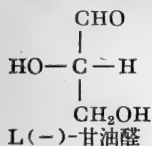
一、天然氨基酸的结构特点

蛋白质经完全水解后，所生成的各种各样的 α -氨基酸，它们在分子结构上则有共同的特点，即分子中的氨基（ $-\text{NH}_2$ 基）都与羧基（ $-\text{COOH}$ 基）相邻的一个碳原子（称为 α -碳原子）相连接，因而，称为 α -氨基酸。其结构通式为：

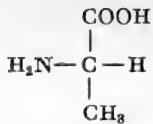


上式中除R为H的甘氨酸外，其他氨基酸所含的 α -碳原子均为不对称碳原子，因此，氨基酸（甘氨酸除外）均具有光学活性，能使偏振光平面向左或向右旋转。向右旋转的称为右旋体，通常以（+）号表示；向左旋转的称为左旋体，以（-）表示。

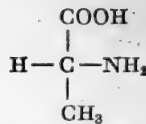
为了统一氨基酸的光学异构体的表示方法及命名，选择了乳酸作为原始参考标准。从D-及L-乳酸与D-及L-甘油醛的关系中，可得到D-及L-氨基酸结构式并表示如下：



从上列结构式的对比可知，把 α -羧基写在上方时，邻近羧基的 α -氨基在右边者为D-型氨基酸，其 α -氨基在左边者为L-型氨基酸。例如，L-和D-丙氨酸的结构式为：



L(+)-丙氨酸



D(-)-丙氨酸

氨基酸的构型与旋光性是两种不同的概念。同糖类一样，D-型或L-型氨基酸只表示其在构型上的不同，并不表示它们的旋光性。其旋光性则以(+)或(-)表示。

由于在天然蛋白质中所发现的氨基酸都属L-型，因此，L-型氨基酸称为天然氨基酸。只是在微生物中发现过几种含有D-型氨基酸的多肽。D-型与L-型氨基酸在化学组成上虽然没有区别，但是，在生理功用上却互不相同。各种生物一般只能利用L-氨基酸，而不能利用D-氨基酸。例如，乳酸菌在含有L-亮氨酸的培养基上可以生长，而在D-亮氨酸的培养基上，乳酸菌不仅不能利用，相反，还会抑制其生长。

组成蛋白质的氨基酸，目前绝大部分可用发酵法或用化学合成法生产。用发酵法生产的氨基酸皆为L-型，而化学合成法生产的氨基酸往往为D-型与L-型氨基酸的混合物，但可用适当的方法处理把它们分离出来。

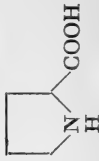
二、氨基酸的分类

按氨基酸的分子结构分为：链状氨基酸(即脂肪族氨基酸)、碳环氨基酸(即芳香族氨基酸)和杂环氨基酸三大类。也可按其分子中氨基(-NH₂基)及羧基(-COOH)的数目，或其在溶液中的酸硷性质分为中性氨基酸、酸性氨基酸和硷性氨基酸。

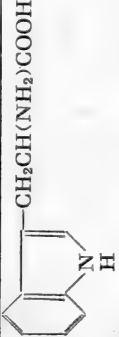


从许许多多天然蛋白质水解得到的氨基酸，虽然其种类和含量有差别；但是，比较普遍存在于多数蛋白质中的氨基酸有二十种。

现将这些氨基酸归类列如表 1-1。

表 1-1 氨基酸的分类

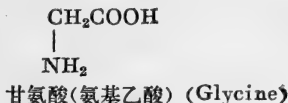
氨基酸	氨基酸名称	分子式	等电点 (pI 值)	熔点 (°C)
中性氨基酸				
甘氨酸 (Gly)	氨基乙酸	$\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COOH}$	6.06	240
丙氨酸 (Ala)	α -氨基丙酸	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	6.00	297
丝氨酸 (Ser)	α -氨基- β 羟基丙酸	$\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.68	223
半胱氨酸 (Cys)	α -氨基- β 巯基丙酸	$\text{CH}_2(\text{SH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.05	260
苏氨酸 (Thr)	α -氨基- β 羟基丁酸	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	6.16	253
蛋氨酸 (Met)	α -氨基- γ -甲硫基丁酸	$\text{CH}_2(\text{SCH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.74	283
缬氨酸 (Val)	α -氨基异戊酸	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.96	298
亮氨酸 (Leu)	α -氨基异己酸	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.98	295
异亮氨酸 (Ileu)	α -氨基- β 甲基戊酸	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	6.02	280
苯丙氨酸 (Phe)	α -氨基- β 苯丙酸	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.48	283
酪氨酸 (Tyr)	α -氨基- β 对羟基苯丙酸	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	5.66	316
脯氨酸 (Pro)	四氢吡咯-2-羧酸		6.30	220

续表 1-1

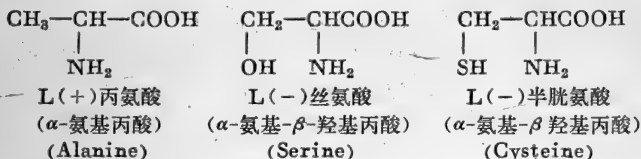
氨基酸名称	分子式	等电点 (pI 值)	熔点 (°C)
中性氨基酸			
色氨酸 (Try)		5.89	289
谷氨酰胺 (Gln)	CH ₂ (CONH ₂)CH ₂ CH(NH ₂)COOH	—	184
天冬酰胺 (Asn)	CH ₂ (CONH ₂)CH(NH ₂)COOH	—	226
酸性氨基酸			
谷氨酸 (Glu)	CH ₂ (COOH)CH ₂ CH(NH ₂)COOH	3.22	248
天冬氨酸 (Asp)	CH ₂ (COOH)CH(NH ₂)COOH	2.77	270
硷性氨基酸			
精氨酸 (Arg)		10.97	230
赖氨酸 (Lys)	CH ₂ (NH ₂)(CH ₂) ₃ CH(NH ₂)COOH	9.74	224
组氨酸 (His)		7.59	277

(一) 中性氨基酸(-氨基-羧基氨基酸)

此类氨基酸由于其分子中氨基(-NH₂基)与羧基(-COOH基)的数目相等,一般对石蕊呈中性反应。其中最简单者为甘氨酸,这是唯一不带不对称碳原子而无旋光性的氨基酸,因其具有甜味,故名为甘氨酸。其分子式为:

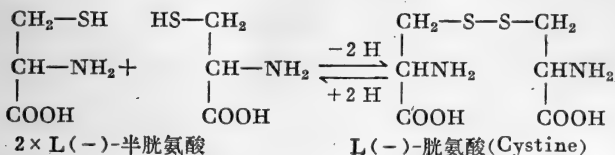


由丙酸可衍生出如下三个氨基酸:



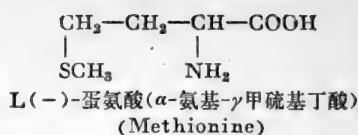
上述氨基酸中,丝氨酸含有羟基(-OH基),半胱氨酸含有巯基(-SH基)。这两个基团增加了氨基酸的化学活性。

在一定条件下,半胱氨酸易被氧化,失去氢原子。结果,两个半胱氨酸分子由二硫键(-S-S-)相连构成胱氨酸。

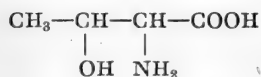


这种二硫键在蛋白质分子结构中常可找到,它可使蛋白质分子多肽链可以不通过肽键形成的方式使之交联或环联,这是稳定蛋白质结构的一种方式。

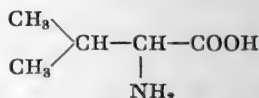
除了半胱氨酸及胱氨酸外,另一含硫的氨基酸为丁酸的衍生物,称为蛋氨酸(或称为甲硫氨酸)。



生物体中硫的代谢，主要同这三个含硫氨基酸的转变有关。在蛋白质中的苏氨酸及缬氨酸，它们是丁酸及异戊酸的衍生物。

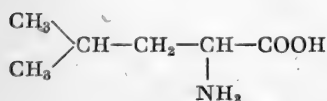


L(-)-苏氨酸
(α -氨基- β 羟基丁酸)
(Threonine)

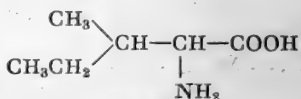


L(+)-缬氨酸
(α -氨基异戊酸)
(Valine)

与己酸相对应的有亮氨酸、异亮氨酸。



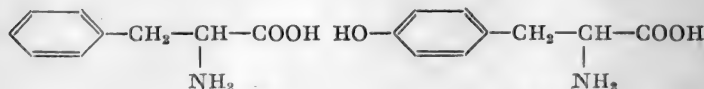
L(-)-亮氨酸
(α -氨基异己酸)
(Leucine)



L(+)-异亮氨酸
(α -氨基- β -甲基戊酸)
(Isoleucine)

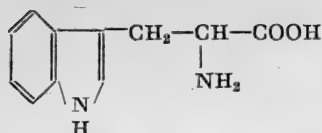
在酒精发酵时，这两种氨基酸和缬氨酸是杂醇油的主要来源。

苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸，是碳环族及杂环族化合物的衍生物。它们可以看作是丙氨酸分子中 $-\text{CH}_3$ 的一个氢原子为一环状基所取代而形成的。



L(-)-苯丙氨酸
(α -氨基- β -苯丙酸)
(Phenylalanine)

L(-)-酪氨酸
(α -氨基- β -对羟基苯丙酸)
(Tyrosine)



L(-)-色氨酸(α -氨基- β -吲哚丙酸)
(Tryptophane)

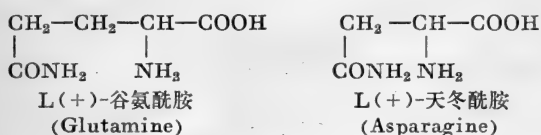
上述三种氨基酸是形成颜色反应的重要成分。

脯氨酸并不是真正的氨基酸，而是一种亚氨基酸。在代谢中由于亚氨基酸与氨基酸间有密切关系，也存在于天然蛋白质中，因而也把它列入氨基酸中。其结构式为：



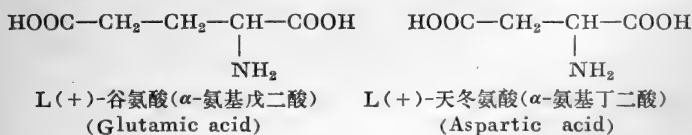
L(-)-脯氨酸(四氢吡咯-2-羧酸)
(Proline)

当谷氨酸 γ -羧基酰胺化成谷氨酰胺，天冬氨酸 β -羧基酰胺化成天冬酰胺时，它们对石蕊呈中性反应。这两种酰胺也普遍存在于蛋白质中。



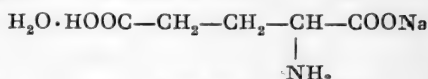
(二) 酸性氨基酸(二羧基-氨基酸)

此类氨基酸对石蕊呈酸性反应。如谷氨酸、天冬氨酸。



谷氨酸为白色结晶，在代谢中起重要作用，其发酵产品(纯

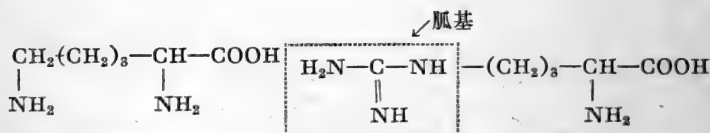
制品)在医药上已得到广泛应用。其单钠盐(含一分子结晶水)具有强烈的鲜味,故名为味精,是一种重要的调味品,已采用发酵法工业化大量生产。其结构式为:



L(+)-谷氨酸单钠(俗名为味精)

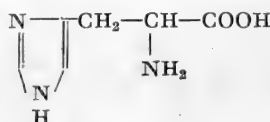
(三) 硷性氨基酸(二氨基-羧基氨基酸)

此类氨基酸对石蕊呈硷性反应。如赖氨酸、精氨酸和组氨酸。



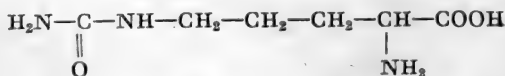
L(+)-赖氨酸(α,ε-二氨基己酸)
(Lysine)

L(+)-精氨酸(α-氨基 δ-胍基戊酸)
(Arginine)

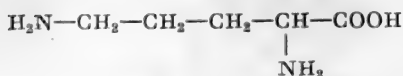


L(-)-组氨酸(α-氨基-β-咪唑-丙酸)
(Histidine)

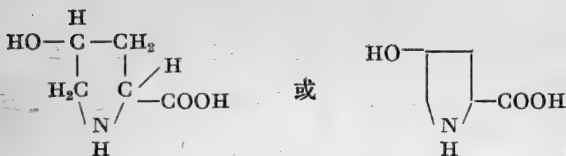
除上述三类氨基酸外,尚有一些氨基酸仅存在于个别蛋白质中或游离存在于生物体内,与蛋白质代谢有关。主要还有如下几种:



L(+)-瓜氨酸(α-氨基-δ-氮甲酰氨基戊酸)
(Citrulline)



L(+)-鸟氨酸(α,δ-二氨基戊酸)
(Ornithine)



L(-)-羟脯氨酸(4-羟基四氢吡咯-2-羧酸)
(Hydroxyproline)

三、氨基酸的理化性质

(一) 物理性质

α -氨基酸均为无色的结晶，各有其一定的晶形，同一种氨基酸因构型不同，其晶形也各异。例如，L-谷氨酸呈无色四角柱形晶状，而D-谷氨酸则为无色菱形片状结晶。

α -氨基酸因其分子呈内盐结晶，其熔点一般均比较高，约在200~300°C之间，往往加热至熔点，即同时分解生成胺，并放出CO₂气体。

α -氨基酸因具有极性基团，一般可溶于水，但亦有个别氨基酸难溶于水，如胱氨酸、酪氨酸等，所以，在配制这几种氨基酸时必须加一些稀盐酸，促使其溶解。一般不溶于乙醚，微溶于乙醇，但均易溶于稀酸、稀硷。

除甘氨酸外，所有天然氨基酸分子均含有不对称碳原子，皆具有旋光性。其旋光性用比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ 的数值表示，以(+)表示右旋，而以(-)表示左旋。旋光性物质在一定条件下就具有一定的比旋光度的数值。所以，这个数值是一个特性常数。各种天然氨基酸在水溶液中的旋光度如表1-2所示。

* 比旋 $[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{C \times L}$ ，即在单位浓度和单位盛液管长度时旋光物质的旋光度。

其中C为被测物质浓度(克/毫升)，L为盛液管的长度(分米)， α 为从旋光仪中直接读出的旋光度，t为测定时的温度(一般为20°C)， λ 为所用光的波长(一般采用钠光源，以D表示)。

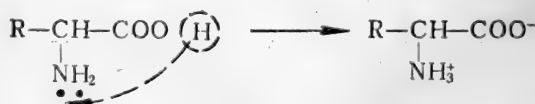
表 1-2 各种氨基酸在水溶液中的旋光度

名 称	比旋 $[\alpha]_D^{20}$	名 称	比旋 $[\alpha]_D^{20}$
L-丙氨酸	+2.7	L-亮氨酸	-10.8
L-精氨酸	+15.5	L-赖氨酸	+14.6
L-天冬氨酸	+4.7	L-甲硫氨酸	-8.1
L-半胱氨酸	-10.4	L-苯丙氨酸	-35.1
L-胱氨酸	-276.0	L-脯氨酸	-85.0
L-谷氨酸	+11.5	L-丝氨酸	-6.8
L-组氨酸	-39.0	L-苏氨酸	-28.3
L-羟脯氨酸	-75.2	L-色氨酸	-31.5
L-异亮氨酸	+11.3	L-酪氨酸	-13.2

(二) 化学性质

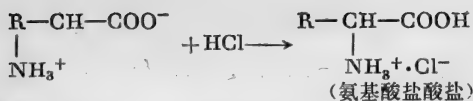
1. 两性解离及等电点

根据光谱分析, 氨基酸在结晶状态时是一个由离子键构成的化合物。是由羧基阴离子($-\text{COO}^-$)和氨基阳离子($-\text{NH}_3^+$)构成的两性离子。这种两性离子是由于其氨基N原子上的未共享电子对吸引羧基上的氢离子而形成的。

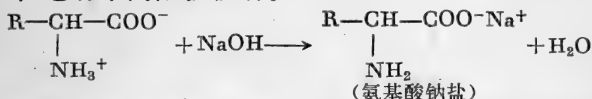


这种两性离子又称为内盐。氨基酸的结晶如盐类的晶体一样, 其熔点特别高。各种氨基酸结晶溶于水时, 其水溶液有些含有两性离子, 有些含阳离子或阴离子。

氨基酸在酸性溶液中, 其羧基阴离子与溶液中的氢离子结合成为羧基($-\text{COOH}$ 基), 留下氨基阳离子($-\text{NH}_3^+$), 故氨基酸此时成为阳离子而存在, 在电场中向阴极移动。



氨基酸在硷性溶液中，氨基阳离子析出一个氢离子与溶液中的氢氧离子(OH⁻)结合而生成水分子。故氨基酸此时作为阴离子而存在，在电场中向阳极移动。

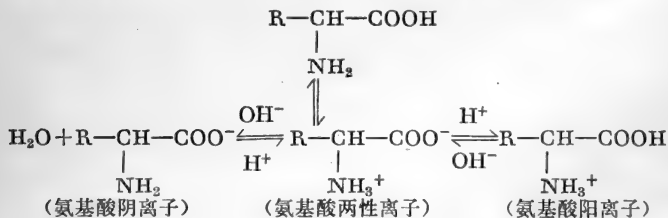


因此，氨基酸属两性化合物，具有酸性和硷性的双重性质，是一种两性电解质，能与酸或硷化合而形成盐。

一般情况下，氨基酸中羧基的解离程度大于氨基，因之氨基酸中的羧基与氨基的数目相等时，其水溶液偏于酸性，即其水溶液中除含有两性离子外，还含有少量的阴离子(-COO⁻)。相反，若氨基酸分子含有二氨基一羧基时，其氨基的电离程度大于羧基的电离，则溶液呈硷性。此时，氨基酸水溶液除含两性离子外，尚含有少量的阳离子(-NH₃⁺)。

在上述两种情况下，如果把氨基酸水溶液的酸硷性加以适当的调节，促使其酸性电离与硷性电离恰好相等，使氨基酸在溶液中呈两性离子存在，氨基酸分子内的正电荷与负电荷相等，即净电荷为零。在电场中因受阴极与阳极的同等吸引力，故既不向阳极移动也不向阴极移动，此时的pH值，称为氨基酸的等电点，以PI值表示。氨基酸在等电点时，由于正负电荷相等，净电荷为零，其分子间容易聚集成大分子而沉淀析出，其溶解度最小。

现把氨基酸在溶液中酸硷调节的离子转变的反应归结为：

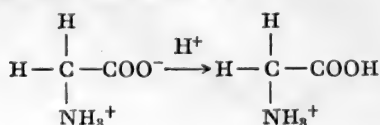


由于各种氨基酸的化学结构不同，其所含的氨基、羧基及其它基团的相对解离程度的不同，同时其解离度也与温度有关。因此，各种氨基酸的等电点 (pI 值) 是不同的。现将各种氨基酸不同基团的解离常数(在 25°C条件下)及等电点列如表 1-3。

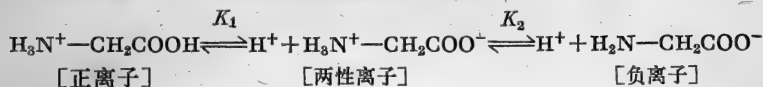
表 1-3 氨基酸不同基团解离常数及等电点 (在 25°C 时)

名 称	pK_1 (-COOH)	pK_2 (-COOH)	pK_2 (-NH ₃ ⁺) 或其它基团	pK_3 (-COOH) 或其它基团	pK_3 (-NH ₃ ⁺) 或其它基团	等电点 (pI 值)
甘氨酸	2.35	—	9.78	—	—	6.06
L-丙氨酸	2.34	—	9.69	—	—	6.00
L-缬氨酸	2.32	—	9.62	—	—	5.96
L-亮氨酸	2.36	—	9.60	—	—	5.98
L-异亮氨酸	2.36	—	9.68	—	—	6.02
L-丝氨酸	1.21	—	9.15	—	—	5.68
L-脯氨酸	1.99	—	10.60	—	—	6.30
L-苯丙氨酸	1.83	—	9.13	—	—	5.48
L-色氨酸	2.38	—	9.39	—	—	5.89
L-蛋氨酸	2.28	—	9.21	—	—	5.74
L-酪氨酸	2.20	—	9.11	10.97 (-OH)	—	5.66
L-半胱氨酸	1.96	—	8.18 (SH)	—	10.28	5.05
L-天冬氨酸	1.88	3.65	—	—	9.60	2.77
L-谷氨酸	2.19	4.25	—	—	9.67	3.22
L-组氨酸	1.82	—	6.00 (咪唑 ⁺)	—	9.17	7.59
L-精氨酸	2.17	—	9.04	—	12.48 (胍基 ⁺)	10.97
L-赖氨酸	2.18	—	8.95	—	10.53	9.74

例如：甘氨酸在结晶状态下是一内盐或两性离子。这种两性离子在酸性水溶液中，则成为正离子。



这种离子可分两个阶段解离出 H^+ 离子:



根据质量作用定律, 其解离作用达到平衡时的数学表示方法为:

$$\text{解离常数 } K_1 = \frac{[\text{两性离子}][H^+]}{[\text{正离子}]} = 4.5 \times 10^{-3}$$

$$K_2 = \frac{[\text{负离子}][H^+]}{[\text{两性离子}]} = 1.6 \times 10^{-10}$$

如果 K_1 乘 K_2 则可得:

$$K_1 \times K_2 = \frac{[\text{两性离子}][\text{负离子}][H^+]^2}{[\text{两性离子}][\text{正离子}]}$$

因在等电点时, $[\text{负离子}] = [\text{正离子}]$

$$\text{故 } K_1 K_2 = [H^+]^2 \text{ 或 } [H^+] = \sqrt{K_1 \cdot K_2}$$

因 $pH = -\log[H^+]$

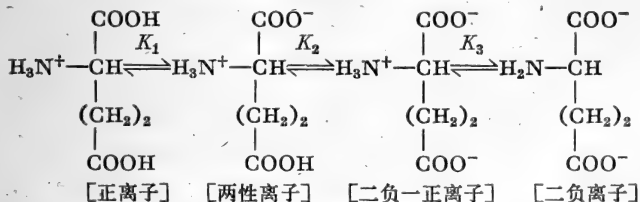
$$\text{等电点时 } pI = -\log[H^+] = \frac{-\log K_1 - \log K_2}{2} = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

$$\text{甘氨酸的 } pK_1 = -\log K_1 = -\log 4.5 \times 10^{-3} = 2.35$$

$$pK_2 = -\log K_2 = -\log 1.6 \times 10^{-10} = 9.78$$

$$\text{因此, 甘氨酸的 } pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{2.35 + 9.78}{2} = 6.06$$

又例如: L-谷氨酸的解离可为三级解离:



当谷氨酸在等电点时, 第三级解离可忽略不计。

$$\text{故谷氨酸 } pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{2.19 + 4.25}{2} = 3.22$$

谷氨酸为一氨基二羧基的氨基酸，其等电点 (pI 值) 主要决定于两个羧基的解离常数 (pK_1 和 pK_2)。

而赖氨酸为二氨基一羧基的氨基酸，其等电点 (pI 值) 主要决定于两个氨基的解离常数，(即 pK_2 和 pK_3)。

$$\text{故赖氨酸 } pI = \frac{pK_2 + pK_3}{2} = \frac{8.95 + 10.53}{2} = 9.74$$

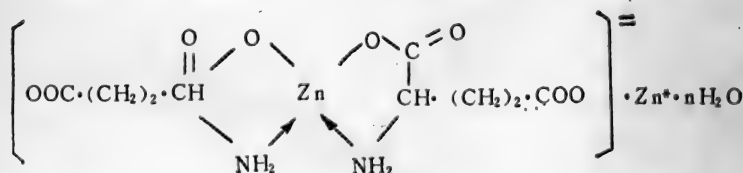
氨基酸的两性电离及等电点的概念，在氨基酸的分离技术上已得到广泛的应用。

由于各种氨基酸的电离程度及等电点不同，因此，在同一 pH 值的溶液中，各种氨基酸所带的电荷不同。例如，当 $pH=6.00$ 时，丙氨酸呈两性离子存在，即为它的等电点，甘氨酸接近两性离子状态，谷氨酸、天冬氨酸以阴离子状态存在，而赖氨酸、精氨酸则以阳离子状态存在。利用这一性质，便可采用离子树脂交换法及电泳法等将这些氨基酸从混合液中分离出来。

又由于氨基酸在等电点时净电荷为零，通过静电引力易迅速结合沉淀析出，故在生产上可作为提取氨基酸的理论依据，如于谷氨酸的等电点 $pH 3.22$ 提取谷氨酸。

2. 与金属离子反应

氨基酸可与一些金属离子反应生成络合物。例如，谷氨酸与 Zn^{++} 、 Ca^{++} 、 Ba^{++} 等离子作用生成难溶于水的络合物。当 pH 为 6.3 时，谷氨酸与 Zn^{++} 生成难溶于水的谷氨酸锌盐络合物。其结构式为：

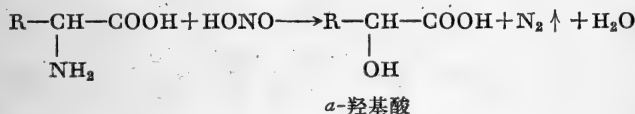


(谷氨酸锌盐络合物)

氨基酸这一性质，也可应用于分离提取某种氨基酸。

3. 与亚硝酸反应

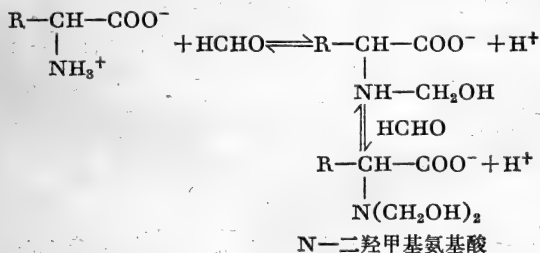
α -氨基酸，除亚氨基酸(脯氨酸、羟脯氨酸)外，均可与亚硝酸作用生成 α -羧酸并放出氮气。



上述反应放出的氮量一半来自氨基酸分子中的氨基。故可用气体分析仪来测定氨基酸的含量。一般常采用范氏定氮法 (Van Slyke) 来测定氨基酸、蛋白质及蛋白质水解产物中自由 α -氨基酸的含量。

4. 与甲醛反应

氨基酸的氨基能与甲醛反应生成羟甲基衍生物，其反应式为：

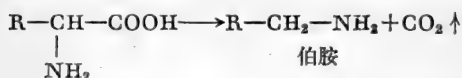


由于氨基酸为两性电解质，当用砵来滴定其羧基时，氨基酸的羧基与氨基的相互作用生成两性离子。这种离子在滴定终点也不完全分解，影响其结果的准确性。但是，采用中性甲醛与氨基酸的氨基化合，先固定其氨基使不致生成两性离子。然后再用砵来滴定氨基酸中的羧基。这种反应是一种可逆反应，需要加过量的甲醛，使氨基酸完全变为 N-二羟甲基氨基酸，才能得到较为准确的结果。Sørensen 氏首先根据这种反应用滴定法测定氨基酸含量。此法也可用来测定蛋白质水解或合成的程度。其精确度稍

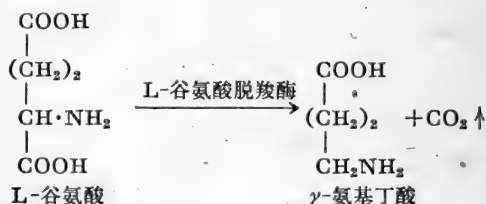
差，但其所用的仪器设备简单，操作简便，也被广泛应用。

5. 脱羧反应

氨基酸经特定的脱羧酶作用，生成伯胺并相应放出 CO_2 气体。



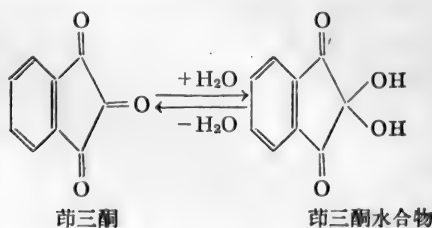
例如：大肠杆菌中含有一种 L-谷氨酸脱羧酶能够专门使 L-谷氨酸进行脱羧反应。

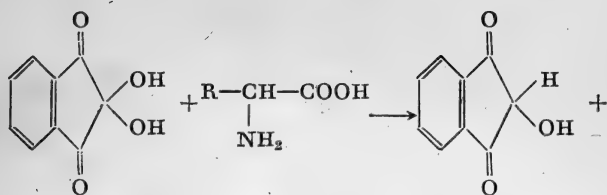


上述反应生成的 CO_2 气体，一般可用气量法进行测定。如采用华勃氏气体分析仪可从其测压计中压力的变化换算成氨基酸的含量，此法已广泛应用于实践中。

6. 与茛三酮的反应

氨基酸与茛三酮的水合物一起加热起氧化脱氨反应，放出的氨与一分子茛三酮及一分子茛三酮还原产物反应生成蓝色化合物。所生成的酮酸则被加热分解放出 CO_2 。反应中蓝色的深度及 CO_2 的量可以作为 α -氨基酸定量分析的依据。凡是含有 α -氨基酰胺化的化合物也能起这种反应。其反应式如下：

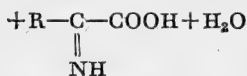




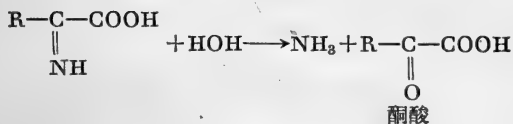
茚三酮水合物

氨基酸

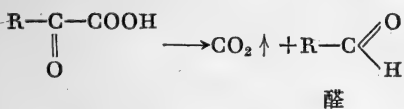
茚三酮还原产物



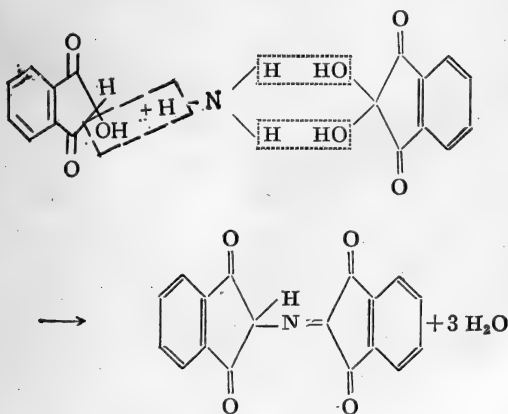
亚氨基酸



酮酸



醛



紫蓝色化合物

氨基酸的茚三酮反应是一个很重要的反应。在研究分析氨基酸方面应用广泛。在纸上层析、电泳法定量定性氨基酸，常用此

反应显色，其灵敏度甚高。

7. 黑色素的形成

氨基酸能与单糖及糖的分解产物(如羟甲基糠醛、糠醛等)在高温条件下缩合形成一类呈黑色的复杂化合物。这类物质称为黑色素。

黑色素的形成反应历程还不清楚。这种物质部分溶于水，具有芳香味道，呈酸性及具有还原性，这一点对协调酿造产品的风味有一定的作用。但是，黑色素是一种不发酵性物质，故黑色素的形成意味着原料的浪费，这种物质的产生对发酵利少弊多。许多食品在制造、干燥及贮存时变黑，也是由于黑色素形成的缘故。

第四节 蛋白质的结构

蛋白质的性质及种种生理活性，决定于蛋白质的特殊结构。因此，对蛋白质结构的研究和认识是十分重要的问题。

根据蛋白质结构的研究进展，蛋白质结构可分为蛋白质基本化学结构(蛋白质一级结构)和蛋白质空间结构(蛋白质二级、三级和四级结构)的理论概念。

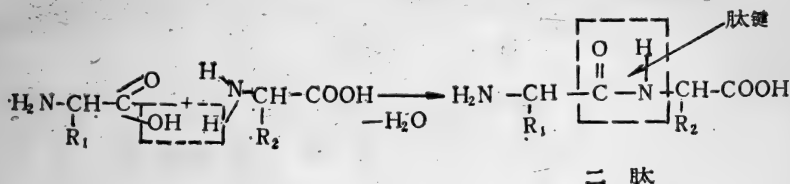
一、蛋白质的基本化学结构

蛋白质的基本化学结构(蛋白质一级结构)主要是指氨基酸在蛋白质分子中的连接方式及氨基酸在多肽链中的排列顺序。

(一) 氨基酸在蛋白质分子中的连接方式——肽键与肽链

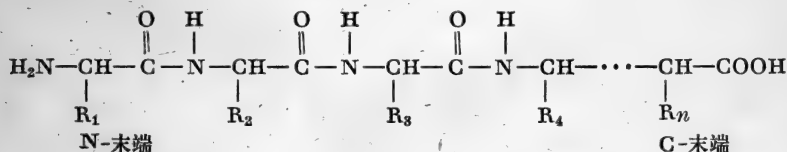
早在一八九一年有人根据蛋白质及其不完全的水解产物的双缩脲反应，提出氨基酸组成蛋白质分子是通过肽键($-\text{CO}-\text{NH}-$)连接方式的假说。一九〇七年费什尔(E. Fischer)氏用人工合成法将 18 个氨基酸分子借肽键连接方式形成了复杂的多肽，从而创立了多肽学说。

肽键($-\text{CO}-\text{NH}-$)是由一个氨基酸的羧基($-\text{COOH}$ 基),与另一个氨基酸的 α -氨基($-\text{NH}_2$ 基)脱水缩合而形成的键。



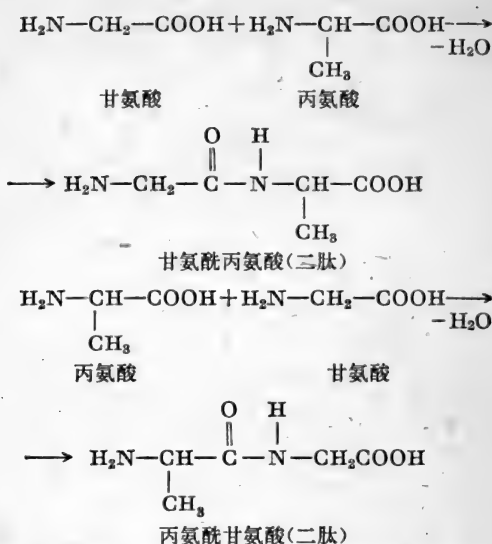
肽键 ($-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-$)又称为酰胺键。

从上式中可知,两个氨基酸缩合而成的二肽两端,仍然分别有一个自由氨基($-\text{NH}_2$)和一个自由的羧基($-\text{COOH}$),它们仍可以同第三个、第四个或更多的氨基酸缩合起来,形成一种链状结构,称为多肽链。

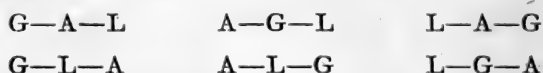


多肽链中的 $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3 \cdots \text{R}_n$ 称为侧链。肽链两端仍遗留有自由氨基和羧基。在一条多肽链中含有自由氨基的一端称为N-末端,而含有自由羧基的一端称为G-末端。

由两种氨基酸通过肽键连结而成的化合物称为二肽。二肽有两种连结方式,而成一对同分异构体,其两者的物理和化学性质互不相同。例如,甘氨酸与丙氨酸连接而成的二肽有两种:甘氨酰丙氨酸和丙氨酰甘氨酸。

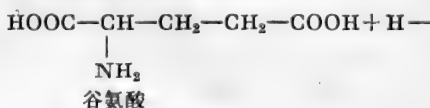


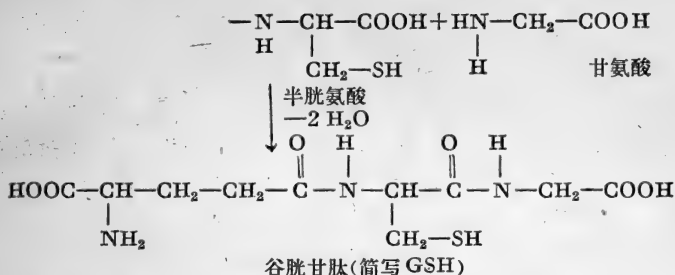
而三种不同氨基酸缩合时，就有六种连结方式，形成六种同分异构体。例如，由甘氨酸(G)、丙氨酸(A)与亮氨酸(L)形成下列六种三肽：



当四种不同的氨基酸缩合时就可得到 24 种不同的四肽，由五种不同氨基酸则可得到 120 种不同的五肽。参加缩合的氨基酸越多，其连结而成的多肽就越多。这也说明二十种氨基酸就可组成多种多样的蛋白质。

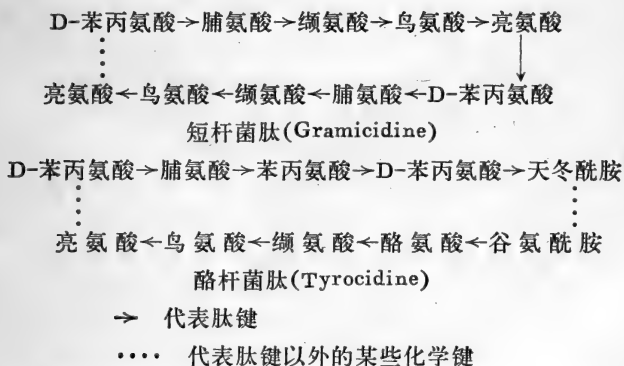
实际上在生物体中也存在一些多肽化合物，在生物体中具有特殊的功能。例如，微生物及一切生物中都存在一种称为谷胱甘肽的三肽，它是由谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸三种不同氨基酸通过肽键(—CO—NH—)缩合而成的。





它是活细胞中的重要组成成分，特别在酵母中含量较高，同时又是某些酶(如磷酸甘油醛脱氢酶)的组成成分，由于它含有活性的巯基(—SH)，极易被氧化，在生物氧化过程中起重要的作用。

氨基酸在蛋白质分子中的连接方式，主要以肽键连结而成多肽链。多数多肽链是直链结构，还有少数环状结构，即开链多肽末端的氨基和羧基，通过肽键作用而形成环状肽。环状结构的多肽在微生物中也有存在。例如短杆菌肽和酪杆菌肽，它们是属于一类环状结构抗菌素。其结构如下：



(二) 氨基酸在蛋白质多肽链中的排列顺序

蛋白质功能的多样性及种族特异性，首先决定于蛋白质多肽链中氨基酸的排列顺序。

氨基酸在多肽链中排列顺序的测定是一个相当精细而又复杂

的工作，一般研究过程大致包括：先将蛋白质或多肽提纯；将蛋白质或多肽用稀酸或稀硷或用蛋白酶水解测定氨基酸的种类、数量；末端分析确定肽链数目；使肽链中不同位置的肽键水解断开成若干小肽并分离提纯；再进行末端分析，测定多肽或小肽的氨基与羧基末端，并使之逐步降解从而测出它们所含为数不多的氨基酸排列顺序；最后根据上述结果进行综合分析，得出蛋白质多肽链中氨基酸的排列顺序。

例如，经分析测定结果，胰岛素被发现为含有两条多肽链（A链和B链），通过两个二硫键相连接。图 1-1 中展示了牛胰岛素的氨基酸组成及其排列顺序。A链由 21 个氨基酸组成，以甘氨酸为 N-末端氨基酸，而以天冬酰胺为 C-末端。此链中的二硫键包含三个半胱氨酸和丙氨酸、丝氨酸及缬氨酸的环状结构；B链由 30 个氨基酸组成，以苯丙氨酸为 N-末端，而以丙氨酸为 C-末端。

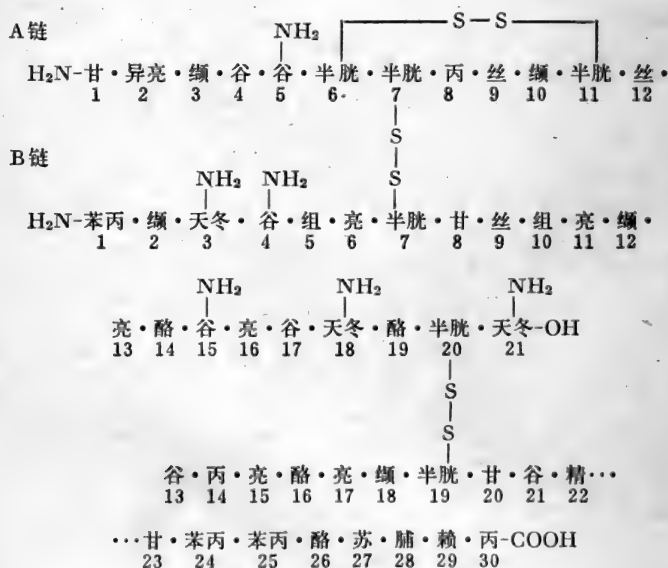


图 1-1 牛胰岛素一级结构

不同来源的蛋白质其一级结构是有差异的，说明蛋白质一级结构与生物的民族特异性有关。不同来源的胰岛素在A链环状结构的氨基酸配置方面与牛胰岛素不同。例如，马胰岛素含苏氨酸、甘氨酸和异亮氨酸，而猪胰岛素含苏氨酸、丝氨酸和异亮氨酸。

近二十年来由于生化分析分离技术的进展，蛋白质一级结构被确定的愈来愈多，至目前为止，已被确定的蛋白质一级结构就有一百多种，为进一步分析确定蛋白质的空间结构打下了基础。

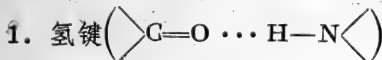
二、蛋白质的空间结构

蛋白质的空间结构(即蛋白质二级、三级和四级结构)，对蛋白质的生理活性很重要。当其空间构象有所损害，蛋白质的构象随即改变或失去其原有的生理活性。

蛋白质空间结构的确定，主要利用X-射线衍射法，形成衍射图象，再经过数学推导和计算，得出蛋白质晶体中原子的分布和分子的空间构象。蛋白质多肽链的卷曲、折迭形成的紧密结构，是由于蛋白质多肽链间各种化学键交互作用的结果。故在具体介绍蛋白质空间结构之前，必须首先了解其有关的各种化学键的性质及其作用。

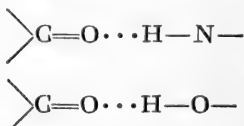
(一) 蛋白质空间结构有关的化学键

蛋白质的空间结构一般是通过非定向的静电引力、范德华(Van der Waals)引力和氢键等形成的。一般这些键的键能比较小，故不大稳定，容易受各种理化因素影响而破坏。有关的化学键主要有以下几种：



氢键主要由肽链上的羰基 $\left(-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \text{<} \end{array} \right)$ 和亚氨基 $\left(-\text{N} \begin{array}{l} \text{H} \\ \text{—} \end{array} \right)$ 之间

通过氢原子被两个负电性较大的原子所吸引而形成的一种键。由于肽链上有许多羰基和亚氨基。因此，蛋白质分子中氢键较多。氢键具有离子的特性，只有电负性较大的原子间才能形成，它需要极化的一OH、—NH—、—NH₂等基团作为供氢体。而电负性较大的原子，如O、N、Cl、F等作为受体。



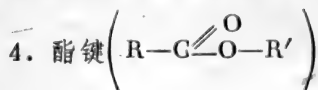
氢键为蛋白质空间结构中最重要副价键。它普遍存在于蛋白质分子中。无论在肽链与肽链间或是一条多肽链卷曲后相邻的基团之间，都可以形成氢键。氢键的键长约2.7 Å，键能较小，约为5.6千卡。故容易受外力影响而破坏。这一点对于蛋白质生理活性有紧密关系。

2. 二硫键(—S—S—)

蛋白质分子中的二硫键，是由两个半胱氨酸分子通过脱氢氧化而结合形成的一种化学键。此键在蛋白质一级结构中是连接不同肽链或同一肽链不同部分的键。它结合得比较牢固，在蛋白质空间结构中则起着稳定肽链空间构型的作用。二硫键一旦遭受破坏，蛋白质的生理活性随即丧失。这种键的数目越多，其蛋白质就越稳定，对抗外界能力就越强。例如，毛、发、鳞、甲壳等之所以比较坚固，其原因之一为其蛋白质中含二硫键较多。

3. 盐键(—NH₃⁺—OOC—)

蛋白质分子中自由的氨基及羧基，在适当的条件下，可以分别以正负离子形式存在，因而形成盐键。盐键的结合力也较为牢固，也为稳定蛋白质空间结构的一个因素，但其在蛋白质分子中一般数量不多，而且容易受酸、硷的作用而破坏。



酯键是由羟基氨基酸分子中的羟基(—OH基)与二羧酸的 β 或 γ -羧基脱水缩合而成的键。酯键在蛋白质分子中不多,水解时可受破坏。

5. 疏水键

蛋白质分子中一些疏水性较强的侧链基团能避开水而互相粘附聚集而成。天然蛋白质分子中一般疏水性较强的基团大部分集中于中心区域,只有少数是暴露在溶液中。疏水键对蛋白质的稳定也起着一定的作用。疏水键与盐键对在溶液中加盐或有机溶剂的反应恰恰相反。非极性溶剂能破坏疏水键,但由于它降低了溶液的解电常数,因而加强了盐键。盐的作用则使疏水键强度增大,这是因为它降低了非极性基团在水中的溶解度。

6. 范德华(Van der Waals)引力

范德华引力是分子间借静电引力而形成的。在蛋白质分子中的非极性基团的偶极与偶极间的相互作用,以及极性基团之间的偶极与诱导偶极的相互作用。(例如, —CH₃ 与 —CH₃ 之间的引力)。此键比一般静电键及共价键的键长约长 3~4 Å,且远比这两种键的键能小。

7. 金属键

许多蛋白质的三、四级结构需要有金属参与维持其构型。这类金属所起的作用,也属于一种化学键的作用。当金属被除去

表 1-4 蛋白质(酶)中的金属键

名 称	分子 量	金属及数目	金属键位置及作用
羧肽酶A	34,300	Zn 1	Zn 与 —SH 相连
羧肽酶B	34,300	Zn 1	Zn 为分子一部分
酵母醇脱氢酶	151,000	Zn 4	维系四个亚基
枯草杆菌 α -淀粉酶	97,000	Zn 1	连结两个亚基
牛肝谷氨酸脱氢酶	1,000,000	Zn 1	连结四个亚基
碳酸酐酶	30,000	Zn 1	与蛋白质紧密相连

时，四级结构也随即破坏，蛋白质则解离为亚基，或者三级结构局部受破坏，其生理活性则减弱或丧失。蛋白质中的金属键的位置与作用如表 1-4 所示。

(二) 蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构是指蛋白质分子的肽链的螺旋卷曲或折迭所成的空间结构。氢键可用来维持 α -螺旋圈之间及肽链折迭成片状结构的稳定性。

根据 X-射线衍射法分析表明，蛋白质的空间构型是遵循严格的键长、键角的规定。纤维状蛋白是最初被研究最多的一种。首先美国的鲍林 (Pauling) 等认为这种蛋白质的肽链呈螺旋卷曲，螺旋每上升一转，升高 5.4 \AA ，其中共包含 3.7 个氨基酸残基。螺旋主要是靠氢键来维持其稳定性。当氢键受到破坏，其紧密的空间就变得松散，肽链就展开，蛋白质随之变性。

天然蛋白质形状可分为两大类：一是纤维状蛋白，一是球状蛋白。在生物体中球状蛋白占绝大多数。近年来由于结构分析技术的进展，认为球状蛋白的肽链既有螺旋结构 (图 1-2) 也有片状结构 (图 1-3)。因此， α -螺旋

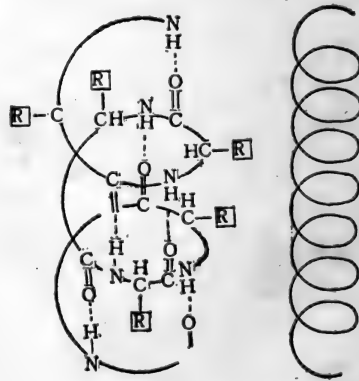


图 1-2 α -螺旋结构

结构及片状结构为蛋白质二级结构的基本构象。

(三) 蛋白质的三级结构

蛋白质的三级结构是在二级结构的基础上进一步弯曲盘绕成更复杂的构型。这种结构主要由盐键、氢键和疏水键来维持的。经过这样的盘绕和弯曲后，蛋白质多肽链虽然很长，由于二、三级结构的存在，蛋白质变为更紧密的空间结构。例如，由 153 个

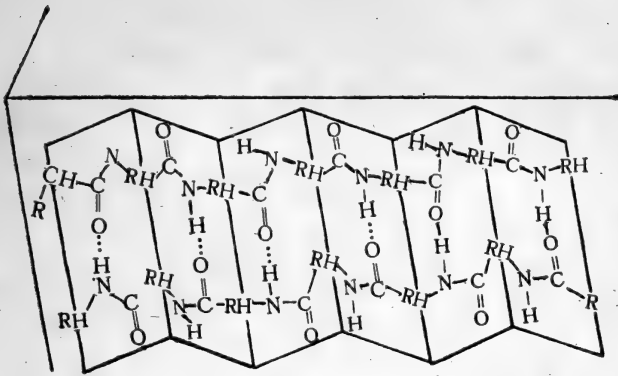


图 1-3 蛋白质片状结构

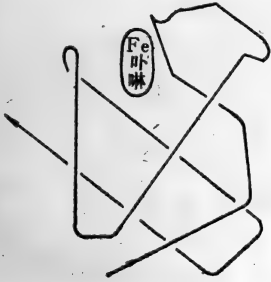


图 1-4 肌红蛋白三级结构

氨基酸组成长肽链的肌红蛋白（见图 1-4），经过八次折迭弯曲，便成为一个球状蛋白。凡具有一条肽链的蛋白质只有三级结构，而无四级结构。

（四）蛋白质的四级结构

蛋白质的四级结构是由几个或数十个以上的亚基形成的。而

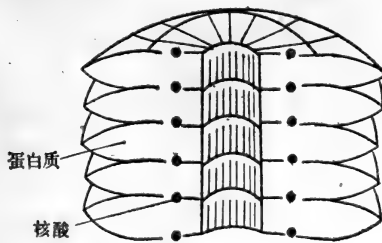


图 1-5 烟草斑纹病毒四级结构

每个亚基又是由一个或数个肽链在一级、二级和三级结构的基础上形成的蛋白质小单位。亚基之间借助于氢键、盐键、疏水键和范德华引力等稳定其结构。

例如，烟草斑纹病毒结晶，分子量为 40,000,000，分子的形态是以蛋白质(含 95%)为外壳、核酸(含 5%)为轴心的螺旋排列的柱状体。分子的大小为 $50\sim 180 \text{ \AA} \times 3000 \text{ \AA}$ ，分子中共有 2300 个相同的蛋白质亚基(见图1-5)，每个亚基的分子量为 18,000，亚基之间以氢键等连结而排列成一个厚壁空心筒。分子中的核酸呈扁圆盘状与轴平行。

蛋白质空间结构的研究，是生化研究领域中的重要课题之一。一九六五年我国在世界科学史上第一次人工合成胰岛素成功，开创了揭开生命奥秘的新一页。后来，采用 X-射线衍射法研究胰岛素的空間结构，又取得了新的成果。目前对蛋白质结构分析的分辨率达到了 1.8 \AA 的先进水平。

第五节 蛋白质的理化性质

一、蛋白质的分子量

蛋白质在溶液中不稳定，易受理化因素的影响而变性。所以通常用来测定分子量的方法如：蒸汽密度法、沸点升高法等均不能适用于蛋白质分子量的测定。就是利用冰点下降法测定蛋白质分子量也是不准确的，因为，蛋白质分子量很大，即使百分浓度很高的蛋白质溶液，其冰点下降的数值也很小。同时，在蛋白质制品中很难免夹杂有微量的盐类，这会影响其测定的准确性。比较适用于测定蛋白质分子量的方法，主要有下列几种，现将其测定的原理分别阐明如下：

(一) 超离心沉降速度法的原理

蛋白质溶液是一种胶体溶液，其胶体粒子在溶液中能产生不规则的扩散，这种运动称为布朗运动。但是，在重力作用下，胶体粒子下沉，这种现象则称为沉降。扩散与沉降是两个相反的作用。当两者的速度相等时，即达到沉降平衡。胶体粒子的大小与沉降速度成反比，胶体粒子愈小，达到平衡所需时间就愈长。为

了加速达到沉降平衡，则须施以远远超过重力加速度的离心力，才可达到目的。超离心沉降速度法就是根据这种作用原理。采用超速离心机以每分钟 60000~80000 转的速度旋转，产生强大的离心力。由于蛋白质分子的密度大于溶液的密度，蛋白质在溶液中的颗粒就离开旋转轴方向而大大地加速其沉降。因此，测得了蛋白质的沉降速度和它的扩散常数，就可以用下式推算出蛋白质的分子量：

$$M = \frac{RT}{D(1-v\rho)} \cdot \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

式中 M ——蛋白质的分子量

T ——绝对温度

R ——气体常数(0.082 升·大气压/度)

dx/dt ——沉降速度(厘米/秒)

ω ——角速度(弧度/秒)

x ——离心机机轴至蛋白质微粒间的距离(厘米)

D ——扩散系数($D = \frac{RT}{6\pi\gamma\eta N}$)

η ——粘度(以厘米²/秒表示)

v ——蛋白质的微分比容(即蛋白质密度的倒数或一克蛋白质的体积)

ρ ——蛋白质溶液中溶剂的密度

上式可简化为：

$$M = \frac{RTS}{D(1-v\rho)}$$

其中

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

S 表示一个单位的离心场中的沉降速度，称为蛋白质的沉降常数。其量度单位以秒计。 1×10^{-13} 秒为一个 Svedbeg 单位(S)，一般蛋白质的 Svedberg 单位为 1~200 S 。因此，可用 S 值来表示蛋白质分子的大小 S 越大，分子量越大； S 越小，分子量越小。所以，也同样可用 S 值表示其它生物高分子的大小。

(二) 渗透压法的测定原理

当溶液与纯溶剂用理想的半透膜隔开时，为了使纯溶剂不渗入溶液，而必须在溶液面上加压力，此压力称为该溶液的渗透压。例如，人工制造的亚铁氰化铜半透膜具有良好的半渗透性的性能。由于蛋白质分子量大，不能通过半透膜。而水及小分子物质、离子等则可以通过半透膜。因而，可把蛋白质溶液装在半透膜袋中，使袋外溶剂向袋内移动，袋内液柱逐渐升高，直至液柱压与蛋白质的渗透压恰相等时，此溶剂分子进出半透膜的扩散速度达到动态平衡的静水压，其袋内外液柱之差（以 h 表示）即为蛋白质的渗透压。

由于稀溶液的性质接近理想气体，故可用下式计算蛋白质的分子量：

$$PV = nRT = \frac{g}{M}RT$$

或

$$M = \frac{gRT}{PV}$$

式中

g ——蛋白质克数

P ——测定的渗透压（以大气压表示）

V ——含 g 克蛋白质溶液的体积（以升表示）

T ——绝对温度（ $t^{\circ}\text{C} + 273$ ）

R ——气体常数（0.082 升·大气压/克分子/度）

表 1-5 蛋白质的分子量

名 称	超离心沉降法	渗透压法
核糖核酸酶	14,000	15,000
卵清蛋白	40,000	40,000~46,000
胃蛋白酶	35,000	36,000
γ -球蛋白	180,000	177,000
血红蛋白	68,000	67,000
血清蛋白	69,000	69,000

以上两法所测得蛋白质分子量比较接近, 见表 1-5。

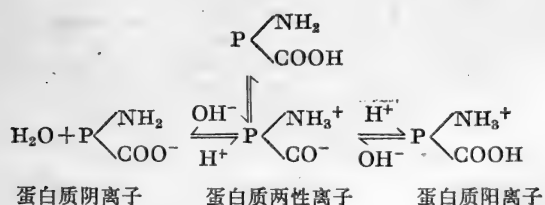
(三) 凝胶电泳法测定原理

此法是新近采用的方法。它是用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在十二烷基磺酸钠参与下进行测定的。故称为 SDS-凝胶电泳法, 此法也可应用于分离提纯蛋白质。

SDS 是一种阴离子去污剂, 它在一定条件下可与蛋白质分子结合而形成带阴离子的 SDS-蛋白质复合物, 在电场作用下, 该复合物向阳极移动。其移动的速率及距离与蛋白质分子量的大小有关。据此, 就可用已知分子量的蛋白质的对数对其在 SDS-凝胶电泳中的泳动率作图, 得到一直线关系, 称为标准曲线。然后在同样条件下, 测定未知蛋白质分子量的泳动率, 即可从标准曲线中对照而求出蛋白质的分子量。此法重复性好, 操作简便, 且准确性高。

二、蛋白质的两性解离及等电点

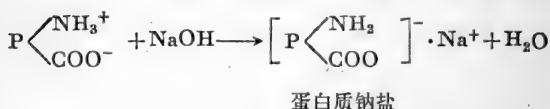
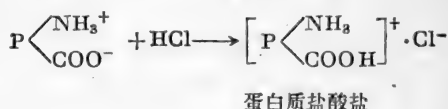
氨基酸具有两性解离及等电点, 蛋白质也具有这种性质。由于蛋白质所含氨基酸的种类和数目众多, 并且尚有许多侧链上各种基团的离解 (例如, ϵ -NH₂、 γ -COOH、 β -COOH、酚基、咪唑基及胍基等基团), 因而, 其解离情况比较复杂。尽管如此, 蛋白质总的解离和等电点性质仍可按下式表示:



(注: P——蛋白质)

从上式可知, 蛋白质也是一种两性电解质, 同样能按化学规

律与定量的酸或硷化合物成盐。其成盐反应为：



也就是说，在酸性环境中，蛋白质分子各基团离解的结果，其正电荷数比负电荷数多，使整个蛋白质分子带上正电荷。若改变溶液的 pH 值，使之由小到大或由大到小，蛋白质分子上的电荷便产生一个量变到质变的变化，即由带正电荷变为带负电荷或由带负电荷变为带正电荷。在这个电荷随 pH 值变化而变化的过程中，总能控制到某一 pH 值，使蛋白质分子上的正负电荷相等，净电荷为零，整个蛋白质分子呈两性离子存在，在电场中既不向阳极移动，也不向阴极移动。此时的 pH 值，称为蛋白质的等电点（以 pI 表示）。

一般溶于水的大多数蛋白质，其羧基的离解程度大于氨基的离解。为使其两者的离解程度相等，达到其等电点状态，就必须增加溶液中的氢离子浓度，以抑制蛋白质分子中羧基的离解。所以，此类蛋白质的等电点一般是偏于酸性。相反，当蛋白质分子中氨基的离解程度大于羧基的离解，其等电点则偏于硷性。

当蛋白质溶液处于等电点时，其溶解度、粘度、渗透压、膨胀性及导电能力均降为最低值。

蛋白质分子中由于所含氨基酸种类、数目、空间构型以及所含其它离解基团的不同，故不同蛋白质就有不同的等电点（见表 1-6）。根据这一性质，各种蛋白质在同一 pH 值的溶液中，具有不同的带电性，其在电场中的移动的方向、速度就各有差别。因而，可用电泳法把蛋白质从混合液中分离出来。

表 1-6

几种蛋白质的等电点

名 称	等电点 (pI 值)	名 称	等电点 (pI 值)
α -干酪素	4.10	核糖核酸酶	9.43
β -干酪素	4.50	麦胶蛋白	6.50
γ -干酪素	5.90	血红蛋白	6.75
细胞色素丙	10.60	胃蛋白酶	2.50
胰岛素	5.35	丝蛋白	2.20
卵清蛋白	4.75	溶菌酶	11.86

三、蛋白质的胶体性质

蛋白溶液是一种胶体溶液。蛋白质颗粒直径在 $10\sim 1000\text{ \AA}$ 之间，它分散在溶液中与普通胶体质点一样具有布朗运动、丁道尔现象、电泳，不能透过半透膜及具有吸附能力等胶体溶液的特性。

蛋白质溶液是一种亲水胶体(或称乳胶)，这种胶体溶液的形成，主要有如下两个原因，促使其胶体质点在溶液中的稳定性：

(一) 蛋白质的水化作用

蛋白质分子中的多肽链上含有多种极性基团(如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CONH}-$ 等)，它们具有亲水性质，故称为亲水基。它们和水接触时能起水化作用，吸聚着水分子，使蛋白质颗粒被水化层(或称水化膜)所包围，使各个颗粒彼此分离开来，从而增强蛋白质溶液的稳定性，阻止蛋白质颗粒从溶液中沉淀析出。

(二) 电荷作用

蛋白质是两性离子，在酸性溶液中颗粒带正电荷，在硷性溶液中颗粒则带负电荷。在一定的 pH 值的溶液中，蛋白质颗粒带有相同的电荷。由于同性电荷互相排斥，也使蛋白质颗粒互相隔开而不会粘在一起。这就增强蛋白质溶液的稳定性。

亲水胶体(或乳胶)还具有一种特性,即在某些条件下,它可以由溶胶状态变为凝胶。

凝胶是不对称胶体颗粒的特性,即在颗粒周围由水分子所构成的水膜是不均匀的,有的部分水化作用强一些,而有的部分则水化作用弱一些。颗粒结构的不对称性就使得它们彼此以一定部位结合。这样,原来在水分子中自由来往的颗粒,就彼此连结起来成为长链。这些长链又彼此结合成为复杂的网状结构,在网眼中水分子被牢固地保持着,并且失去其活动性。在凝胶里面具有两种不同形态的水:一种是化合态的水,它被蛋白质胶体粒子吸牵着;另一种是游离态水,存在于胶体粒子之间的毛细管空间。

因此,溶胶是一种蛋白质颗粒分散在水中所形成的胶体,而凝胶可以看成水分散在蛋白质颗粒之中所形成的胶体。

干燥过的凝胶,置于水中能吸收大量的水分,同时其体积增大,变成柔软具有弹性的胶块,这种作用称为膨胀,同时产生很大的压力。温度升高时,胶粒间的结合力便降低而彼此分离。为了有利于蛋白质生理活性的保存,往往采用冰冻干燥的方法,使蛋白质外层水膜和蛋白质颗粒之间的自由水,在低温下结成冰,然后在高真空下升华除去水分而达到干燥保存的目的。

四、蛋白质的沉淀作用

前面已提及,蛋白质胶体溶液的稳定性主要是由于蛋白质的水化作用和在一定 pH 条件下所带的同性电荷的作用。如果利用外界条件设法破坏这两种因素,蛋白质就失去其稳定性而凝聚并沉淀析出,这种作用称为蛋白质沉淀作用。

酒精、丙酮等有机溶剂,其亲水性大于蛋白质分子,它们可与大量水分子相缔合,使蛋白质颗粒表面的水分子层(或水化膜)逐渐消失,这些物质称为脱水剂。当脱水剂破坏了水化膜后,蛋白质颗粒处于不规则的扩散过程中,颗粒之间互相碰撞,在分子的亲和力(内聚力)的影响下,聚合形成大颗粒,溶液先发生浑浊,

然后出现絮状，进而沉淀析出。

若蛋白质溶液加入电解质或调整溶液的 pH 值至该蛋白质的等电点，蛋白质颗粒就失去电荷。但因颗粒表面仍有水膜的保护作用，仍不能形成沉淀，如果此时加入脱水剂除去水化膜，则颗粒便凝聚而沉淀析出。若先加入脱水剂然后中和其电荷，也同样使蛋白质沉淀析出。

从蛋白质的溶胶状态（即乳胶）直至沉淀析出所经历程如图 1-6 所示。

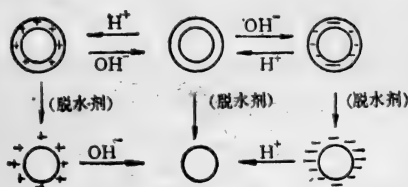
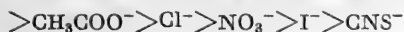
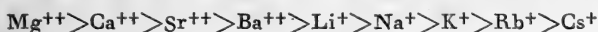


图 1-6 蛋白质沉淀作用示意图

蛋白质的沉淀作用，实际上就包括了蛋白质的盐析作用和脱水作用。

在蛋白质溶液中加入大量电解质，如硫酸铵、硫酸钠和氯化钠等硷金属中性盐，用相反离子中和了蛋白质的电荷及破坏其水化膜，使蛋白质沉淀析出，这种电解质盐类使蛋白质沉淀析出的作用，称为盐析作用。

不同种类的离子对蛋白质有不同的盐析能力，按这种能力强弱所排列的顺序称为感胶离子序。其感胶离子序的排列如下：

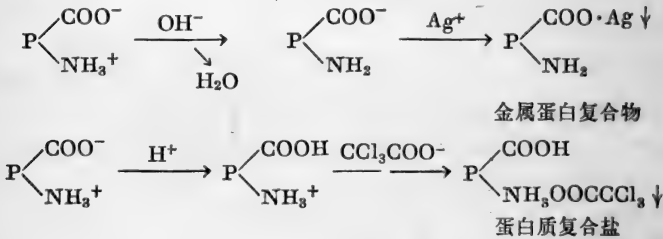


不同蛋白质盐析出所需盐类浓度是不同的。因此，可用不同浓度的盐溶液使不同蛋白质分段沉淀析出而加以分离，这种作用称为分段盐析。这一作用在实践中得到广泛的应用。例如，微生

物发酵生产酶制剂就是采用盐析作用原理，从发酵液中分离提取出来的。盐析作用是一种可逆过程，在一定条件下可以重新溶解并恢复原来的生理活性。因此，盐析方法在生化分离技术上应用较广泛。

在蛋白质等电点时加入酒精或丙酮等脱水剂也可使蛋白质沉淀析出。这种作用生成的沉淀在短时间内也是可逆的。若放置时间太长则成为不可逆的沉淀。

另外，重金属盐类(如 Ca^{++} 、 Hg^{++} 、 Pb^{++} 、 Ag^+ 、 Fe^{+++} 等所成盐类)和生物硷试剂(如苦味酸、鞣酸、三氯乙酸、黄血盐、磷钨酸、磷钼酸等)均为蛋白质的沉淀剂。前者是在硷性溶液中，与蛋白质结合成不溶性的重金属-蛋白质复合物而沉淀析出。后者则在酸性溶液中与蛋白质结合，生成蛋白盐复合物而沉淀析出。其反应式如下：



五、蛋白质的变性作用

天然蛋白质分子都有紧密的特殊空间结构，决定其具有特殊生理功能与活性。如果，蛋白质受到外界各种因素的作用，使其构成空间结构的氢键等副价键受到破坏，蛋白质的二级、三级结构破坏，天然蛋白质的空间构型解体，有秩序的螺旋构型、球状构型变为无秩序的伸展肽链，使天然蛋白质的理化性质改变并失去原来的生理和生理活性，这种作用称为蛋白质的变性作用。换言之，蛋白质的变性作用是外界条件作用于蛋白质分子，使其内部构型发生改变的结果。而其分子组成及分子量并没有改变。

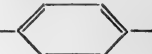
(一) 蛋白质变性的外界因素

1. 物理因素

如加热、紫外线、超声波、强烈的搅拌振荡及各种放射线(如X-射线、 γ -射线、电磁波、快中子等)均能引起蛋白质变性。这些物理因素均具有较高能量,一方面促使蛋白质分子的剧烈运动,分子间互相碰撞,破坏了氢键;另一方面,这些能量也足以破坏其构型中的氢键或其它副价键,从而引起蛋白质空间构型的改变而变性。

2. 化学因素

如重金属盐、浓酸浓硷、及醇、酚、醛、酮、醌和脲等化学试剂。

重金属盐能与蛋白质侧链上的—SH、—COOH、—

—OH等基团作用,生成难溶于水的蛋白质盐,破坏了蛋白质的空间构型而变性。

强酸、强硷的作用主要是破坏蛋白质中的盐键和酯键等副价键,使蛋白质二级、三级结构受到破坏而变性。

脲是一种常用的蛋白质变性剂,它具有特别高的解电常数而能破坏氢键等副价键而引起蛋白质二级、三级结构的改变而变性。其他化学试剂在不同程度上也起类似的作用。

(二) 变性后蛋白质的特性

蛋白质变性后,往往发生一系列物理、化学和生物学功能及生理活性的改变。

1. 物理性质的改变

蛋白质变性后失去了天然蛋白质的结晶能力;由于氢键等副价键破坏,蛋白质空间构型解体,原来卷曲在球状体内部的疏水基团暴露在表面,破坏了水化膜,从而导致溶解度降低;由于蛋白质空间构型变为紊乱而又散漫的状态,使分子摩擦力增大而增加蛋白质的粘度。同时,使分子的扩散系数降低。

2. 化学性质的改变

蛋白质变性后，有些蛋白质分子的侧链基团，如巯基、咪唑基、酚基和羟基等暴露出来。故它们与相应的试剂起反应，测定这些基团的暴露程度，可以判断蛋白质的变性程度。变性后的蛋白质更易为蛋白酶所水解，而易于被消化。

3. 生物学功能及生理活性的改变

生理功能及活性的减弱或丧失，这是变性蛋白的主要特征。例如，具有催化功能的酶，酶蛋白变性后，则失去其催化活性。因为酶催化某种化学反应时，必须具有由许多基团构成一定位置和方向的活性中心，蛋白质变性后，其空间构型解体，活性中心各基团相互分散，互不相关，活性中心解体而失去原来的催化活性。其它生理功能同样要求一定的空间构型，空间构型体；当蛋白质变性后同样其生理活性也随之丧失。如血红蛋白失去载送氧的功能，抗体蛋白失去免疫能力；激素蛋白失去调节代谢功能以及病毒蛋白失去致病能力等等。

蛋白质变性作用的理论，无论在理论上和实践上均具有重要意义。我国生化学者吴宪于一九三一年首先提出这个理论概念，而且经过几十年的研究证明，吴宪所阐明的蛋白质变性作用机制基本上是正确的。当然，还有许多理论性问题有待于进一步研究解决。

蛋白质变性作用的应用是多方面的，它不仅在工、农、医有着广泛的应用，而且在理论上对于阐明蛋白质结构与功能关系等问题具有重要的意义。

在发酵工业生产及研究工作中经常要牵涉到蛋白质这一活性物质。在工艺操作及分析分离工作中均必须选择适当的方法、条件，根据生产的工艺要求，有时必须设法防止其变性，有利于保持其原来的生理活性，有时设法促使其变性。例如发酵生产酶制剂，就必须尽量设法使微生物合成更多的酶并在提取、干燥、保藏等工艺条件必须有利于保持其催化活性在操作过程中注意保持低温，避免强酸、强碱、重金属盐类及防止振荡等条件。相反，

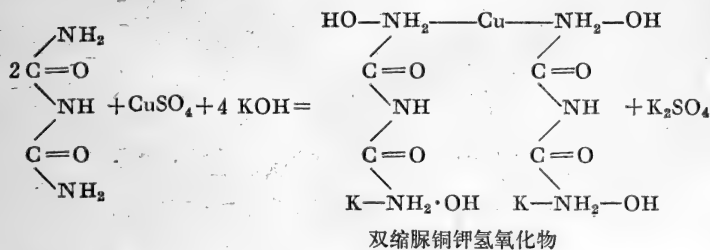
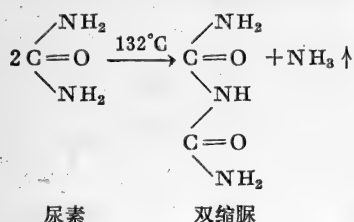
而采用高温消毒的方法，其本质也是使杂菌的菌体蛋白变性失活，致死杂菌而达到灭菌的目的。

六、蛋白质的呈色反应

蛋白质分子中含有肽键，因此可呈双缩脲反应。此外，由于组成蛋白质的氨基酸有某种基团，也可以与许多化合物反应而呈现各种颜色。其主要的呈色反应有下列几种：

(一) 双缩脲反应

将尿素(NH_2CONH_2)加热至 132°C ，则两分子尿素缩合生成双缩脲并放出一分子氨。在硷性溶液中双缩脲与硫酸铜结合生成粉红色复合物，这一呈色反应称为双缩脲反应。其反应式为：



蛋白质分子中含有许多肽键 ($-\text{CONH}-$)，故可呈此反应。肽键比较多时呈紫色，肽键较少时呈红色，二肽则不呈色。故可利用此反应的颜色变化以观察蛋白质的水解程度。凡含有两个以上肽键的其他化合物，如草酰二胺 ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$)、丙二酰胺 ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$) 等也能呈此反应。

(二) 黄蛋白反应

蛋白质在浓硝酸溶液中会产生黄色反应，中和后转变为橙色。这是因为硝酸与蛋白质分子中所含的苯环氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸及色氨酸等)起硝化作用而生成的硝基化合物。

(三) 米伦(Millon)反应

蛋白质溶液中加入米伦试剂(由硝酸汞、硝酸亚汞和亚硝酸配制而成)，经加热起反应生成砖红色的沉淀。这是由于蛋白质中含有酚基的酪氨酸在酸性条件下与汞作用生成的呈色反应。一般蛋白质中皆含有酪氨酸，故均能呈此反应。

(四) 乙醛酸反应

蛋白质溶液中加入乙醛酸，经混合后，缓慢地加入浓硫酸，硫酸沉在底部，液体分为两层，在两层界面处出现红色、绿色或紫色环，摇动后则全部混合为紫色。这是蛋白质中的色氨酸与乙醛酸缩合的呈色反应。

第六节 蛋白质的分类

蛋白质结构较为复杂，蛋白质的分类目前还不能按其化学结构而分类。一般按其组成和性质分类。通常把它分为单纯蛋白质和结合蛋白质两大类，大类又分为亚类和次亚类。

一、单纯蛋白质

当蛋白质水解时，一般是指其水解产物仅为氨基酸者称为单纯蛋白质。单纯蛋白质按其在水中或其它溶剂中的溶解度、沉淀所需盐类的浓度、分子大小及来源等的不同，又可分为：清蛋白类、球蛋白类、谷蛋白类、醇溶谷蛋白类、精蛋白类和硬蛋白类等七种。

(一) 清蛋白类

此类蛋白质溶于水，加热凝固，为强硷、金属盐类或有机溶

剂所沉淀，能被饱和硫酸铵所盐析，其等电点(pI)一般为4.5~5.5。

(二) 球蛋白类

此类蛋白质不溶于水，溶于中性稀盐溶液，加热凝固，为有机溶剂所沉淀。添加硫酸铵至半饱和状态时则沉淀析出，其等电点(pI)为5.5~6.5。

清蛋白类与球蛋白类的溶解度比较，见表1-7。

表 1-7 清蛋白类与球蛋白类溶解度的比较

溶 剂 名 称	清 蛋 白 类	球 蛋 白 类
蒸馏水	溶 解	不 溶
稀盐溶液 (NaCl)	溶 解	溶 解
Na ₂ SO ₄ 饱和溶液	溶 解	不 溶
(NH ₄) ₂ SO ₄ 半饱和溶液	溶 解	不 溶
(NH ₄) ₂ SO ₄ 饱和溶液	不 溶 解	不 溶

在化学成分上，清蛋白类与球蛋白类也有区别。清蛋白类所含的甘氨酸极少，而球蛋白类则含甘氨酸较多。

(三) 谷蛋白类

此类蛋白质不溶于水及中性盐溶液，溶于稀酸及稀硷溶液，加热凝固。

谷蛋白类不是均一的蛋白质，它们是多种相似蛋白质的混合物。

(四) 醇溶谷蛋白类

此类蛋白质不溶于水及中性盐溶液，可溶于酸及硷，并可溶于乙醇溶液(60~80%)中，加热凝固。

醇溶谷蛋白含较多的脯氨酸，其水解时生成脯氨酸，其次还生成多量的谷氨酸。此类蛋白质多存于大麦、玉米的麦胶蛋白及

玉米胶蛋白中。

(五) 精蛋白类

此类蛋白质溶于水、稀酸或稀硷。但加氨则沉淀，加热不凝固，并为乙醇所沉淀。其等电点(pI)为12.0~12.4。

精蛋白类为最简单的蛋白质，仅约含八种氨基酸，主要为精氨酸，其次为赖氨酸及组氨酸。此类蛋白质多存在于卵子、精子及脾中，是细胞核的构成成分之一。

(六) 组蛋白类

此类蛋白质溶于水和稀酸，虽可溶于氢氧化钠，但加氨则沉淀析出，加热凝固，凝固后又可迅速溶于稀酸或稀硷。属于此类蛋白质的主要为动物组织中的蛋白质。

(七) 硬蛋白类

此类蛋白质完全不溶于水、稀的酸、硷和盐溶液。

二、结合蛋白质

结合蛋白质是由一个蛋白质分子与一个或多个非蛋白质分子结合而成的物质，其非蛋白质部分称为辅基。

蛋白质部分与辅基的结合力因蛋白质类型而异，这些结合力有下列几种：

(1) 离子基团间的结合力，即带正电的离子基团与带负电的离子基团借静电力彼此相吸引而结合。蛋白质与有机或无机离子的结合键属于此类。

(2) 非离子的极性基之间的结合力，如氢键、羟基、巯基、氨基等的结合键。它的生成也是依靠静电的吸引力。蛋白质与糖分子结合生成的化合物属于此类。

(3) 非极性基之间的结合力。这种结合力比上述两种结合力为弱。蛋白质与磷脂的结合属于此类。

结合蛋白质按其辅基的不同可分为下列五类：

(一) 色蛋白类

由单纯蛋白质与色素结合而成。此类蛋白质中以具有铁卟啉为辅基者为最重要。如生物体中的氧化还原酶(细胞色素氧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶等)属于此类。

(二) 脂蛋白类

此类蛋白质是由蛋白质与酯类结合而成的化合物。通常此类不溶于醚、苯或氯仿等溶剂。脂蛋白类是细胞膜的重要成分,它同细胞膜的半透性有关。

(三) 糖蛋白类

此类蛋白质是由蛋白质与含有糖苷基的物质结合而成的化合物。糖蛋白类和脂蛋白类存在于细菌的荚膜,胞膜及原浆的外层结构与细菌的抗原构造及半透性均有关系。

糖蛋白水解时,其水解产物除氨基酸外,尚有糖基部分的水解产物,主要有葡萄糖胺、氨基半乳糖胺、半乳糖、岩藻糖、甘露糖等。但这些物质不是同时都存在于各种糖蛋白的含糖辅基中。多数糖蛋白的含糖辅基,一般为粘多糖。

(四) 磷蛋白类

此类蛋白质是由蛋白质与磷酸结合而成的化合物。磷蛋白水解时,其产物除氨基酸外,尚可得到不同量的磷酸。磷蛋白在等电点时不溶于水,但溶于硷中,将硷溶液酸化时,磷蛋白又重新析出沉淀。

(五) 核蛋白类

此类蛋白质是由蛋白质与核酸结合而成的化合物。它在细菌和霉菌中含量很高,约占总蛋白质质量的三分之一到二分之一。是细胞核和原生质的重要组成成分。

核蛋白在不完全水解时,可将蛋白质解离出来,剩下核酸。当它完全水解时;除产生氨基酸外,尚有核酸的水解产物(磷酸、核糖、嘌呤或嘧啶硷)。

复 习 题

1. 生命的本质是什么？
2. 蛋白质有哪些生物学功能？
3. 组成蛋白质的基本单位是什么？其结构的特点如何？
4. 写出下列氨基酸的分子结构式并用系统命名法进行命名：
丙氨酸、谷氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、色氨酸、
苏氨酸、异亮氨酸。
5. 什么叫做氨基酸的等电点？它有何实际意义？试计算组氨酸的等电点。已知组氨酸的 $pK_1(-COOH)=1.82$ 、 pK_2 (咪唑基) $=6.00$ 、 $pK_3(-NH_3^+)=9.17$ 。
6. 氨基酸在蛋白质多肽链中的连接方式是什么？
7. 试述蛋白质结构（一、二、三、四级结构）的基本概念。
8. 何谓蛋白质的变性作用？简述各种变性因素引起变性作用的机制？

第二章 酶

第一节 概 述

生命的基本特征之一是新陈代谢。一切生物体经常不断地进行着一连串复杂的化学变化，这些变化是在温和条件下，在酶的催化作用下迅速地进行的。酶是生物体内产生的一类具催化作用的物质，能加快化学反应速度，并使反应以一定的顺序转换。由于酶由生物体产生，所以也称生物催化剂。

酶的催化反应在有史以前，就被人类所利用。如用于发酵制酒、造醋、制饴等。这些实际应用，在酶学史上占有很重要的位置。酶这个词，按我国“五音集韵”称，酶“酒母”也，又“会韵”载，酶“通作媒”，即与酒精发酵有关的催化作用。但现在酶这一词已用来泛指生物催化剂。

任何活细胞都能产生各种各样的酶，生物体中的化学反应，几乎都在酶的催化下进行的，因此可认为没有酶便没有生命。

人们根据对生命活动规律的认识，发现离体的酶同样起着高效率的催化作用，这对酶的生产 and 应用有着重要的意义。近代酶制剂工业的兴起就是为了适应离体酶在工农业、医学上的广泛应用。酶制剂是利用生物体合成的酶，通过各种理化方法分离提取的酶制品。近年来，采用微生物发酵生产酶制剂发展迅速，已成为发酵工业的一个分枝，称酶制剂工业。

第二节 酶的化学本质与组成

一、酶的化学本质

关于酶的化学本质，学者们曾有过热烈的争论。但随着结晶纯化的酶愈来愈多，从对一百多种结晶酶的分析，特别是对结晶脲酶(1926年)的研究，都证明酶的化学本质是蛋白质。如酶可被水解蛋白质的蛋白酶所水解；加热处理时，酶也失去催化活性；其他理化因素对酶的影响与蛋白质完全一样，凡能使蛋白质变性或沉淀的理化因素均能使酶变性或沉淀。在其他理化性质方面，如溶解性、两性解离性等方面，酶都与蛋白质相同。

二、酶的组成

蛋白质按其组成可分为单纯蛋白质和结合蛋白质两大类。而酶也可按其组成相应地分为单成分酶和双成分酶。单成分酶一般是仅由蛋白质分子组成，双成分酶的组成除蛋白质部分(称酶蛋白)外，尚有非蛋白质部分(称辅酶或辅基)。在双成分酶中，此两部分缺一不可，缺了就会丧失催化活性。双成分酶又称为全酶，其组成可表示如下：

$$\text{双成分酶} = \text{酶蛋白} + \text{辅酶(或辅基)} \\ \text{(或全酶)}$$

在双成分酶中，如酶蛋白与非蛋白质部分结合得比较牢固，不易用透析方法把它们分离的、这种非蛋白质部分称辅基，如果容易用透析方法把它们分开，这种非蛋白质部分称辅酶，辅酶能与不同的酶蛋白结合，形成不同的酶，这些酶能催化同一类型的化学反应，但它们所能作用的底物是不相同的。例如，乙醇脱氢酶与乳酸脱氢酶的辅酶均为NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)，与酶蛋白结合后均能催化脱氢反应，但前者只能催化乙醇脱氢，而后者只能催化乳酸脱氢。

三、几种重要的辅酶或辅基

双成分酶中的辅酶或辅基一般是由较小分子的有机化合物组成，或是由简单的金属离子构成。它们在整个酶的催化作用过程中担负着传递电子、原子或其它化学基团的功能。现将几种重要的辅酶或辅基分述如下：

(一) 铁卟啉

铁卟啉是一些氧化酶(如细胞色素氧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶等)的辅基。它通过主价及副价与酶蛋白牢固地结合。经对酵母菌细胞色素 C 的辅基结构研究表明，其铁原子与蛋白质的一段肽链上的组氨酸相连接，卟啉环则与该肽链上的两个半胱氨酸相连接，如图 2-1 所示。氧化酶的铁卟啉的功能在于靠铁的价电子的变化($Fe^{++} \rightleftharpoons Fe^{+++} + e$)来传递电子，催化氧化还原反应。

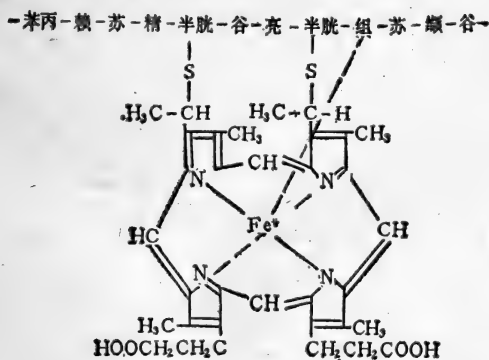


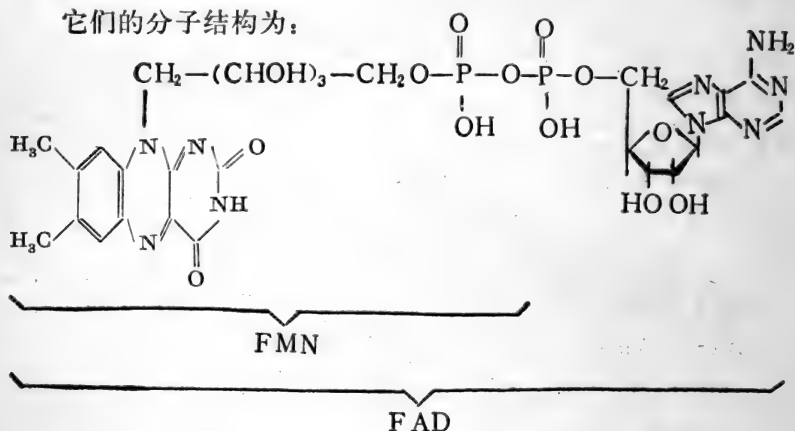
图 2-1 酵母菌细胞色素 C 的铁卟啉与酶蛋白的连接方式

(二) 黄素核苷酸(FMN 和 FAD 等)

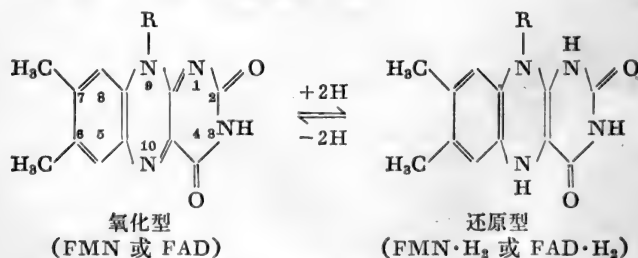
黄素核苷酸为维生素 B₂(核黄素)的衍生物，为黄素酶类(如氨基酸氧化酶，琥珀酸脱氢酶等)的辅基。黄素单核苷酸(FMN)及黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的氧化型均呈黄色并有黄绿色萤

光，因此所形成的酶呈黄色，称黄(素)酶类(黄素蛋白)。FMN的最大吸收高峰在 445 纳米($m\mu$)，FAD 的最大吸收高峰在 450、375 及 260 纳米。

它们的分子结构为：

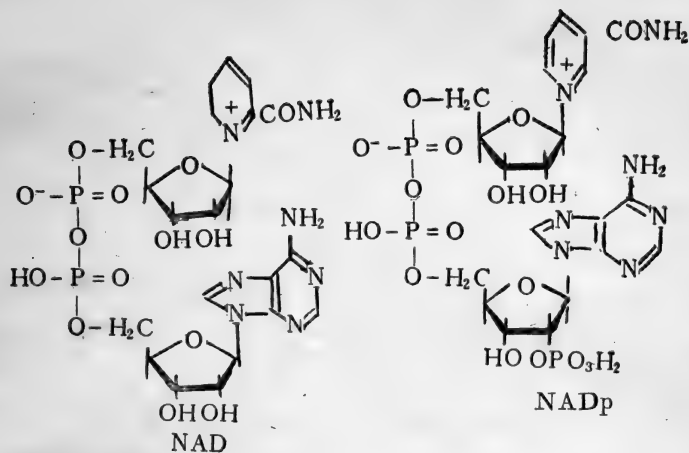


在酶的催化作用中，FMN 和 FAD 的功能是传递氢(递质子和电子 $2H \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$)，亦称氢载体而自成氧化-还原体系，反应主要表现在 6, 7-二甲基异咯嗪基团中的第 1 位及第 10 位 N 原子的脱氢与加氢。其反应式为：

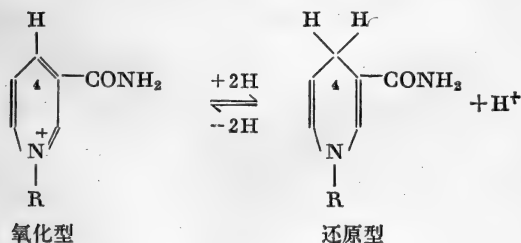


(三) 烟酰胺核苷酸(NAD 及 NADP)

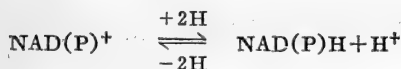
烟酰胺核苷酸是许多脱氢酶(如异柠檬酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、乙醇脱氢酶等)的辅酶。主要有两种：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD、辅酶 I)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP、辅酶 II)，它们都是维生素 PP 的衍生物，结构式如下：



NAD 及 NADP 在脱氢酶的催化过程中参与传递氢 ($2\text{H}^+ + 2\text{e}$) 的作用，其氧化还原作用体现在烟酰胺环的第 4 位碳原子上的加氢或脱氢。在中性环境中其氧化还原的反应式为：



或

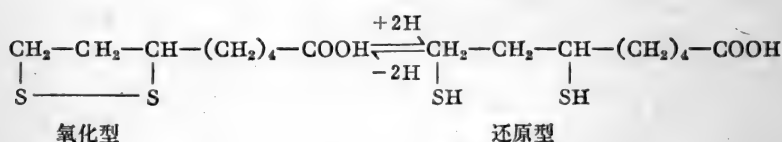


因此 NAD(P) 亦有用 NAD(P)^+ 表示其氧化型； NAD(P)H 表示其还原型。

(四) 硫辛酸(6, 8-二硫辛酸)

在生物体广泛存在，呈黄色。它与酶蛋白呈牢固的结合状态，

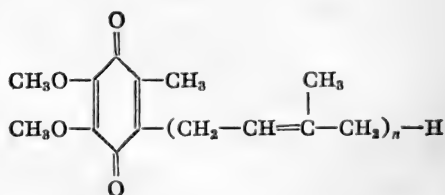
只有被酸、硷或酶水解后成为自由态。硫辛酸具氧化型及还原型两种状态，它们的结构式如下：



当两者互相转变时，起传递氢的作用。另外硫辛酸在酮酸氧化脱羧反应中，作为辅酶起传递酰基的作用，因此它在糖类代谢中起着重要作用。

(五) 泛醌(辅酶 Q, 简称为 UQ)

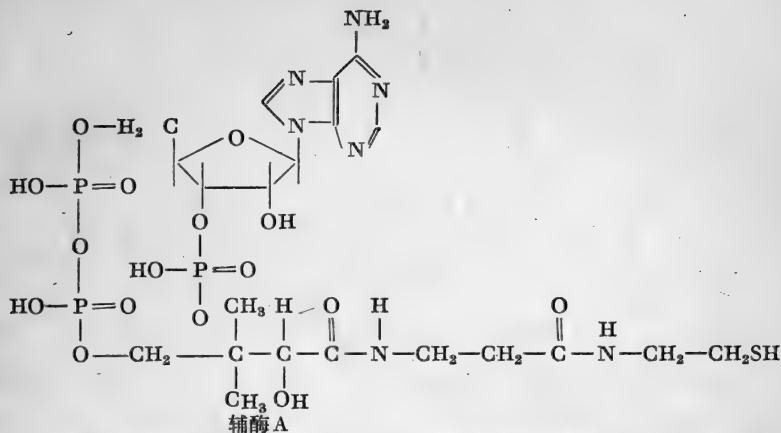
泛醌是生物体中广泛存在的一种醌类衍生物。它是呼吸链上的一个组成成分，其功能为传递氢和电子，在氧化磷酸化中起着重要作用，其结构式为：



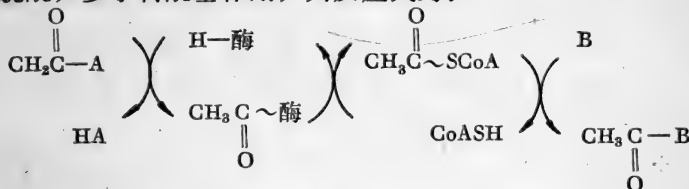
式中异戊烯单位数目 n ，可以为 6、7、8、9 或 10，不同来源的泛醌，其 n 的数目不同。例如，啤酒酵母菌的 n 为 8 (通常写作 UQ_8)、固氮菌的 n 为 6 (UQ_6)。

(六) 辅酶 A (CoA)

辅酶 A 在脂肪代谢中极为重要，其分子结构中含有维生素 B 族的泛酸部分，此外，尚含有腺嘌呤核苷酸和氨基乙硫醇部分，其结构式如下：



辅酶A也可写为CoASH。CoASH通过其巯基(-SH)的受酰与酰脱酰，参予转酰基作用，其反应式为：



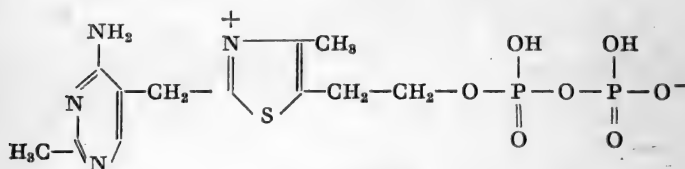
上式A为酰基的供体；B为酰基的受体。乙酰辅酶A ($\text{CH}_3\text{CO} \sim \text{SCoA}$)的硫酯键为一种高能键，当脱酰基时可放出大量的自由能，供给合成反应的需要。在酰化时则需要能量。因此，在酰化与脱酰过程中有能量的转移。脂肪酸的分解与合成也必须在酯酰辅酶A的参予下才能进行。所以，辅酶A在脂肪代谢上非常重要。

(七) 磷酸腺苷及其他核苷酸类

磷酸腺苷及其他核苷酸类在代谢过程中起着重要作用。它们是一些转磷酸基酶(如磷酸激酶)的辅酶。这些辅酶主要有：腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)、鸟嘌呤核苷三磷酸(GTP)、尿嘧啶核苷三磷酸(UTP)和胞嘧啶核苷三磷酸(CTP)等。由于它们的磷酸键(如ATP)是富有能量的高能键，因此通过磷酸基的转移，能量可以被贮存并有效地供给合成时利用。

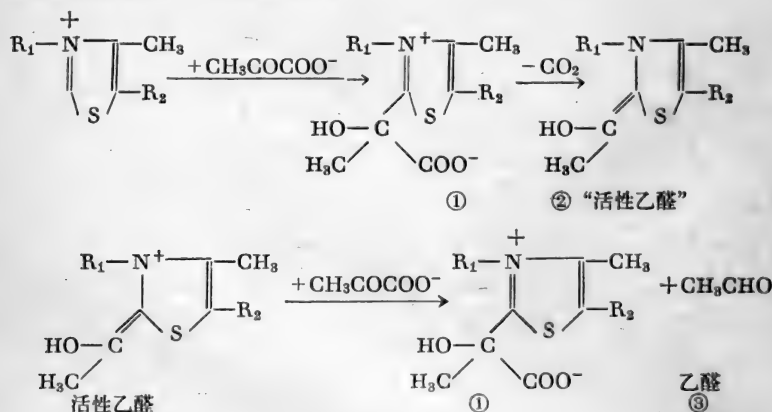
(八) 焦磷酸硫胺素(TPP)

焦磷酸硫胺素为维生素 B₁ 的焦磷酸酯，简称为 TPP，其结构式如下：



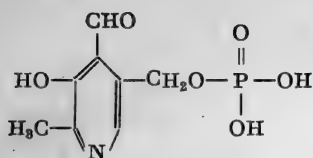
焦磷酸硫胺素

焦磷酸硫胺素是 α -酮酸脱羧酶和糖类的转酮酶（催化自酮糖上转 2C 单位至醛糖上去的酶）的辅酶。它在丙酮酸的脱羧反应中，首先，以其噻唑环上的第二位碳原子与丙酮酸结合生成①，随即脱去羧基生成“活性乙醛”②，活性乙醛不脱离酶体，但可以与另一个丙酮酸分子交换，而生成游离的乙醛③，被交换上去的丙酮酸又脱羧生成“活性乙醛”，再和另一个分子的丙酮酸交换，如此往复进行，其过程如下：

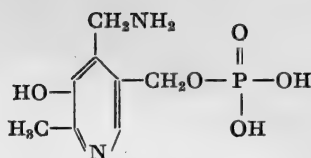


(九) 磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺

磷酸吡哆醛是氨基酸的转氨酶、消旋酶和脱羧酶的辅酶。磷酸吡哆胺与转氨作用有关。这两种辅酶的结构如下：



磷酸吡哆醛



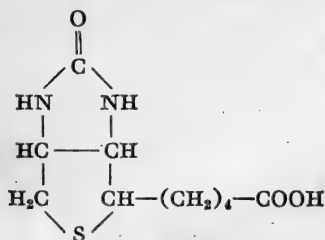
磷酸吡哆胺

吡哆醛及吡哆胺属维生素 B₆，维生素 B₆ 亦称吡哆素。

磷酸吡哆醛与磷酸吡哆胺可以相互转化，在转化过程中起了转氨基作用。转氨基作用机理见第九章氨基酸代谢中的“转氨作用”。

(十) 生物素(维生素 H)

生物素为羧化酶的辅基，属于维生素 B 族。它与酶蛋白结合后可催化 CO₂ 的掺入与转移。生物素是酵母及其他微生物的生长因子，其结构式为：

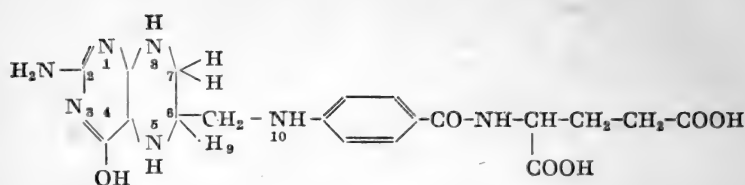


生物素

生物素的羧基与酶蛋白中的氨基结合。它在 CO₂ 的固定和脂肪的合成中起催化作用。当进行羧化反应时，CO₂ 首先与生物素分子结合形成酶与 CO₂ 的复合体，然后将 CO₂ 转交给其他分子，其作用机理见第三章中脂肪酸的合成。反应中所需的能量一般由 ATP 供给。

(十一) 四氢叶酸(辅酶 F, THFA)

叶酸的 5、6、7、8 位上各加一个氢原子则称四氢叶酸，其结构式如下：



四氢叶酸 (THFA)

四氢叶酸是甲酰基($\text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$)、亚甲基($=\text{CH}_2$)等一碳基的载体能参与一碳化合物代谢。例如氨基酸的互变；甲基的生物合成；嘌呤碱与嘧啶碱的生物合成(具体将于第二篇介绍)。

在酶的作用下，羟甲基和甲酰基结合于四氢叶酸的5位、10位或5、10位氮原子上，形成甲酰四氢叶酸(N^{10} -甲酰 THFA)、亚甲基四氢叶酸(N^5 、 N^{10} -亚甲基 THFA)等。如甲酰 THFA 的甲酰基在转甲酰基酶的作用下，被转移到其他化合物上，如在嘌呤合成中作为甲酰基供体。

THFA 与其他载体不同的是，被转移基团在与 THFA 结合后，可以发生一些变化，如从供体处接受的甲酰基可变成羟甲基或甲基，再转给受体。

叶酸是维生素 B 族之一，有维生素 BG 之称。

(十二) 金属

除卟啉环含铁或铜离子外，还有许多酶尚含有铜、镁、锌、钴等金属离子作为辅基，为酶的催化作用中不可缺少的组成。

从上述的辅酶或辅基中可知其中部分是维生素的衍生物。维生素是人类维持正常生命活动所必需的物质。但就微生物而言，对各种维生素的需要情况有显著的差别，微生物生长所需要的维生素称生长因子，主要是维生素 B 族物质。今将辅酶的组成及功能，归纳如表 2-1。

表 2-1

辅酶的组成及功能

辅酶名称	代号	主要化学组成	有关全酶	生理功能
硫辛酸	$\begin{matrix} S \\ \\ S \end{matrix} \rangle L$	6,8-二硫辛酸	X-酮酸氧化脱羧酶系	促进 α -酮酸氧化脱羧
辅羧酶	TPP	维生素 B ₁	丙酮酸脱羧酶	促进脱羧作用
黄素单核苷酸	FMN	维生素 B ₂	细胞色素还原酶, 黄酶	递氢
黄素腺嘌呤二核苷酸	FAD	维生素 B ₂	氨基酸氧化酶 黄嘌呤氧化酶	递氢
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NAD	维生素 B ₃	脱氢酶	递氢
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸	NADP	维生素 B ₃	脱氢酶	递氢
磷酸吡哆醛 磷酸吡哆胺		维生素 B ₆	转氨酶 氨基酸脱羧酶	转移氨基 脱羧基
四氢叶酸(辅酶 F)	CoF THFA	维生素 B ₁₁ (叶酸)	转甲基酶 有关转甲基反应的酶	传递甲基及羟甲基
辅酶 A	CoA CoA~SH	维生素 B ₃ (泛酸)	酰化酶	传递酰基
辅羧化酶		维生素 H (生物素)	羧化酶	促进羧化反应 传递 CO ₂
铁卟啉		铁卟啉	细胞色素	传递电子
			过氧化氢酶	促进 H ₂ O ₂ 分解
			过氧化物酶	促进过氧化物分解
腺嘌呤核苷酸类	ATP ADP AMP	腺嘌呤核糖和磷酸	激酶及其它磷酸转移酶合成酶	转移磷酸基及能量

第三节 酶的结构及其与催化功能的关系

酶的催化功能是由酶的分子结构, 特别是由酶的特殊的空间

构象所决定的。

当酶的构象发生改变时，酶的催化功能将相应地发生改变。

一、酶的结构

酶是一种具有催化功能的蛋白质。其分子结构也与蛋白质一样，具有一级、二级、三级有的具四级结构。

到目前为止，许多酶的基本化学结构——一级结构已经研究清楚。有的二级、三级和四级结构也已阐明。

例如：牛胰核糖核酸酶，其分子量为 14,000，由 124 个氨基酸组成，只有一条肽链，N-末端为赖氨酸，C-末端为缬氨酸，肽链上的八个半胱氨酸通过四个二硫键连接。如图 2-2 所示。

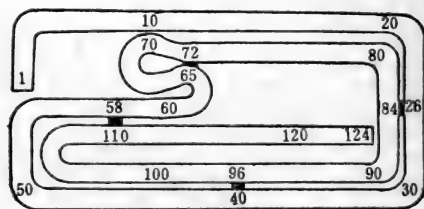


图 2-2 牛胰核糖核酸酶的氨基酸排列顺序





该酶的二级结构为 α -螺旋结构。酶分子中的四个二硫键中的三个在螺旋体中侧向地按三个不同的方向连接两个平行的螺旋环圈。其第四个二硫键所连结的第65号和第72号半胱氨酸以及其间的六个氨基酸则位于螺旋环圈的内侧。

大多数酶只由一条肽链组成，有的酶有二条、三条或多条肽链组成。这种由数条相同或相类似的肽链组成的酶呈四级结构。其中每一条肽链称为一个亚基。具有四级结构的酶通常含2~6个亚基，个别的含有几十个。四级结构被破坏时，亚基即分离。

二、酶的活性部位

酶的活性部位或酶的活性中心，指的是酶蛋白分子中直接与底物结合，形成酶-底物复合物的特殊部位。

酶的活性部位可分为结合部位和催化部位。前者的功能是直接与底物相结合，而后者则催化底物进行特定的化学反应。

酶的活性是肽链特定折叠，或肽链具有构象的结果。而酶的催化效能最通常的解释是在“活性中心”存在着氨基酸残基（有的还有金属离子）的参与而引起反应。这些氨基酸残基一般仅由几个氨基酸组成，它们在肽链中所处的位置可能相距较远，也可能位于不同的肽链上。但是，它们在酶的空间结构中，却必须按一定的相对位置，靠近在一起。因此，酶的活性部位只有在酶蛋白

保持一定的空间构象时才能存在并发挥其催化功能。

例如：上述的牛胰核糖核酸酶，其活性中心由第 12 号和第 119 号二个组氨酸和第 41 号的赖氨酸组成。他们在空间位置上相距很近，其相对位置如图 2-3 所示。

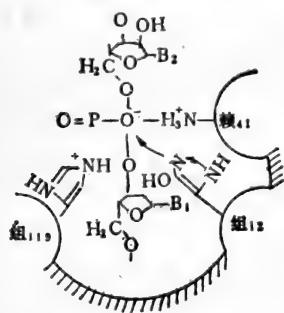


图 2-3 核糖核酸酶的活性部位区域。性部位的重要性时，并不认为酶的其他部分就成为不必要的了。事实上，酶的其他部分，对于维持酶的空间构象、保护酶的活性部位、保持酶的催化能力方面，都有不同程度的重要性。

酶的活性部位可用化学标记法和 X-射线衍射法进行测定。表 2-2 中列出的是已被测定的某些酶的活性中心的氨基酸所在位置。

表 2-2 某些酶的活性中心的氨基酸所在位置

酶 的 名 称	氨基酸总数 (测定年份)	活性中心的氨基酸所在位置
牛胰核糖核酸酶	124 个 (1956)	组 ₁₂ , 组 ₁₁₉ , 赖 ₄₁
溶菌酶	129 个 (1962)	天冬 ₃₅ , 天冬 ₅₂
牛胰蛋白酶 A	245 个 (1964)	组 ₆₇ , 丝 ₁₉₅ , 天冬 ₁₀₂
牛胰蛋白酶 B	245 个 (1968)	组 ₆₇ , 丝 ₁₉₅ , 天冬 ₁₀₂
木瓜蛋白酶	212 个 (1965)	半胱 ₂₅ , 组 ₁₅₉
枯草杆菌蛋白酶	275 个 (1967)	组 ₆₄ , 丝 ₂₂₁
弹性蛋白酶	240 个 (1970)	组 ₄₅ , 丝 ₁₈₈ , 天冬 ₉₃

三、酶的构象与催化功能的关系

酶的特殊构象决定了酶的催化功能。酶构象的改变必将引起酶催化功能的改变，使其催化功能增强或减弱，甚至完全丧失。

(一) 酶的一级结构与催化功能的关系

酶的一级结构是酶的基本化学结构。是酶催化功能的基础。一级结构的改变将使酶的催化功能发生相应的改变。这主要是由于酶分子中的肽键和二硫键的断裂和联结所引起的。

1. 肽键的改变与酶催化功能的关系

肽键($-\text{CO}-\text{NH}-$)是酶的一级结构的主键。它的断裂与联结对酶的催化功能的影响，根据实验证明，不同的酶蛋白，不同位置的肽键，其影响是不同的。

例如：核糖核酸酶(RNase)，由 124 个氨基酸组成。只有一条肽链。当用枯草杆菌蛋白酶有限水解的条件下，使它的第 20 号和第 21 号氨基酸之间的肽键断裂，形成 20 个残基的 S-肽和 104 个残基的 S-蛋白，两者酶的活性完全丧失。而在中性溶液中，两个肽段合在一起时，则酶的活性又恢复。在 C-末端用羧肽酶去掉三个氨基酸时，对酶活性几乎没有影响，而若用胃蛋白酶去掉 C-末端的四个氨基酸时，则酶活性全部丧失。

在个别情况下，肽键的断裂可使酶的活性呈现出来。例如：胰蛋白酶原来是没有活性的，但当受肠激酶的作用而去掉一个六肽时，则使其呈现出胰蛋白酶的催化功能。

2. 二硫键的改变与催化功能的关系

许多酶在肽链中或肽链间，都存在有二硫键($-\text{S}-\text{S}-$)。一般二硫键的断裂将使酶变性而丧失其催化功能，但是在某些情况下，二硫键断开，而酶的空间构象不受破坏时，酶的活性并不完全丧失。如果使二硫键复原，酶又重新恢复其原有的催化功能。

(二) 酶的二级和三级结构与催化功能的关系

酶的二级、三级结构是所有酶都必需具备的空间结构，是维

持酶的活性部位所必需的构型。

酶的二级和三级结构的改变，可以使酶遭受破坏而丧失其催化功能，也可以使酶形成正确的催化部位而发挥其催化功能。前者以蛋白质变性理论为依据，后者则可通过诱导契合学说 (Induced fit theory) 加以阐明。

酶的诱导契合学说是由 Koshland 首先提出的。也综合了许多实验结果认为：由于底物的诱导而引起酶蛋白二、三级空间结构的某些变化，才使酶发挥其催化功能。因此，诱导契合就是通过底物和酶活性部位的结合部位相结合，使酶蛋白的空间构型发生某些精细的改变，以适应与底物相互作用，从而形成正确的催化部位，使酶发挥其催化功能。如图 2-4 所示。

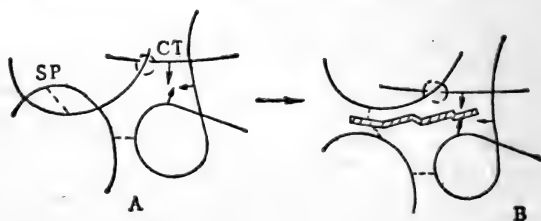


图 2-4 (甲)酶的诱导契合示意图

SP: 结合部位

CT: 催化部位

↑: 催化基团

从图中可以看到，当酶未与底物分子接触时，三个催化基团没有配位，(图 2-4 甲)所以酶不能发挥催化作用。而当适宜的底物与结合部位接触时，酶的空间结构发生改变，使三个催化基团很好配合，形成正确的催化部位(图 2-3 乙)，使催化反应顺利进行。这样，由于底物的诱导作用，使酶从 A 至 B 达到了诱导契合。

诱导契合学说已得到许多的实验证明。通过 X-射线衍射法的研究，为此学说提供了最直接的证据。

如羧肽酶A是由307个氨基酸组成的单一肽链，酶分子中含一原子锌，锌对酶活性是必需的。当和底物甘氨酸-L-酪氨酸(甘-酪)结合时，酶的活性部位的空间构型发生了改变。其中酪氨酸₂₄₈的酚基侧链移动12 Å(埃)左右，而与底物的酰胺键上的N原子形成氢键。精氨酸₁₄₅的胍基移动2 Å左右，与底物的羧基形成盐键。还有谷氨酸₂₇₀，从原来位置移动2 Å左右，通过水分子而与底物的α-氨基形成氢键(见图2-4-2)。如果使用赖氨酸-酪酰胺(赖-酪-NH₂)为底物，就看不到酶的构象有上述的显著变化，所以，赖氨酸-酪酰胺不能被羧肽酶作用。因此可以证明，适宜底物的诱导，酶的二、三级空间结构发生某些改变，使催化基团形成正确的配位，才使酶的催化功能发挥出来。

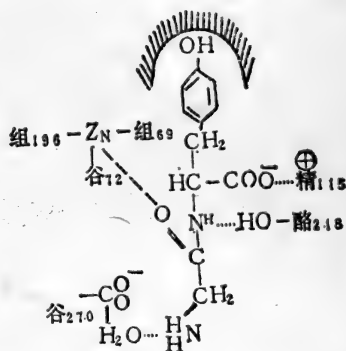


图 2-4 (乙)二肽(甘酪)底物与羧肽酶A的络合

(三) 酶的四级结构与催化功能的关系

具有四级结构的酶，按其功能可分为两类。一类与催化作用有关，另一类与代谢调节关系密切。现分述如下：

1. 酶的四级结构及亚基与催化活性的关系

只与催化作用有关的具有四级结构的酶，由数个相同的亚基组成。每个亚基都有一个活性中心。

四级结构完整时，酶的催化功能充分发挥出来。当四级结构被破坏时，亚基便分离。若采用的分离方法适当，被分离的亚基各自具有催化活性；否则各亚基失去催化活性。

例如：天冬氨酸转氨酶的亚基是具有催化活性的。当用琥珀酰化的方法使四级结构破坏时，分离的亚基各自保持催化活性。

而用酸、碱、表面活性剂等破坏其四级结构时，所得到的亚基没有催化活性，这是由于所使用的化学药剂抑制了酶活性所造成的。

2. 酶的四级结构与代谢调节的关系

与代谢调节有关的具有四级结构的酶，其组成亚基中，有的具有活性中心，可与底物结合，执行酶的催化功能。有的亚基具调节中心，调节中心可分为激活中心和抑制中心，可分别与激活剂或抑制剂结合，使酶的活性受到激活或抑制，从而调节酶反应的速度和代谢进程。

调节中心又称变构中心。这类酶对代谢的调节机制可由变构效应来说明。将于十二章中的调节酶中予以介绍。

第四节 酶的催化特性

催化作用是指能改变化学反应速度(主要应用加速反应)的过程。凡是能起催化作用的物质称催化剂。催化剂可缩短反应到达平衡点的时间，但不能改变平衡点，在反应过程中其本身不被消耗。

酶是一种催化剂，与一般催化剂的作用是相同的。但由于酶的化学本质是蛋白质，故尚有其特点。

一、酶的催化反应条件

酶能够在常温和 pH 值近乎中性的温和条件下发挥其催化功能。但一般催化剂却往往需要高温高压、强酸强碱等剧烈条件，然而，在这些剧烈条件下，酶却会受到变性而丧失其催化能力。

二、酶的催化效率

酶的催化效率要比一般催化剂的催化效率高得多。例如，过氧化氢(H_2O_2)可由铁离子(Fe^{+++})催化，也可由过氧化氢酶催化，

而分解为水和氧气，在 0°C 时，一克分子铁每秒钟仅能分解 10^{-5} 克分子过氧化氢，而在同样条件下，每克分子过氧化氢酶却能分解 10^5 克分子过氧化氢。过氧化氢酶的催化效率比铁离子高 10^{10} 倍。又如，一克结晶的细菌 α -淀粉酶，在 65°C 的条件下，15 分钟便可以使二吨淀粉水解为糊精。

三、酶的专一性

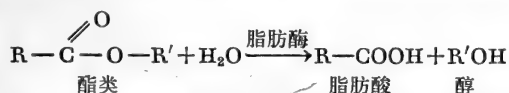
一种酶仅能作用于某一种物质或一类结构相似的物质并催化某种类型的反应，这种特性称为酶的专一性。又叫做酶的特异性或选择性。

酶的专一性是相对而言的。按其严格程度的不同，可以区分为下列几种。

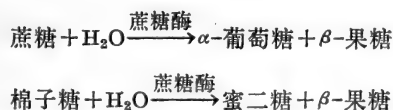
(一) 相对专一性

一种酶能够催化一类具有相同化学键或基团的物质进行某种类型的反应，这种专一性称为相对专一性。

例如，脂肪酶可以催化所有含酯键的一类物质水解。所以它不仅可以水解脂肪，也可以水解所有的脂肪酸和醇所形成的酯。



又如，蔗糖酶可以催化含 β -果糖苷键的一类物质进行水解，故亦称 β -果糖苷酶。它可以催化蔗糖及其他 β -果糖苷化合物——棉子糖、龙胆三糖等物质的水解，而生成一分子 β -果糖和另一分子其他化合物。

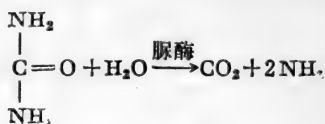


(二) 绝对专一性

一种酶只能催化一种化合物进行一种反应，这种专一性称为

绝对专一性。

例如，脲酶只能催化尿素进行水解而生成二氧化碳和氨。



它不能催化尿素以外的任何物质发生水解，也不能使尿素发生水解以外的其它反应。

(三) 立体异构专一性

当底物含有不对称碳原子时，酶只能作用于异构体的一种，而对另一种则全无作用。这种专一性称为立体异构专一性。

例如，酵母中的糖酶类只作用于 D-型的糖而不能作用于 L-型的糖，L-氨基酸氧化酶只作用于 L-氨基酸，而不作用于 D-氨基酸。

同样，对于顺反异构体，酶也仅能作用于其中一种，如反丁烯二酸酶只作用于反式丁烯二酸，顺乌头酸酶只作用于顺式乌头酸等等。

酶的专一性在科研和生产中都得到广泛的应用。利用这一特性，可以从原料得到单一的产物，防止副产物的生成，这样不仅可以提高质量，同时还可以增加产量。酶法葡萄糖的生产便是一个例子。另外，酶的专一性还可应用于酶的鉴定、酶的分类、酶的活力测定、以及对某些物质的定性定量分析等方面。

四、酶催化功能的转换

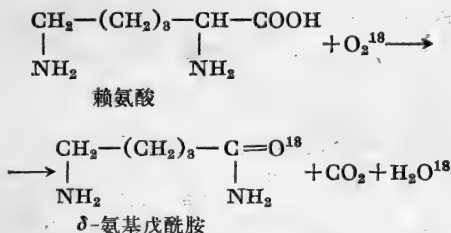
上述酶的专一性，是酶的催化特性的基本性质。但有的酶在某种特定的条件下，如使用酶的底物类似物，或用化学药剂等，可以引起酶催化功能的转换。

(一) 底物类似物引起酶催化功能的转换

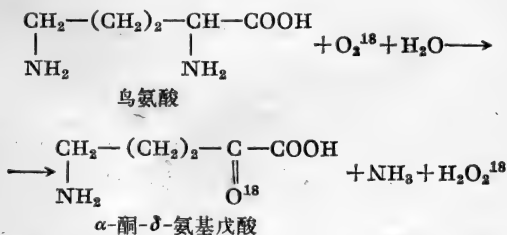
某种酶按其专一性本来只能催化某种底物进行某种类型的反

应。然而，当加进底物类似物时，却使原来的催化活性降低或消失，而催化另一类型的反应。

例如：赖氨酸加氧酶，本来只能催化赖氨酸的加氧反应。在赖氨酸分子中加进一原子氧，随之脱羧，生成 δ -氨基缬氨酰胺(δ -氨基戊酰胺)并使二原子氢与另一原子氧生成水。如下式所示：



然而，如使用比赖氨酸少一个碳的鸟氨酸为底物时，这个加氧酶不再催化加氧反应，却呈现出氧化酶的功能，催化氧化脱氨反应，使鸟氨酸脱氨，生成 α -酮- δ -氨基缬草酸(α -酮- δ -氨基戊酸)和 H_2O_2 。如下式所示：

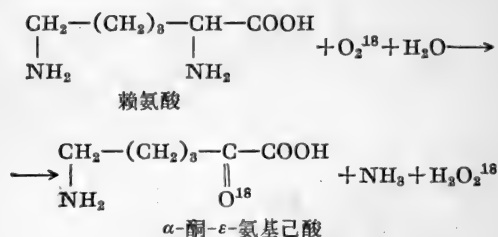


(二) 化学药剂等引起酶催化功能的转换

用化学药剂等对酶进行处理，可使酶蛋白中特定的氨基酸残基发生改变，从而引起酶催化功能的转换。

例如，上述的赖氨酸加氧酶，当加进对-氯汞苯甲酸(P-CMB)、氯化汞(HgCl_2)、苯汞($\text{Hg}-\text{C}_6\text{H}_4$)等巯基(-SH)抑制剂时，失去加氧酶活性而呈现出氧化酶活性，引起赖氨酸的氧

化脱氨反应，生成 α -酮- ϵ -氨基己酸、 H_2O_2 并放出氨。其反应式为：



这种催化功能的转换是部分可逆的。把上述用 P-GMB 等处理过的酶，再加进 DTT(二硫苏糖醇)时，氧化酶的活性消失，而使加氧酶的活性回复到原来的 90%。

另外，还可以用其它酶使酶蛋白中特定的氨基酸残基发生改变，从而引起酶催化功能。

关于酶催化功能的转换这一新课题的研究才刚刚开始。然而，已经看到，它对于研究酶的催化特性及其催化机制是很重要的。另外，酶的功能转换亦有可能作为生物体内代谢调节的一个方面，也是令人感兴趣的。

第五节 酶的催化作用机制

一、酶的催化本质

要使化学反应能够发生，反应物分子必须发生碰撞。但是，并非所有的分子碰撞都是有效的，只有那些具有足够能量的反应物分子碰撞之后，才能发生化学反应。这种碰撞叫做有效碰撞。

具有足够能量，能发生有效碰撞的分子称为活化分子。活化分子所具有的能量超过反应特有的能阈。能阈是指化学反应中作用物分子进行反应时所必须具有的能量水平，每一个反应有它一定的能阈。

为了使反应物分子超越反应的能阈变为活化分子，需从外部供给的额外能量称为活化能。反应的能阈越低，即需要的活化能越少，反应就越易进行。

催化剂的作用就在于降低反应的能阈，即减少所需的活化能，从而使反应加速进行。如图 2-5 所示。

从图 2-5 可以看到，在可逆反应 $A + B \rightleftharpoons AB$ 中，当反应 $A + B \rightarrow AB$ 进行时，所需的活化能为 E_1 ，反应结果放出热量 Q 。而当逆反应 $AB \rightarrow A + B$ 进行时，所需的活化能为 E_2 ，反应结果吸收热量 Q 。

酶作为一种高效能的催化剂，与一般催化剂比较，可使反应的能阈降得更低，所需的活化能大为减少（见表 2-3）。所以，酶的催化效率比一般催化剂高得多，同时能够在温和的条件下充分

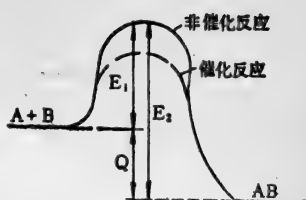


图 2-5 催化反应与非催化反应的能量关系

表 2-3 若干反应的活化能

反 应	催 化 剂	活化能 (千卡/克分子)
H ₂ O ₂ 的分解	无	18
	胶状铂	11
	过氧化氢酶	5
丁酸乙酯的水解	H ⁺	13.2
	OH ⁻	10.2
	胰脂酶	4.5
蔗糖的水解	H ⁺	26
	酵母蔗糖酶	11.5
酪素的水解	H ⁺	20.6
	胰蛋白酶	12

地发挥其催化功能。

二、酶的催化机制

如上所述，酶的催化本质是降低反应的能阈，使所需的活化能减少，从而加快反应的进行。为了达到减少活化能的目的，酶与底物之间必然要通过某种方式而互相作用，并经过一系列的变化过程。

酶和底物的相互作用和变化过程，称为酶的催化机制。

关于酶的催化机制，曾经提出过好几种学说和理论。目前较为公认的是由米契里斯(Michaelis)和曼吞(Menten)在1913年首先提出的中间产物学说。

中间产物学说的基本论点是：首先酶(E)和底物(S)结合生成中间产物 ES，然后中间产物再分解成产物 P，同时使酶重新游离出来。



对于有二种底物的酶促反应，该学说可用下式表示：

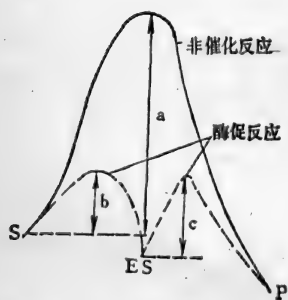


图 2-6 酶促反应减少所需的活化能

中间产物学说的关键，在于中间产物的形成。酶和底物可以通过共价键、氢键、离子键和络合键等而结合成中间产物。中间产物的稳定性较低，易于分解成产物并使酶重新游离出来。

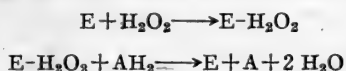
根据中间产物学说，酶促反应分两步进行，而每一步反应的能阈较低，所需的活化能较少。如图 2-5 所示。

从图 2-6 中可以看到，当非催化反应时，反应 $S \rightarrow P$ 所需的

活化能为 a ，而在酶的催化下，由 $S + E \rightarrow ES$ ，活化能为 b ，再由 $ES \rightarrow E + P$ ，需要活化能 c 。 b 和 c 均比 a 小得多。所以酶促反应比非催化反应所需的活化能为少，从而加快反应的进行。

中间产物学说已为许多实验所证实。酶与底物所生成的中间产物的存在，也已得到确证。

例如，过氧化物酶 E 可催化过氧化氢 (H_2O_2) 与另一还原型底物 AH_2 进行反应。按中间产物学说，其反应过程如下：



在此过程中，可用光谱分析法证明中间产物 $E-H_2O_2$ 的存在。首先对酶液进行光谱分析，发现过氧化物酶在 645、587、548、498 纳米处有四条吸收光带。接着向酶液中加入过氧化氢，此时发现酶的四条光带消失，而在 561、530 纳米处出现二条吸收光带，说明酶已与过氧化氢结合而生成了中间产物 $E-H_2O_2$ 。然后加进另一还原型底物 AH_2 ，这时酶的四条吸收光带重新出现，证明中间产物分解后使酶重新游离出来了。

此外，为了阐明酶的催化机制，还引进了“微环境”的概念。所谓微环境指的是酶活性部位的催化基团所处的特殊环境，影响催化基团的离解，使催化基团具有不寻常的特性。

例如： α -胰凝乳蛋白酶的活性中心的结构，是由丝氨酸 195、组氨酸 57 和天冬氨酸 102 组成。其中和底物直接作用的是丝氨酸 195 的 $-OH$ 基和组氨酸 57 的咪唑基，而天冬氨酸 102 也作为电子传递系统的一员担负重要的任务。

α -胰凝乳蛋白酶的活性部位的平面图如图 2-7 所示。相互间用氢键连结。

天冬氨酸 102 的羧基处于由组氨酸 57、丙氨酸 55、半胱氨酸 58、异亮氨酸 199、酪氨酸 94、丝氨酸 124 所形成的疏水的微环境中，使质子不能接近而保持解离状态。当 pH 在中性以上，即组氨酸 57 的咪唑基的亚氨基 ($>NH$) 能离解的条件下

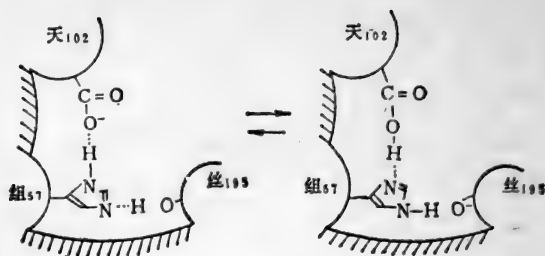


图 2-7 α -胰凝乳蛋白酶的活性部位平面图

($pK=6.7$)，可提供一个质子，使天冬氨酸 102 的羧基结合成 $-COOH$ ，其电子则通过氢键和咪唑环被传递到丝氨酸 195 上，结果使催化部位上的丝氨酸 195 的羟基氧形成活化的阴离子状态。(参看图 2-7 的右图。)

当底物(蛋白质)进入活性部位时，丝氨酸 195 的活化的羟

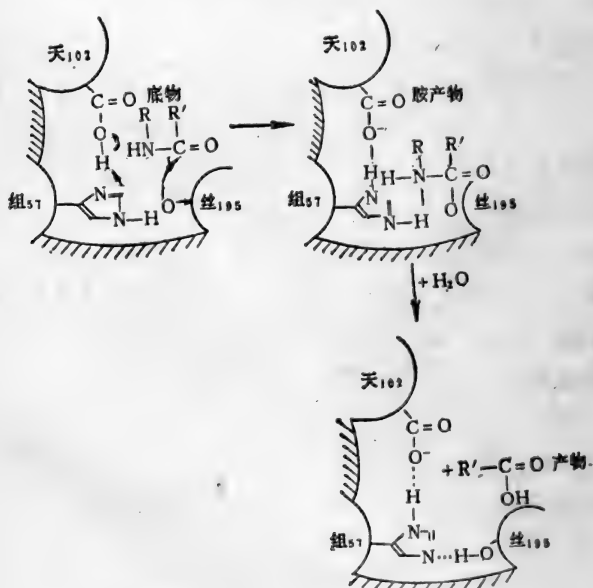


图 2-8 α -胰凝乳蛋白酶的催化机制

基氧阴离子攻击底物肽键上的羰基，同时组氨酸 57 咪唑环上的亚氨基与底物肽键上的 N 形成氢键。从而引起肽键断裂，并使酶发生酰基化，生成酰基化酶这一中间产物。然后，这个中间产物加水进行脱酰基的过程，而生成羧酸并使酶重新游离出来。如图 2-8 所示。

第六节 酶的反应动力学

酶反应动力学主要研究酶反应速度、反应过程的规律及各种环境因素对酶反应速度的影响，这对于深入了解酶催化作用的本质、机制以及对于酶的分离提纯及应用等方面均具有重要意义。

一、酶反应速度的测定

为了研究酶反应速度的过程和规律，首先要了解酶促反应速度的测定。酶促反应速度和普通化学反应一样，可用单位时间内底物的减少量或产物的增加量来表示。而在实际测定中一般以测定产物在单位时间的增加量来表示，因为产物的形成测定起来比较灵敏，可制作出酶反应产物浓度与时间关系的曲线（如图 2-9 所示）。反应速度即图中曲线的斜率，仅在最初一段时间内其产物的生成量与时间成比例关系，随着时间的延长，反应速度即逐渐降低。这主要是因为随着反应进行，底物浓度降低，产物浓度增加，从而加速了逆反应的进行。另外产物对酶的抑制作用及由于 pH 值和温度等因素的影响使酶逐渐失活。因此在研究酶反应时，为准确地表示酶活力，就必须采用如图 2-8 中的

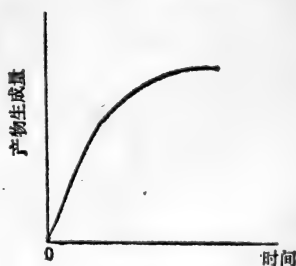


图 2-9 酶反应速度曲线

直线部分，即用初速来表示。后面提到的酶作用速度，一般是指初速而言。酶反应的速度愈大，意味着酶的催化活力愈大。

(一) 酶的活力单位

在一定条件下，酶所催化的反应速度称酶活力，即一定时间内底物分解的量或产物生成的量，用单位数表示。对每一种酶，活力单位的确定没有严格标准，同一种酶常有几种不同的单位。因此，不同的酶的催化能力不能用活力单位数来进行比较。一九六一年国际生化协会规定：在特定条件下(温度可采用 25°C，其它条件如 pH 值及底物浓度等均采用最适宜的)，每分钟催化一微克分子的底物转化为产物的酶量称为 1 个单位 (U)，称国际单位。这虽是一个统一的标准，但使用起来不如习惯法方便。

酶的比活力是指在固定的条件下，每毫克酶蛋白所具有的酶活力称比活力。

$$\text{比活力} = \text{酶活力} / \text{毫克酶蛋白}$$

这是酶学研究和生产中经常要遇到的一个数据。

对液体状态酶活力常以单位/毫升(酶液)表示。

(二) 酶活力测定条件

由于酶促反应受许多条件的影响，因此，在测定酶活力时要尽量使反应的条件保持恒定，对于温度和氢离子浓度尤要如此。

温度对酶反应的影响较一般化学反应更为灵敏。酶本身也容易受热破坏。所以在观察测定酶反应时必须使温度保持恒定，一般采用恒温器(如恒温水槽)。

测定时的 pH 也必须保持一定。为此，通常在溶液中加入缓冲溶液，在使用缓冲剂时，也要注意经常校正。

同时，还应注意避免混入任何微量杂质而造成的不良后果。

(三) 酶活力测定的主要方法

测定酶活力常用的方法有如下几种：

1. 化学分析法

此法采用一般化学的容量测定的方法，定量地测定反应产物

(如酸、硷、无机磷、氨基酸和还原糖等)来测定酶的活力。此法优点是设备简单,不需特殊仪器,应用较广,但工作量较大。对于反应速度较快的酶,时间难于控制,也不易测准确。

2. 分光光度计量法

此法在酶学研究是常用的方法。酶反应中的底物或产物往往含有不饱和的或环状的原子团,如 $-\text{CH}=\text{CH}-$, $\text{>C}=\text{O}$, $-\text{N}=\text{N}-$, $-\text{C}_6\text{H}_5$ 等,它们在光谱内的可见光区、紫外区或红外光谱区具有吸光性。由于反应的底物或产物显示不同的吸收光谱。所以,可以根据光吸收的变化来观察酶反应的进行。此法的特点是迅速、简便、灵敏和特异性强,而且不必中止反应的进行。

3. 测压法

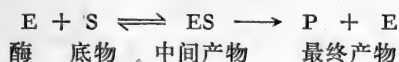
若酶反应中某一产物为气体,则可采用压力计来测量所产生气体的体积而表示反应的程度,这种技术称测压法。使酶反应在一个保持恒温的密闭容器内进行,同时产生或吸收气体,容器与充满液体的气压计相连,仪器内压力的改变可以精确地读出气体的量。

4. 旋光法

此法常用于研究能引起旋光度变化的酶反应。

二、酶浓度对反应速度的影响

在酶促反应中,根据中间产物学说,催化反应可分两步进行,其反应式为:



酶促反应的速度通常是以反应产物P的生成速度来表示。根据质量作用定律,产物P的生成决定于中间产物[ES]的浓度。[ES]的浓度越高,反应速度也就越快。

在底物大量存在时,形成中间产物的量就决定于酶的浓度,酶分子愈多,则底物转化为产物也就相应地增加,这就意味着底

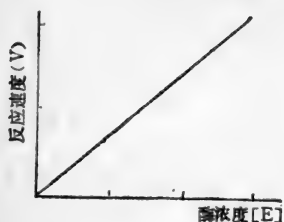


图 2-10 酶浓度与反应速度关系

物的有效转化随着酶浓度的增加而成直线地增加，如图 2-10 所示。换言之，酶反应速度依酶浓度的一级反应而变化。其数学式表示为：

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = K[E]$$

式中 v ——反应速度

$[S]$ ——底物浓度

$[E]$ ——酶浓度

t ——时间

K ——速度常数

在发酵生产上或使用酶制剂时，应根据具体情况和条件来确定酶的用量。酶法生产葡萄糖时，为缩短糖化和液化时间，可以适当增加淀粉酶的用量，而在白酒的酿制过程中，由于采用边糖化边发酵的方式，糖化作用不要求迅速完成，所以用曲量可以少一些。具体用量的确定一般应先做酶的特性试验，根据酶浓度与反应速度的特性曲线来确定。

三、底物浓度对反应速度的影响

就底物浓度变化而言，许多酶促反应也近乎一级反应。在其它条件都相同的情况下，反应速度与底物浓度的关系如图 2-11 所示。

当酶浓度 $[E]$ 一定时，底物浓度 $[S]$ 较低时， $[S]$ 增加，反应速度 v 也急剧地增加，但反应曲线也随即开始弯曲。当 $[S]$ 升高至一定的浓度， v 就不再升高，其所能达到最大的反应速度决定于酶的浓

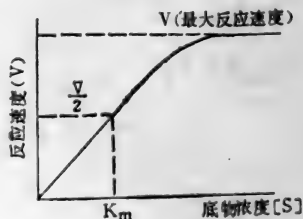
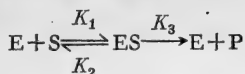


图 2-11 底物浓度与反应速度关系

度。此现象可用下式反应加以解释：



式中 K_1 、 K_2 、 K_3 分别代表各反应的速度常数。

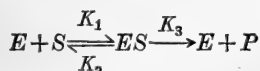
根据质量作用定律， P 的生成速度决定于中间产物 $[ES]$ 的浓度，也即酶反应速度 v 决定于 $[ES]$ ，即 $v = K_3[ES]$ 。

当 $[S]$ 浓度低时，底物不足与所有酶结合，尚有一部分“游离”的酶未结合成 $[ES]$ ，因而也就未发挥其全部催化作用。若 $[S]$ 增加， $[ES]$ 也随即增加， v 也就增加。当所有的酶都结合成 $[ES]$ 后，即使 $[S]$ 增加， $[ES]$ 也不再增加，反应速度也就到了一个极限。

米契利斯和曼吞将上述底物浓度 $[S]$ 与酶促反应速度关系进一步作定量分析，用数学公式推导出酶促反应的基本公式，称米氏公式。

(一) 米氏公式的推导

根据：



中间产物 $[ES]$ 的生成速度(底物 S 的消失速度)： $V_1 = K_1[S][E] - K_2[ES]$ ，而 $[ES]$ 的消失速度(产物 P 的生成速度)： $V_2 = K_3[ES]$ ，当反应速度达到平衡状态时，即 $V_1 = V_2$ 时：

$$K_1[E][S] - K_2[ES] = K_3[ES]$$

移项后得：

$$\frac{K_2 + K_3}{K_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

以 K_m 代表：

$$\frac{K_2 + K_3}{K_1}$$

代入后得：

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

式中酶浓度 $[E]$ ，应等于酶的总浓度 $[E]_t$ 减去用于生成中间产物的浓度 $[ES]$ ，

也即：

$$[E] = [E]_t - [ES]$$

代入式①得：

$$[ES] = ([E]_t - [ES])[S]/K_m$$

移项后得：

$$[ES] = [E]_t \cdot [S] / (K_m + [S])$$

又酶的反应速度：

$$v = K_3[ES]$$

也即：

$$v = K_3[E]_t[S] / (K_m + [S]) \quad (2)$$

若所有酶 $[E]_t$ 都与底物结合生成中间产物 $[ES]$ ，则 $[ES] = [E]_t$ ，则反应速度 v 也即达到最大速度 V ，即 $V = K_3[E]_t$ 。

代入②式得：

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

此方程式为酶反应动力学的最基本方程式，从式中可知酶反应速度 v 决定于底物浓度 $[S]$ 、 K_m 及 V 。 K_m 为常数，当酶反应中酶的总浓度 $[E]_t$ 维持不变， V 也是一个常数。因此，酶反应速度 v 主要决定于底物浓度 $[S]$ 。如果 K_m 比底物浓度大得多时为：

$$v = \frac{V[S]}{K_m} = \text{常数} \times [S]$$

(二) 米氏常数 K_m 与 V 的含义

$K_m = K_2 + K_3/K_1$ 称为米氏常数， K_m 也等于 $[E][S]/[ES]$ 。因此， K_m 的单位为克分子浓度 M ，即克分子/升。

若在酶促反应中 $K_3 \ll K_2$ ，则 $K_m = K_2/K_1$ 。此时， K_m 即

为中间产物 $[ES]$ 的解离常数。 K_m 愈小， $[ES]$ 则愈少解离。也即酶与底物的亲和力很大。反之， K_m 值愈大，表示酶与底物亲和力很小，就不易结合。

若在酶促反应中 K_3 不是远小于 K_2 ， K_3 就不能忽略不计。此时， K_m 就不是中间产物 $[ES]$ 的单独解离常数，而是中间产物 $[ES]$ 在酶促反应中整个复杂化学平衡时的复合常数，通常就用 K_s 来表示。

若使酶促反应速度 v 等于最大反应速度 V 值的一半。代入公式(3)

则得：

$$\frac{V}{2} = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$$

则：

$$K_m = [S]$$

这可以从图中求得，也即 K_m 为酶促反应速度恰等于最大速度一半时的底物浓度。如酶的特异性不严格，可与数种底物起作用时，则每种底物有不同的 K_m 值。 K_m 值是研究酶作用机制的一个重要的特征常数。

米氏常数 K_m 可以在严格规定情况下测定，通常以克分子来

表 2-4 一些酶的 K_m 值

酶 名 称	底 物	K_m (克分子/升)
蔗糖酶	蔗 糖	2.8×10^{-2}
麦芽糖酶	麦芽糖	2.1×10^{-1}
磷酸酯酶	磷酸甘油酸	3.0×10^{-3}
磷酸甘油酸激酶	ATP	1.1×10^{-4}
乳酸脱氢酶	丙酮酸	3.5×10^{-5}
乙醇脱氢酶	乙 醇	1.8×10^{-2}
乙醛脱氢酶	乙 醛	1.1×10^{-4}
细胞色素C氧化酶	细胞色素C	1.2×10^{-4}
苹果酸酶	苹果酸	5.0×10^{-5}

表示, 一些酶的 K_m 值如表 2-4 所示。

(三) K_m 值及 V 值的求法

K_m 值及 V 值 可以根据两组不同底物浓度的实验数据代入公式, 然后解二元一次联立方程式计算, 但此法不够简便, 且因 v 值不易准确测定, 故 K_m 值并不易准确测定。

通常多是用 Lineweaver 和 Burk 的作图法求出。如果将米氏公式变为其倒数, 即为:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \left[\frac{1}{S} \right] + \frac{1}{V}$$

这个公式相当于 $y = mx + b$, 是一个直线方程式, 其斜率为 K_m/V , 截距为 $1/V$, 直线与 $1/S$ 轴的交点等于 $-1/K_m$ 。因为 $1/v = 0$ 时, $1/S = -1/K_m$, 如图 2-12 所示。

例如, 酵母菌脱羧酶的反应, 经过试验取得表 2-5 所列的数

表 2-5 酵母菌脱羧酶反应速度数据

丙酮酸浓度 S (M)	反应速度 v (CO_2 M/分钟)	$\frac{1}{S}$	$\frac{1}{v}$
0.025	26.6	40	0.0376
0.050	40.0	20	0.0250
0.100	53.3	10	0.0187
0.200	64.0	5	0.0156

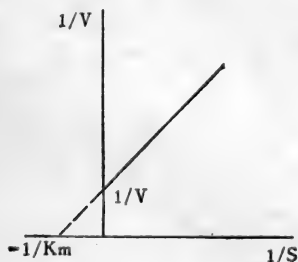


图 2-12 作图法求 K_m 与 V

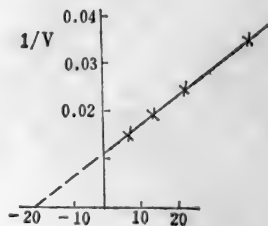


图 2-13 作图法求酵母菌脱羧酶的 K_m 与 V

据。根据这个试验就可用方格纸以 $1/v$ 对 $1/S$ 作图，所作的图见图 2-13 所示。并求出该酶的 K_m 值及 V 值。

因：

$$-1/K_m = 1/S$$

故：

$$-1/K_m = 20 \quad K_m = -1/20 = 0.05 \text{ M}$$

$$V = 1/0.0125 = 80 (\text{毫升/分钟})$$

米氏公式存在有缺点和局限性，因为在米氏学说中，关于酶和底物首先生成中间产物的基本假定是正确的，但其他假定在很多情况下不是都能成立的，而且在推导公式时仅分析了最简单的酶反应。因此 1961 年国际酶学会议建议上述米氏常数改用“底物常数” K_s 更为恰当，因为它实际上是一个平衡常数，其倒数表示酶和底物的亲和力的大小。

(四) 高浓度底物的抑制作用

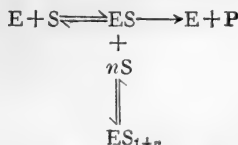
按照米氏理论，在酶促反应中底物浓度的提高是有一个极限的，当底物浓度过高时反应速度又重新下降。这是高浓度底物对反应引起了抑制作用，其原因可能有如下几点：

(1) 酶促反应是在水溶液中进行的，水在反应中有利于分子的扩散和运动。当底物浓度过高时就使水的有效浓度降低，使反应速度下降；

(2) 过量的底物与酶的激活剂(如某些金属离子)结合，降低了激活剂的有效浓度而使反应速度下降；

(3) 一定的底物是与酶分子中一定的活性部位结合的，而形成不稳定的中间产物。过量的底物分子聚集在酶分子上就可能生成无活性的中间产物。这个中间产物是不能分解为反应产物的。

其反应式如下：



其中： nS 为过量的底物分子群； ES_{1+n} 为无活性的中间产物。

四、抑制剂对酶促作用的影响

酶促反应是一个复杂的化学反应，有的化学物质能对它起促进作用，但也有许多物质可以减弱、抑制甚至破坏酶的作用，后种物质称为酶的抑制剂。由于抑制而引起的作用称为抑制作用。

酶的抑制剂有许多种：重金属离子(如 Ag^+ 、 Hg^{++} 、 Cu^{++} 等)、一氧化碳、硫化氢、氰氢酸、氟化物、有机阳离子(如生物硷、染料等)、碘代乙酸、对氯汞苯甲酸、二异丙基氟磷酸、乙二胺四乙酸以及表面活性物质等。

有的抑制作用可加入其它物质或用其它方法解除，使酶活性恢复。这种抑制称为可逆性抑制。例如，抗坏血酸(维生素G)对于酵母蔗糖酶具有较强的抑制作用，但加入半胱氨酸后这种抑制即解除。相反，有的抑制作用不能因加入某种物质或其它方法而解除，这种抑制称为不可逆抑制。例如，某些磷化合物对胆硷酯酶的作用和氟化物对黄素酶的作用等。

研究抑制作用的机制无论在理论上、实践上都有重要意义。某些物质使生物体引起中毒现象，往往是由于酶或酶系被损害。例如，杀虫剂和消毒防腐剂的应用就是由于它们对昆虫和微生物的酶的抑制作用。同时，这个研究还有助于阐明酶的催化本质和机制。因为，抑制作用可以是由于某种抑制剂与酶的活性部位结合，阻碍了中间产物的形成或分解，或由于酶的变性作用等所造成。但因变性而引起的抑制作用无特异性，不属本节讨论范围。现就酶活性有特异抑制的抑制物讨论如下：

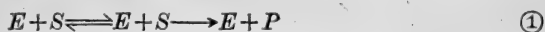
从酶的抑制动力学而言，可分为竞争性抑制与非竞争性抑制两种。

(一) 酶的竞争性抑制

抑制剂同底物对酶分子的竞相结合而引起的抑制作用称为竞

竞争性抑制。其反应速度决定于抑制剂和底物对酶分子的亲和力。

这种抑制作用，有两个反应竞相进行：



其中： I 为抑制剂， $[EI]$ 为抑制剂与酶结合的无活性中间产物。 K_i 为 EI 的离解常数。 E_0 为酶的总浓度。根据质量作用定律：

$$([E_0]-[ES]-[EI])[S]=K_m[ES] \quad (3)$$

$$([E_0]-[ES]-[EI])[I]=K_i[EI] \quad (4)$$

解出 $[ES]$ 并消去 $[EI]$

$$[ES]=\frac{[E_0]}{\frac{K_m}{[S]}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)+1}$$

由于 $v_i=K[ES]$ (实际反应速度)，而无抑制时的最大速度 V 与 $[E_0]$ 成比例。

因此：

$$v_i=K[ES]=K\frac{[E_0]}{\frac{K_m}{[S]}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)+1}$$

或：

$$\frac{v_i}{V}=\frac{1}{\frac{K_m}{[S]}\left(1+\frac{[I]}{K_i}\right)+1} \quad (5)$$

由⑤式与米氏方程式比较，(5)式只多出 K_m 乘以 $1+[I]/K_i$ 。因此，在竞争性抑制中 K_m 的值增加了。

从⑤式可知，如果 $[S] \gg K_m(1+[I]/K_i)$ ，则 v_i 便接近于或等于 V ；若 K_i 值小而 $[I]$ 值大，则即有抑制作用，其抑制程度决定于 $[S]$ 。

正如米氏方程式一样，⑤式也可用直线表示：

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_i} &= \frac{1}{V} \left(K_m + \frac{K_m[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \\ &= \frac{K_m}{V} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \end{aligned} \quad (6)$$

这里，斜率不是 K_m/V ，而是 $K_m/V \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ ，即斜率增大了，但截距并未增加(图 2-14)。 $1 + [I]/K_i$ 称为抑制因子。

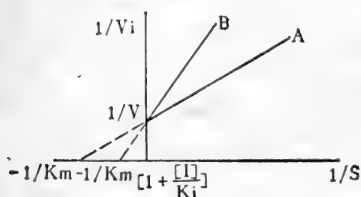


图 2-14 竞争性抑制

这种抑制的特点是底物浓度增加时，则抑制作用减小，即抑制作用的大小取决于抑制剂的浓度与底物浓度之比。如一些金属离子所引起的抑制及丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制作用，此类抑制剂往往具有与

底物分子相似的化学结构。

(二) 非竞争性抑制

非竞争性抑制与竞争性抑制有别，它不受底物浓度 $[S]$ 的影响。而取决于酶浓度、抑制剂浓度和 K_i 的大小。抑制剂也不必具有与底物相似的化学结构。因为酶分子的结合基团或部位不是原来与底物的结合基团。

根据质量作用定律，从(2)式得：

$$K_i = \frac{([E_0] - [EI])[I]}{[EI]}$$

或：

$$[EI] = \frac{[E][I]}{K_i + [I]}$$

设： v 为无抑制剂时的反应速度

v_i 为有抑制剂时的反应速度

因 v 与 $[E_0]$ 成比例， v_i 与 $([E_0] - [I])$ 成比例

即：

$$\frac{v}{v_i} = \frac{E_0}{[E_0] - [EI]} = \frac{E_0}{\left[E_0 \right] \frac{[E_0][I]}{K_i + [I]}} = \frac{1}{K_i / (K_i + [I])}$$

故：

$$\frac{v_i}{v} = \frac{K_i}{K_i + [I]} \quad (7)$$

由式(7)可知，有抑制剂时，反应速度受 K_i 和 $[I]$ 的影响，而与 $[S]$ 无关。当 $[S]$ 很小时，则 v_i/v 将近于 1，即 $v_i \doteq v$

将式(7)写成：

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_i} \cdot \frac{K_i}{K_i + [I]}$$

代入米氏方程式的倒数式

则得：

$$\frac{1}{v_i} = \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left(\frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} \right) \quad (8)$$

以 $1/v_i$ 对 $1/[S]$ 作图得图 2-15。由图可知，其斜率和截距都增大了，即各乘以一个抑制因子。

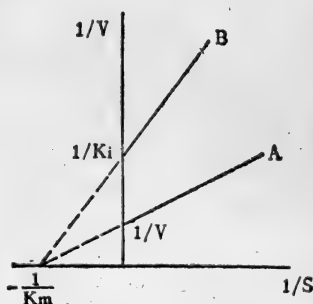


图 2-15 非竞争性抑制
A—无抑制剂
B—有抑制剂

五、激活剂对酶促作用的影响

同抑制的作用相反，许多酶促反应必须有其它适当物质存在时才能表现酶的催化活性或加强其催化效力。这种作用称酶的激活作用。引起激活作用的物质称激活剂。它和辅酶或辅基（或某些金属作为辅基）不同，如果无激活剂存在时，酶仍能表现一定的活性，而辅酶或辅基不存在时，酶则完全不呈活性。

激活剂种类很多，其中有无机阳离子，如 Na^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 NH_4^+ 、 Mg^{++} 、 Ca^{++} 、 Zn^{++} 、 Cd^{++} 、 Cr^{+++} 、 Cu^{++} 、 Mn^{++} 、 Fe^{++} 、 Go^{++} 、 Ni^{++} 、 Al^{+++} 等无机阴离子，如 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 CN^- 、 NO_3^- 、

PO_4^{3-} 、 AsO_4^{3-} 、 S^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 SeO_4^{2-} 等；有机物分子如维生素 G、半胱氨酸、巯乙酸、还原型谷胱甘肽以及维生素 B₁、B₂ 和 B₆ 的磷酸酯等化合物和一些酶。

(一) 无机离子的激活作用

金属离子的激活作用在微生物发酵过程中是一个比较常见的例子，如 Mg^{2+} 离子对酵母葡萄糖磷酸激酶的激活作用见图 2-16； Mg^{2+} 及 Zn^{2+} 离子对酵母磷酸葡萄糖变位酶的激活作用，如图 2-17。

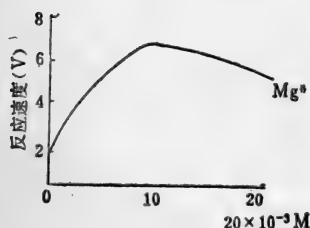


图 2-16 Mg^{2+} 对葡萄糖磷酸激酶的激活作用

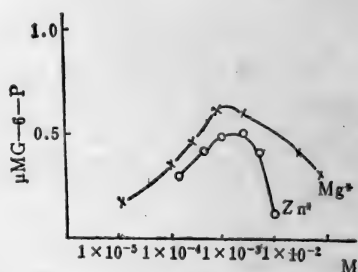


图 2-17 Mg^{2+} 及 Zn^{2+} 对磷酸葡萄糖变位酶的激活作用

从曲线可知，如果缺 Mg^{2+} 及 Zn^{2+} 时，其反应速度缓慢；增加其金属离子浓度，则反应速度加快。但当这些离子超过一定限度时则反应速度反而减弱。如酵母磷酸葡萄糖变位酶，当无 Mg^{2+} 离子存在时，其活性仅为 15%， Mg^{2+} 浓度在 $1 \sim 3 \times 10^{-3} M$ 时，其活性达到最大的程度。

一般认为，金属离子的激活作用是由于金属离子与酶结合，此结合物又与底物结合成三位一体的“酶-金属-底物”的复合物，这里金属离子使底物更有利于同酶的活性(部位)的催化部位和结合部位相结合使反应加速进行。金属离子在其中起了某种搭桥的作用。

至于无机负离子对酶的激活作用，在实践中也是常见的现象。例如氯离子(Cl^-)为淀粉酶活性所必需，当用透析法去掉 Cl^-

离子时，淀粉酶即丧失其活性。又 Cl^- 、 NO_3^- 和 $\text{SO}_4^{=}$ 为枯草杆菌 (BF-7658) 淀粉酶的激活剂。其作用机制还不大清楚，有人认为这些负离子为酶的活性所必需的因子，而且对酶的热稳定性亦起着保护作用。

(二) 酶原的活化

有些酶在细胞内分泌出来时处于无活性状态(称为酶原)。它必须经过适当物质的作用才能变为活性的酶。若酶原被具有活性的同种酶所激活称为酶的自身激活作用。

例如，胰蛋白酶原在胰蛋白酶或肠激酶的作用下，使酶原变为活性的酶。这种转变的实质是在酶原肽链的某些地方断裂而失去一个六肽的结果，使得酶原被隐蔽的活性部位显露了出来。其作用机制如图 2-18 所示。

实验测定表明，胰蛋白酶原和酶具有相同的分子量，都只有一个肽链。就氨基酸组成来说，两者仅有微小的差别；这都说明酶原变成酶时并不发生重大的改变。活化时只有一个肽键被打开，即在赖氨酸与异亮氨酸之间，在肽链的 N-末端部分失去一个六肽，同时隐蔽的活性基被解放出来或形成新的活性部位。

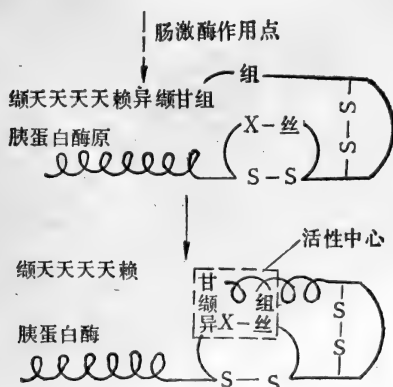


图 2-18 胰蛋白酶原的活化(X为特异性部位)

六、pH 对酶促作用的影响

氢离子浓度对酶反应速度的影响很大。每种酶都有其特定的最适 pH 值，大于或小于这个数值，酶的活力就要降低，甚至引起酶蛋白变性而丧失活性。

若以酶的活力或反应速度对 pH 值作图，可得到一个 pH-活力曲线(图 2-19)。处于曲线高峰的 pH 称为最适 pH，在最适 pH

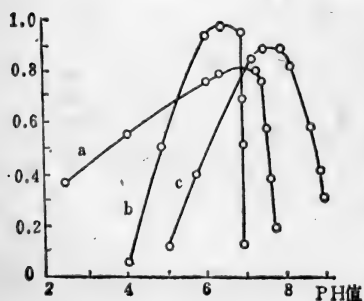


图 2-19 缓冲剂种类及 pH 对脲酶的影响

a—乙酸盐 b—柠檬酸盐 c—磷酸盐
脲的浓度为 2.5%

处酶的活力最大。每种酶都有其最适 pH 值。这是酶作用的一个重要特征。但是，最适 pH 值并不是一个酶的特定常数，因为它受其他因素的影响，如酶的纯度、底物种类和浓度、缓冲剂的种类和浓度以及抑制剂等的影响。因此，它只有在一定条件下才是有意义的。从图 2-19 可知，脲酶对尿素的催化反应，由于缓冲剂的不同，脲酶就显示出不同的

最适 pH 值。

pH 值对酶活力的影响，主要因为 pH 值改变底物和酶分子的带电状态。

(一) pH 值改变底物的带电状态

当底物为蛋白质、肽或氨基酸等两性电解质时，它们随着 pH 值的变化表现出不同的解离状态；带正电荷或带负电荷或不带电荷(兼性离子)。而酶的活性部位往往只能作用于底物的某一种解离状态。

(二) pH 值改变酶分子的带电状态

酶的化学本质是蛋白质，故具两性解离特性。pH 值的改变

会改变酶的活性部位上有关基团的解离状态，从而影响酶与底物的结合。假定酶在某一 pH 值时，酶分子的活性部位上存在一个带正电荷的基团和带负电荷的基团时，此时酶最易与底物相结合，当 pH 值偏高或偏低时，活性部位带电情况改变，酶与底物的结合能力便降低，从而使酶活力降低。例如蔗糖酶只有当它处于等电点状态时(成兼性离子时)，才具有最大的酶活力，而在偏酸或偏碱的溶液中酶活力都要降低或丧失。每种酶都有其最适 pH 值，如表 2-6 所示。

表 2-6 几种酶的最适 pH 值

酶名称	来源	底物	最适 pH 值
麦芽糖酶	酵母	麦芽糖	6.6
蔗糖酶	酵母	蔗糖	4.6~5.0
淀粉酶	麦芽	淀粉	5.2
淀粉酶	As.7658 枯草杆菌	淀粉	5.2
二肽酶	酵母	二肽	7.8
琥珀酸脱氢酶	大肠杆菌	琥珀酸	8.5~9.0
As.3942 蛋白酶	栖土曲霉	不同蛋白质	9.5~10.0

七、温度对酶促作用的影响

各种酶的反应有其最适的温度，此时，酶的反应速度最快。与普通化学反应一样，在酶的最适温度以下，温度每升高 10°C，其反应速度相应地增加 1~2 倍。温度对酶反应速度通常用温度系数 Q_{10} 来表示：

$$Q_{10} = \frac{\text{在}(T^{\circ} + 10^{\circ}\text{C})\text{的反应速度}}{T^{\circ}\text{时的反应速度}}$$

在生理温度下，酶反应的温度系数通常在 1.4~2.0 之间。此温度系数一般较无机催化反应和非催化的同样反应为小。

当温度超过酶的最适温度时，酶蛋白就会逐渐产生变性作用而减弱甚至丧失其催化活性。一般的酶耐温程度不超过 60°C，但

有的酶(来自芽孢菌)其热稳定性比较高,另外在有的酶中加一些无机离子,可增加其热稳定性。因此在应用酶制剂前必须做酶的温度试验,找出符合生产工艺要求的最适温度。例如,栖土曲霉(As. 3942)蛋白酶的最适温度的选择试验,可采用如下的方法:

将蛋白酶与酪蛋白混合,在不同的温度下保温,测得酶活力的数据绘成温度对酶活力的曲线,如图 2-20 所示。

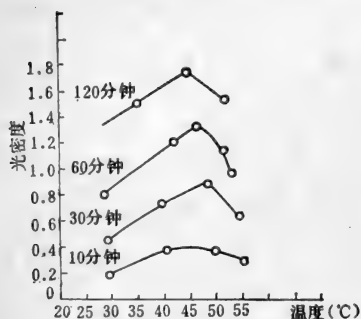


图 2-20 温度对 As 3.942 蛋白酶反应速度的影响

从图表明,保温时间在 30 分钟以内,45~50°C 酶活力最高。随着保温时间延长,最适温度降低。保温 120 分钟,在 40~45°C 酶活最高。如保温时间为 10 分钟,该酶在 30~40°C 时较为稳定。超过 50°C 时酶活力迅速下降,直至 60°C 时酶几乎全部变性失活。

活。

试验结果说明,选择酶的最适温度和酶反应的时间有关,反应时间长,则最适温度要低一些。若最适温度选择得高,则酶容易变性失活。在制革厂采用蛋白酶脱毛时,一般选用最适温度 40°C 为宜。温度过高酶容易失活而达不到脱毛的目的,同时也会产生烂皮现象。温度过低则酶脱毛时间延长,影响生产效率。由此可知,酶的最适温度不象 K_m 值那样为酶的特征常数。它是随酶反应时间变化而改变的。

至于低温对酶促反应的影响,一般地说,在低温下(如 0°C 左右或更低)酶活力降低,但酶活性不受破坏。一旦升高温度也就能恢复其原有的催化活力。

第七节 酶的命名、分类及应用

一、酶的命名

由于酶的化学结构已弄清楚的为数不多，所以还不能按其化学结构命名。目前，有习惯命名法和系统命名法两种。

(一) 习惯命名法

习惯命名法主要根据被酶作用的底物来命名，如水解淀粉的酶称为淀粉酶，水解蛋白质的酶称为蛋白酶等，有的还加上其来源，如细菌淀粉酶、枯草杆菌蛋白酶等。

这种命名方法比较混乱，往往同一种酶有好几种名称。例如， α -淀粉酶，又名液化型淀粉酶或糊精淀粉酶或淀粉 α -1,4糊精酶。同时，有的将两种不同的酶使用同一名称。例如，L-乳酸:NAD氧化还原酶与L-乳酸:细胞色素 B_2 氧化还原酶，它们是两种不同结构的酶，但都能催化L-乳酸脱氢生成丙酮酸。所以，它们都称为乳酸脱氢酶。

(二) 系统命名法

随着生产和科学的发展，新发现的酶越来越多，习惯命名法已不能适应发展的要求。国际酶学会经过讨论于一九六一年提出了一个系统的分类及命名原则（并于1964年修订），已为国际生化协会所采用。此法将所有的酶根据其所催化的反应类型，把酶分为六大类：① 氧化还原酶类；② 转移酶类；③ 水解酶类；④ 裂解酶类；⑤ 异构酶；⑥ 合成酶类。再根据底物及被作用基团的性质，每一大类又可分为若干亚类及次亚类。每一次亚类直接包括若干个别的酶。各级分类及个别的酶，均以数字表示其规定的编号。所以每一种酶的编号有四种数字，用圆点分开，如醇脱氢酶的编号为E.C.1.1.1.1，其中第一数字“1”代表氧化还原酶类，第二数字“1”代表醇基，即表示底物中发生氧化的基团性质，第三数字“1”代表受体为NAD或NADP，即表示氢或电子

的受体类型，第四数字“1”则代表此酶在次亚类中编为第一号，E.C为酶委员会代号。又如己糖激酶的编号为E.C.2.7.1.1，前三个数字表示该酶所属的大类、亚类、次亚类，由此可知该酶的催化类型和性质，第四个数字则表示该酶在次亚类中的位置。

这种命名及分类法有许多优点，除了可作为系统分类和识别酶的催化特性外，还可避免将全部酶名录连续编号（即如果发现一个新酶属于名录中的某类，则会影响其后一切酶的编号）的缺点。

二、酶的分类及应用

酶的种类很多，已研究的酶接近二千种，国内外应用于生产实践的有一百二十种左右，根据国际生化会议，按酶所催化的类型，分为如下六大类。

（一）氧化还原酶类

氧化还原酶类是催化物质进行氧化还原反应的酶类，其反应通式为：



其中 AH_2 为供氢体， B 为受氢体。根据供氢体的性质，一般又可分为氧化酶和脱氢酶两类。

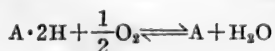
1. 氧化酶类

（1）催化底物脱氢，氧化生成 H_2O_2 ，通式为：



这类酶需要 FAD 或 FMN 为辅基。此酶作用时，底物脱下的氢先交给 FAD ，使之成为 $FAD \cdot 2H$ ，然后 $FAD \cdot 2H$ 与氧作用，生成 H_2O_2 ，放出 FAD 。例如葡萄糖氧化酶等。

（2）催化底物脱氢，氧化生成水，通式为：



例如多酚氧化酶，它催化含酚基的化合物氧化成醌，然后这醌类

再经一系列脱水、聚合等反应，最后可生成黑色物质。

2. 脱氢酶类

此类酶催化直接从底物上脱氢，例如醇脱氢酶、谷氨酸脱氢酶等。

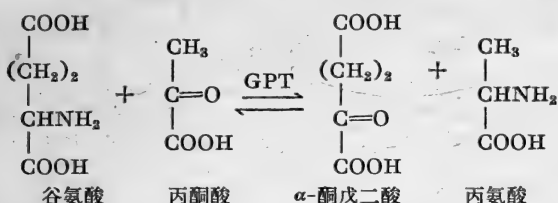
(二) 转移酶类

此类酶能催化一种化合物分子上的基团，转移到另一种化合物分子上。其反应通式为：



式中R为被转移的基团，它可以是醛基、酮基、磷酸基、糖苷基及氨基等。

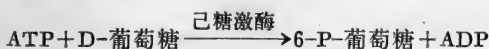
谷丙转氨酶(简称GPT)便属于此类。其催化的反应式为：



谷草转氨酶(GGT)为谷氨酸与草酰乙酸之间的氨基转移酶。

这两种转氨酶在医学上用作检验肝功能的一个指标。血液中转氨酶单位高，反映肝细胞病变损坏大，故进入血液中的酶也就多。

又如己糖激酶为磷酸基转移酶，其催化的反应式为：



由于反应过程中伴随着能量转移，故习惯上称为“××激酶”。

(三) 水解酶类

此类酶催化大分子物质加水分解成为小分子物质，其反应通式为：



式中A-B代表底物。

这类酶大都属于细胞外酶。在生物体内分布最广,数量也多,应用也最广泛。例如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、果胶酶、核糖核酸酶及纤维素酶等。

(四) 裂解酶类

此类酶催化一个化合物分解为几个化合物或其逆反应,其反应通式为:



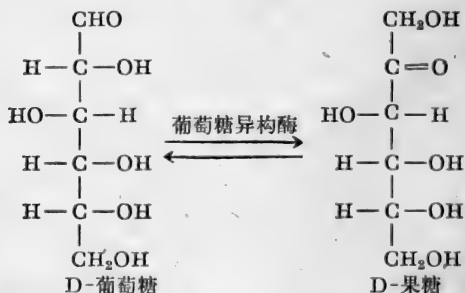
例如脱羧酶催化分子中的 G—C 键裂解,产物中有 CO₂;脱水酶催化分子为 G—O 键裂,产物中有 H₂O;脱氨酶催化分子中的 G—N 键裂解,产物中有氨;醛缩酶催化分子中的 C—C 键裂解,产生醛。

(五) 异构酶类

此类酶催化同分异构化合物之间的互相转化,即分子内部基团的重新排列。其通式为:



例如葡萄糖异构酶催化葡萄糖转变为果糖的反应,目前生产上已应用此酶使葡萄糖制成果糖与葡萄糖的混合糖浆,以提高甜度应用于食品生产。其反应式如下:



(六) 合成酶类

此类酶一般是指在有腺苷三磷酸(ATP)参加的合成反应。这类酶关系着许多重要生命物质的合成,如蛋白质、核酸等的生物合成。其通式为:

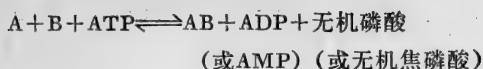
表 2-7

生产上常用微生物酶及应用

酶名称	酶来源	最适作用条件		应 用
		(pH)	温度(°C)	
液化型、淀粉酶	枯草杆菌	6.0~6.4	85~94	水解淀粉制葡萄糖、饴糖、糊精。棉布退浆、酒精发酵、啤酒酿造、制醋、酱油酿造、饲料加工等
糖化型淀粉酶	黑曲霉、红曲霉	4.5~4.8	60~65	
蛋白酶	枯草杆菌、栖土曲霉、米曲霉、黑曲霉、灰色链球菌、雪白曲霉等	1186	40~43	皮革脱毛、酱油酿造、胶卷回收、丝绸脱胶、洗涤剂饲料加工、明胶生产及医药等
		6.8~7.5 3942		
		7.2~7.4 1398	45~50	
		7.5~8.0 5114	40~45	
		7.0~8.0	50~55	
脂肪酶	假丝酵母、青霉菌、类酵母、米根霉等	7.5	40	绢纺脱蜡、羊毛脱脂、山羊皮软化、洗涤剂、医药、食品制造等
纤维素酶	木霉、根霉、黑曲霉、青霉	4.5	45	酒类发酵、毛织品除草刺、食品生产、糖化饲料等
半纤维素酶	木霉等	4.5	40	纸浆发酵、糖化饲料、毛织品除草刺、棉布脱棉子壳
果胶酶	黑曲霉、黄曲霉、米曲霉、枯草杆菌、马铃薯芽孢杆菌	3.0~3.5	50	麻的精炼、毛织布除草刺、柑桔脱囊衣、果汁酒类澄清、纸浆发酵、蔬菜加工等
木质素酶	担子菌			纸浆发酵、棉布脱棉子壳
核糖核酸酶	枯草杆菌、米曲霉、桔青霉、酵母及链霉菌	6.2	37	水解核糖核酸生产各种核苷酸
葡萄糖氧化酶	青霉、黑曲霉	5.6	30~38	食品防腐剂、干蛋白脱葡萄糖医药等
过氧化氢酶	青霉、黑曲霉	6.8	25	食品防腐、分解漂白时残存H ₂ O ₂
L-天冬酰胺酶	大肠杆菌、胡萝卜软腐杆菌等	8.5	37	抗癌药、治疗白血病等
酰胺酶	大肠杆菌			制造新型的青霉素

续表

酶名称	酶来源	最适作用条件		应用
		(pH)	温度(°C)	
谷氨酸脱羧酶	大肠杆菌	4.7	37.5	分析试剂、测定氨基酸
葡萄糖异构酶	巨大芽孢杆菌、短乳酸杆菌、产气气杆菌等	8.0~8.5	80	将葡萄糖转变为果糖制混合糖浆, 提高食品甜度
蔗糖酶	啤酒酵母、面包酵母、大肠杆菌、米曲霉等	4.6~5.0		蔗糖转化剂、糕点制造、人造蜂蜜、糖果制造
柚苷酶	黑曲霉、佗螺壶菌等	4.5	40	果汁脱苦味、葡萄糖除去杂味
橙皮苷酶	黑曲霉	3.5	60	柑桔罐头、果汁中防止产生混浊
花青素酶	黑曲霉	4.0	60	防止水果罐头果肉变色、白葡萄酒酿造时去红色素
凝乳酶	毛霉			蛋白质水解、干酪制造
香味酶	霉菌、血红色佗螺孔菌			改良干酪及黄油的香味
单宁酶	黑曲霉、黄柄青霉			食品脱涩、酶的精制、分解单宁、生产没食子酸
乳糖酶	脆壁酵母、球状假丝酵母			防止冰淇淋及脱脂炼乳中乳糖析出
蜜二糖酶	橄榄色链霉菌变异菌株等			分解妨碍蔗糖析出的棉子糖, 提高蔗糖质量
脂肪氧化酶	霉菌、细菌			面包制造中使胡萝卜素氧化脱色, 面包变白, 分解脂肪酸
角蛋白酶	脆弱链霉菌			角蛋白水解、医药、皮革脱皮
青霉素酶	蜡状芽孢杆菌、枯草杆菌			将青霉素分解成新的青霉素, 青霉素鉴定拮抗青霉素敏感症等
链激酶	链球菌			溶血酶原之激活、医药
腺嘌呤核苷酸脱氨酶	米曲霉			腺苷酸脱氨、次黄嘌呤核苷酸的制造



生产上常用微生物酶及其应用如表 2-7 所示。

第八节 酶在细胞内的分布

正象有生命的地方就有蛋白质一样，有生命的地方同样有酶的存在。酶作为催化剂在生物体中是互相协调、制约，成为有机的统一，保证了生物体内的物质按一定的代谢途径进行，而细胞内的各个组成部分都具有特殊的功能。因此，与之相适应的细胞内各种酶的分布，也有其一定的位置与次序。

根据酶的活动部位，通常可将酶分为胞外酶和胞内酶两大类。胞外酶是由细胞产生后分泌于细胞外面进行作用的酶，这种酶主要包括水解酶类（如水解多糖、寡糖、蛋白质和酯类的酶）。而胞内酶是由细胞产生并在细胞内部起作用的酶，这类酶的种类很多，如氧化还原酶类、转移酶类、裂解酶类、异构酶类及合成酶类等。这些胞内酶在细胞内并不是相互混杂在一起，而是各有其一定的区域。有些酶类在细胞表面的质膜上活动。大多数酶是在细胞原生质内活动，有的则呈可溶性的游离状态存在，有的酶是和细胞内的特定结构结合在一起。

活动在质膜上的酶，称“表面酶”，其中主要是渗透酶，它可把培养基中的某些营养物质传递到细胞内部。在好气细菌的细胞质膜上还存在有呼吸作用的酶类，如某些脱氢酶和细胞色素等。

真核细胞是由细胞核、细胞质、细胞质膜和细胞壁等部分组成。在细胞核和细胞质中还有许多细微结构（称为亚细胞结构），如细胞核中有核仁和染色体，外面还有一层核膜。细胞质中有线粒体、内质网（内质网的碎片称为微粒体）和核蛋白体等，外面还有一层细胞膜。

有关发酵的酶类在细胞质内呈可溶性状态存在。有关呼吸的

酶类则大多数结合在特定的亚细胞结构上，这种结构在细菌中是细胞质的内膜上。有关三羧酸循环的酶都溶于线粒体内部的浆液中(真菌有线粒体，而细菌则没有线粒体)。由于各种不同的酶在细胞内有着严格的作用区域。这样在细胞的生命活动过程中，各种物质的代谢才能有条不紊地顺利进行。

第九节 酶的分离、提纯及保存

酶存在于一切生物细胞，种类繁多。五十年代以来由于生化分离技术及生化工程的进展，酶的分离、提纯技术愈来愈快速、精细并向连续化自动化方向发展。酶的分离、提纯是为研究酶的结构、催化机理、专一性以及结构与功能关系等问题的先决条件，也为酶的应用开辟了广阔的途径。

目前工业上多采用微生物发酵来生产酶制剂。微生物酶制剂的生产不受气候及地理环境的限制，而且微生物种类繁多，培养时间短，繁殖快，含酶量丰富，还可通过诱变育种来提高酶的产量。

由于生产的酶与大量的其他物质同时存在。因此，就必需经过分离、提纯，有的还要经过结晶纯化，以便作为酶学研究及某种实际应用。

至于对某一种酶的具体制备方案，通常根据酶的来源、性质及纯度要求来确定。在每一步操作中均需进行酶活力测定，以便了解酶的提纯情况以及计算酶的得率。

酶的提取及纯化，实质上就是一种蛋白质的提取及精制过程，因此在操作过程中应避免高温、过酸过碱及重金属离子的混入以及其他理化因素的影响以防止酶蛋白变性。

一、酶的抽提

提取就是用溶剂将酶分离出来。不同的酶采用不同的抽提方

法。对于胞外酶，如为固体培养，则加水浸泡过滤即得，麸皮浸出液即为淀粉酶的提取液。如为液体培养，则不需要经过抽提，只要将发酵液过滤，除去菌体后，其滤液即可供进一步提纯用。而提取细胞内酶就必须先收集菌体，然后用适当方法将细胞结构破坏(主要是破坏细胞膜)，使酶释放出来，然后用适当的溶剂进行抽提。破坏细胞结构的方法有下列几种：

(一) 机械破碎

即将菌体加石英砂或玻璃粉或氧化铝等后研磨。

(二) 菌体自溶

自溶就是细胞死亡后本身结构的自我消化，常用于微生物酶的提取。在自溶过程中常采用保温的办法以提高效果，如酵母细胞壁厚不易破坏，故从酵母细胞制备酶制剂时，常将酵母悬浮液保温，待其自溶后再分离提纯。有的还加氯仿、甲苯、三氯乙烯等有机溶剂来促使细胞结构破坏。在自溶过程中可能会产生酸(如乳酸、磷酸等)，故要用缓冲剂来维持 pH 值的稳定，但同时也要注意某些缓冲剂的离子的活化作用。

(三) 其他方法

如用丙酮处理菌体，因它可溶解细胞壁使酶释放出来。溶菌酶亦可使某些细菌细胞壁解体，然后进行酶的分离。此外还可用超声波、冻融及从高压急速减压等方法也是使细胞结构解体的有效方法。

二、酶的纯化

酶的抽提液中含有大量杂质，如杂蛋白(非酶蛋白及一些其它酶)、糖及无机盐等。这些杂质来自菌体细胞及培养基。纯化的目的就是分离除杂以提高酶的纯度及其活力。

酶的纯化过程是一种严密的分离技术，应该特别注意到酶的特性。除少数酶外，大多数酶是对热很不稳定的。随着酶的逐渐提纯，非酶蛋白的除去，蛋白质之间的互相保护作用也就逐渐减

少。故酶愈纯，其稳定性愈差。因此，在纯化过程中应尽可能保持低温。在过滤或搅拌等操作中还应避免泡沫的形成，以免酶蛋白的表面变性，重金属离子对很多酶有破坏作用，也应尽量避免。同时，溶液的 pH 值、离子强度及蛋白质浓度都要严格控制，尽量避免酶蛋白的变性作用。

酶的纯化方法一般有如下几种：

(一) 盐析

盐析是分离提取蛋白质的方法，也是提纯酶常用的方法。在酶的提取液中加入硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 、硫酸钠 (Na_2SO_4) 或氯化钠 (NaCl) 等中性盐，使酶从溶液中沉淀出来，从而可使酶与一部分杂质分离，同时达到浓缩的目的。这种方法可以在室温操作，大多数中性盐对酶没有破坏作用。生产上用得最多的是硫酸铵盐析法。因为硫酸铵溶解度大，酶沉淀完全，它的废液可以回收作肥料。具体操作采用两种方式进行，一种是带菌体盐析，即在发酵液中直接加入硫酸铵，此法操作简便，酶得率高，但它的活力较低，杂质较多(除菌体外尚有培养基残渣)。如 BF 7658 淀粉酶，就是利用此法提取的。另一种是去菌体盐析，即先将发酵液压滤除去菌体及培养基残渣，然后加入硫酸铵，此法得率较低，但酶的活力高，杂质少，如 As. 3942 蛋白酶的提取则采用此法。至于具体选用哪一种方式处理，要根据生产的要求来决定。

以上所述为一次盐析法，经过这样处理后，酶制剂中的非酶蛋白基本上没有很好除去。要制成较纯的酶，就必须采用分段盐析。由于各种蛋白质在同一中性盐溶液中的溶解度不同，因此，可以采用逐步添加硫酸铵的方法，使它们在不同浓度的硫酸铵溶液中，先后沉淀析出，从而达到分离提纯的目的。这种方法称为分段盐析法。

盐析过程中应注意 pH 值的控制，把 pH 调节在它稳定 pH 范围内。同时在不影响稳定性的前提下，尽可能调节至接近它的等电点，使酶沉淀完全。

(二) 有机溶剂沉淀法

有机溶剂沉淀法是目前分离提纯酶的主要方法之一。它的主要优点是分辨能力比盐析法高。在一定条件下，蛋白质在一个比较狭窄的有机溶剂浓度范围内沉淀出来。一些能与水相溶的有机溶剂(丙酮、乙醇和甲醇等)，都能使酶沉淀，在生产上常用乙醇作为沉淀剂。

一般有机溶剂都是蛋白质的变性剂，当溶剂浓度过高时，酶变性失活比较严重。故溶剂浓度一般控制在 30~60%。

在纯化过程中，溶剂应少量地分批加入，并不断搅拌，防止局部过浓。在使用乙醇为沉淀剂时，加入速度更应缓慢，以免产生大量的热。当酶沉淀后要迅速分离，以减少酶与溶剂的接触时间，防止失活。由于酶在有机溶剂中即使在常温下也易变性失活，故应在低温下进行操作。此外对酶液的 pH 值控制同硫酸铵盐析法。对制备较纯的酶制剂，可采用有机溶剂分段沉淀法，其操作与分段盐析法相似。

(三) 选择性变性(沉淀)

选择一定的条件使那些杂蛋白变性沉淀，而此条件对所提纯的酶不产生有害的影响。这些方法中应用最多的是蛋白质的热变性。蛋白质常在一个狭窄的温度范围内受热变性沉淀。因此，有可能利用蛋白质热变性的差异，在严格的控制条件下，将酶抽提液加热到一定的温度，使一部分杂蛋白变性沉淀。例如，将黑曲霉的粗酶液在 pH 3.4、40°C 保温 150 分钟，其淀粉酶的活力丧失 90%，而所要制备的脂肪酶的活力仍保持 80% 以上，脂肪酶的比活力提高了三倍。

另外，有些酶在一定条件下对某种变性剂不敏感。例如，细胞色素 C 在 2.5% 三氯乙酸中不产生沉淀，而其它杂质却被沉淀而除去。

(四) 层析法

柱层析是酶提纯的最有效方法之一，近年来发展很快。应用

也较广。根据其填充剂的不同，可以分为下列几种：

1. 吸附层析法

利用吸附剂对不同蛋白质吸附能力的不同，可以将酶与杂蛋白分离。常用的吸附剂有氧化铝、活性白土和磷酸钙凝胶等。近年来，也有用酶的底物及纤维素衍生物作吸附剂。吸附剂的选择要通过试验来决定。操作时先把吸附剂装入柱内，将酶提取液上柱，使所需的酶被吸附，而杂蛋白随溶液流出。然后再用适当的溶剂将酶洗脱。

酶的吸附受 pH、温度、溶剂、吸附剂的状态、杂质及电解质浓度的影响。通常在弱酸性 ($\text{pH}=5\sim6$) 及低电解质浓度下比较适宜。

有些吸附剂对某些酶没有吸附作用。此时可以用来吸附杂蛋白，也能使酶纯化。

2. 离子交换层析

蛋白质(酶)是两性化合物，在一定的 pH 条件下，各种不同的蛋白质分子的极性基团离解情况也不相同。因此，可以用离子交换树脂进行分离。由于蛋白质分子量大，在它的多肽链上有各种不同的基团。这些基团与离子交换树脂有差不多的亲和力。所以，在这里不是单纯的离子交换作用，而同时伴有吸附作用在内。

一般离子交换树脂由于网孔太小，不适于酶的分离。适用于分离酶的离子交换树脂，如二乙氨基乙基纤维素 (DEAE-纤维素) 与二乙氨基乙基葡聚糖 (DEAE-Sephadex) 是常用的阴离子交换剂。它们在酶蛋白等电点的硷侧与带负电荷的酶蛋白起交换吸附作用。还有羧甲基纤维素 (CMG-纤维素) 与羧甲基葡聚糖 (CMG-Sephadex) 是常用的阳离子交换剂。它们在酶蛋白等电点的酸侧与带正电荷的酶蛋白起交换吸附作用。这些离子交换树脂具有吸附量大及洗脱时分辨能力高等优点，故适宜于分离纯度高的酶制剂。

3. 分子筛过滤层析(凝胶过滤层析)

分子筛是一类具有网孔结构的凝胶颗粒。它的作用相当于一只筛子，但与普通的筛子作用相反。小于筛孔的分子能够进入凝胶颗粒内部的网孔，大于筛孔的分子不能进入网孔而从凝胶颗粒的间隙中流出。利用这一原理，可以将各种不同分子量的蛋白质分离。

常用的分子筛有葡聚糖凝胶(Sephadex G)、聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Gel P)与琼脂糖凝胶(Bio-Gel A)等。其中葡聚糖凝胶是由葡聚糖与环氧氯丙烷以醚链($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-$)形式相互交联而形成网状结构。其结构式如下：

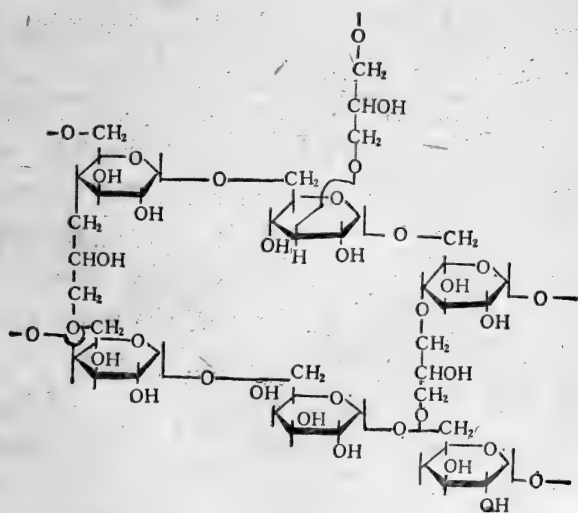


图 2-21 葡聚糖凝胶的化学结构

由图 2-21 可知，这个结构具有类似筛网那样的网眼，但孔眼很小，用一般显微镜是观察不到的。干燥的葡聚糖凝胶外观为白色球状颗粒，不溶于水、盐溶液、硷、弱酸溶液（强酸能使其糖苷键水解），加热时与氧化物接触则解聚。能吸水，吸水后体

积膨胀呈透明，这是由于它的分子中具有许多亲水基团，吸水后它的网眼张开。这些网眼能把水溶液中分子大小不同的溶质筛离，因而起到“分子筛”的功能。

每一种分子筛都有不同的型号，各型号的筛孔大小都不同。在纯化酶的工作中常用 Sephadex G 25 以上型号的产品(型号大，筛孔也大)。分子筛具有良好的分离效果，适宜于高纯度酶制剂的制备。

(五) 酶的结晶

为了研究需要，在酶的提纯过程中，当酶已经达到一定纯度时，即可进行结晶试验。但酶的结晶，至今尚未总结出普遍规律，通常是在硫酸铵的溶液中进行的。重要的是，必须注意控制温度和 pH，特别在加入硫酸铵溶液时需要逐步提高盐的浓度，不要太快，只有这样，才能获得良好的效果。

有时，也可以在某些有机溶剂中进行结晶，或利用特殊的沉淀剂制出晶体形式。例如用汞盐从酵母制出无活性的晶形烯醇酶的二价汞盐，经过对硫酸铵溶液(含有氰化物和氨)透析除去金属后，再加入更多的硫酸铵，使具有活性的酶呈非晶形状态而沉淀。

为了使酶从溶液中较好地结晶，应特别注意除掉某些杂质，如粘蛋白等。因为这些杂质会妨碍酶的结晶。除去粘蛋白的方法可以用氢氧化铜或丙酮或强酸来处理，但须防止其破坏作用，也可以用特种吸附剂以除去这些杂质。另外，为了获得纯酶，必须采用重结晶的办法。

三、纯度鉴定

对于高纯度的酶制剂必须进行纯度鉴定。活力高的酶制剂甚至结晶形式的酶也并不表明它已经是一个单一的纯粹蛋白质。例如，最初制得的牛胰核糖核酸酶在很多性质上都表现是一种单一的物质，但后来证明这种晶体还含有一个能分解蛋白质的成

分，通过进一步纯化可以把它们分开，直到1951年终于用纸层析法确证它是由两个具有活性的不同成分所构成。因此，要知道结晶的酶是否统一，必须用适当的标准和方法加以确定。

常用的纯度鉴定的方法有下列几种：

(一) 超速离心沉降法

这是一个测定蛋白质分子量的方法。不同分子量的蛋白质能在不同转速下沉降。如果仅在某一转速时出现沉淀，则说明酶制剂的纯度较高。

(二) 电泳法

如电泳后只出现一个组分，说明此酶为单一纯粹的蛋白质。

(三) 比活力测定

比活力大，则酶的纯度高。

四、酶的保存

酶是一种不太稳定的物质，易受各种因素的影响而失活，因此很难长期保存。如果保存条件合适，就可延长其保存期。在酶的保存中应注意以下几个条件：

(一) 干燥保存

绝大多数酶在干燥的固体状态比较稳定，这样可以增强其抗热性能，能在常温下保存数月或一年。干态葡萄糖氧化酶在 0°C 可保存两年。因此，通常采用低温干燥($<40^{\circ}\text{C}$)或真空冷冻干燥制成酶粉。

(二) 低温保存

酶在低温下比较稳定，酶制剂含水分越高，保存温度应该越低为宜，一般在 0°C 以下保存。酶溶液在冰冻状态下保存，有时可经久而不失其活性。但是，反复冰冻和融化会导致酶蛋白的变性。

(三) 避光保存

日光对酶有破坏作用，所以应避光保存，将酶制剂保存在避

光的地方为宜。有些酶在空气中易氧化失效，则宜放在真空中或惰性气体中保存。

(四) 其他保存方法

另外，把酶放在甘油中保存，也是比较稳定而有效的方法。

第十节 固相酶与模拟酶简介

由于生物化学及酶学工程的进展。固相酶与模拟酶的研究及应用引起了国内外的高度重视。

一、固相酶

酶作为催化剂具有专一性强，催化效率高及作用条件温和等许多优点。但亦存在着一些缺点，如受环境因素(如 pH 温度等)的影响较大、保存期短、与底物只能作用一次无法回收，而且有时不易与产物分开，给产品的提纯及质量的提高带来困难。针对酶在水溶液中催化方式的弱点。近年来发展了一项应用酶的新技术——固相酶。

固相酶是指将水溶性的酶用物理或化学方法处理，使之变成不溶于水的仍具有同样酶活力的酶衍生物。所以固相酶又称为水不溶酶。在催化反应中，它以固相状态作用于底物，这样不但保留了酶原有的种种优点，而且还具有反应后易与反应液分离、可反复使用、避免杂质带入产物等优点。酶固相化后稳定性增加，可延长酶的使用期和保存期，酶固相化后常可使用几百小时甚至几个月。固相酶还具有一定的机械强度，可以用搅拌或装柱的形式作用于底物溶液。如装成酶柱后，如同离子交换柱一样，底物溶液流经酶柱后即可生成反应产物，使酶反应管道化、连续化，从而可革新酶反应工艺。由于固相酶有这些优点，它将为酶的应用开辟新的途径。但目前固相化技术与经济上尚有某些困难。

(一) 固相酶的制备

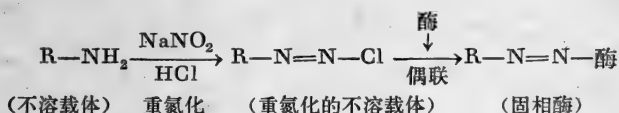
固相酶的制备方法很多，大致可分为下列三种方法：

1. 水不溶载体与酶结合

此法又可分为共价结合法，离子键结合法和物理吸附法三种。

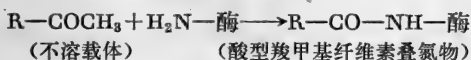
(1) 共价结合法 即酶的非活性基团通过共价键与水不溶载体结合而不溶化。此法操作较复杂，处理也较剧烈，有时会使酶活性部位破坏，酶的空间结构发生变化。但其优点是结合牢固，可长期使用。此法又可分为载体偶联法、肽键法及烷化法。

① 载体偶联法：有氨基的载体用亚硝酸(稀盐酸与亚硝酸钠)作用形成重氮化合物。然后再与酶的非活性基团，通过共价键相连接而形成重氮结合。酶蛋白中的游离氨基、组氨酸的咪唑基、酪氨酸的酚基等均能进行重氮结合，其反应式为：

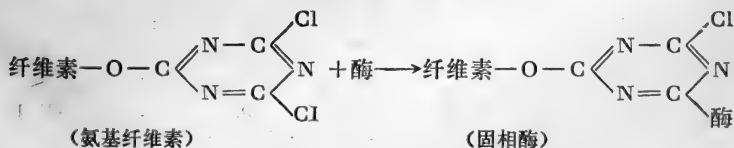


不溶载体有对-氨基苯甲基纤维素、氨基苯甲醚纤维素、氨基苯甲基甲氧纤维素、氨基苯纤维素、含氨基的离子交换树脂，聚氨基聚苯乙烯等。其中以对-氨基苯甲基纤维素用得较多。

② 肽键法：功能基载体与酶蛋白中赖氨酸 ϵ -氨基或 N-末端 α -氨基结合成为肽键而不溶。例如：



③ 烷化法：用有卤素基团的载体与酶蛋白中的赖氨酸 ϵ -氨基、N-末端 α -氨基或酪氨酸的酚基或半胱氨酸的-SH 基进行烷化，使酶不溶。



载体偶联法制成的固相酶如图 2-22 所示。

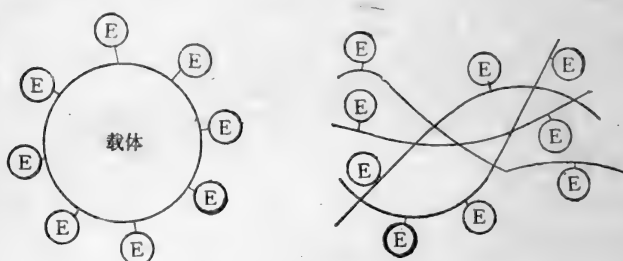


图 2-22 载体偶联法制成固相酶示意图

(2) 离子键结合法 酶是两性化合物，故能与离子交换树脂上的交换基团以静电引力相结合，常用的交换剂有 DEAE-纤维素及 DEAE-葡聚糖。

此法操作简单，处理缓和，活性部位破坏较少，可以得到高效能的固相酶，但键的结合力较弱，高离子强度下会解离出来。此法制备的固相酶有：乙酰化酶、天冬酰胺酶、转化酶、蛋白酶、过氧化氢酶、脂肪酶及核糖核酸酶等。

(3) 物理吸附法 酶被吸附到不溶的惰性载体上。常用的惰性载体有硅胶、活性炭、酸性白土、石英砂及纤维素等。例如，糖化型淀粉酶能被酸性白土吸附，液化型淀粉酶能被活性炭吸附。

离子结合和物理吸附制成的固相酶如图 2-23 所示。

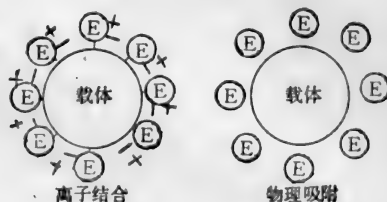
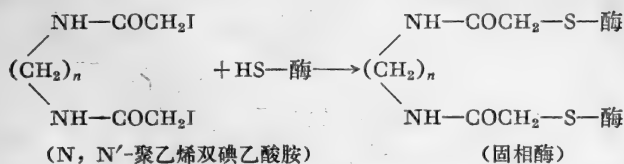


图 2-23 离子结合和物理吸附制成固相酶示意图

2. 交联法

用双功能基团试剂使酶蛋白分子间发生交联，凝集成网状结构而成为固相酶。例如：



具双功能基的化合物有：双偶氮苯、N-羧基氨基酸无水物、无水顺丁烯二酸的乙烯聚合物，N, N'-聚乙烯双碘乙酸胺和戊二醛等。以戊二醛应用较多，其反应式如下：

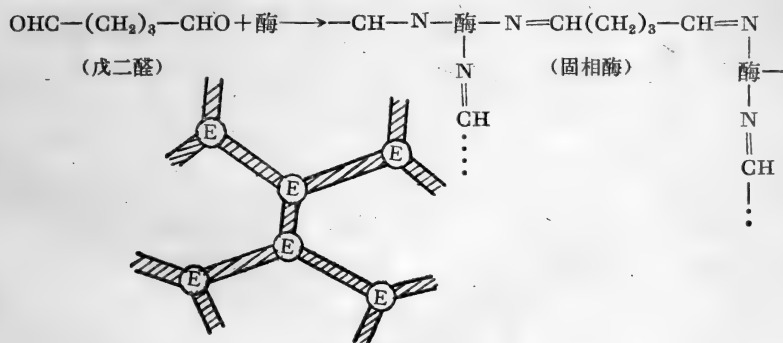


图 2-24 交联法制成的固相酶示意图

枯草杆菌蛋白酶及木瓜蛋白酶都可用戊二醛制成固相酶。

3. 包埋法

此法酶分子不发生结合或偶联，而是被包埋在凝胶的微格子中或在半透性的聚合物膜中，此法制成的固相酶有两种类型：

(1) 微小格子型 即酶被包埋在凝胶的微小格子中。常用的凝胶有聚丙烯酰胺凝胶、淀粉胶和硅橡胶等。其中以聚丙烯酰胺凝胶为最好，可用于制备乳酸脱氢酶、淀粉酶及木瓜蛋白酶等固相酶。

(2) 微胶囊型 即酶被包埋在半透性膜中。微胶囊型的膜是超箔性的具有半透性的高聚物所构成。膜内包含着酶的液滴。常用的膜有尼龙膜及火棉胶膜等。

尼龙膜可制备脲酶、天冬酰胺酶及胰蛋白酶等的微胶囊型固相酶；火棉胶膜可制备脲酶及过氧化氢酶等的微胶囊型固相酶。

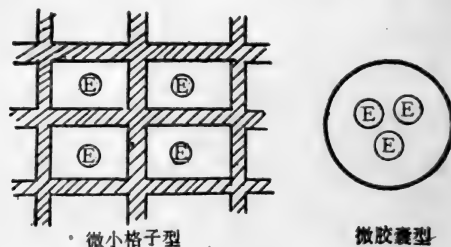


图 2-25 包埋法制备的固相酶示意图

包埋法与前述两种方法不同。酶分子本身在固相化过程中几乎不参加反应，所以对许多酶都可以固相化。但其缺点是酶活力不够高，且对作用于大分子底物的酶不适用，因为大分子底物不能进入凝胶小格或透过半透膜。

(二) 固相酶在工业上应用

固相酶具有许多独特优点，这是酶应用的方向。

在工业上利用固相酶代替水溶酶使得酶催化反应在工艺上得到革新。最简单的应用是将固相酶与底物一起在附有搅拌的槽中进行反应，反应结束后，不必将酶变性除去，只要用简单的过滤或离心分离就可把固相酶分离，又可重复使用，而反应产物中并无杂蛋白等杂质存在。

例如，用载体偶联法将 5'-磷酸二酯酶结合于葡聚糖凝胶 G 200 -对氨基苯衍生物载体上制成固相酶，采用缸式搅拌，分批酶解 0.5 % 的 RNA，在 67°C、pH 5 的条件下，经 50 次反复使用，固相酶的活力仍保持原有的 60 % 以上，其实际利用率比水溶酶提高了 10 倍以上。

粒状固相酶也可以上柱，象离子交换柱那样连续地进行酶反应。柱内或只用固相酶装满，或适当掺加惰性填充剂（如聚乙烯树脂、硅藻土、纤维素等）。当底物溶液流过酶柱后，流出液中就包含了产物。调节流速可达到不同程度的转化。这种方式可使酶反应连续化和自动化。

例如，采用 DEAE-葡聚糖凝胶作载体，使氨基酸酰化酶固相化后，装成酶柱就可连续地进行反应。另外，用固相的 α -淀粉酶和固相的糖化酶，连续生产葡萄糖等也取得了一定的效果。

以固相酶组成连续反应的多酶反应器代替微生物的多酶系统，这方面的研究工作也在进行中。例如，用聚丙烯酰胺凝胶包埋的己糖激酶、磷酸葡萄糖异构酶、磷酸果糖激酶和醛缩酶四个固相酶依次分段装成多酶反应器。当葡萄糖、ATP 和 Mg^{++} 的混合液通过酶柱，经过四个催化反应器即可得到 3-磷酸甘油醛。

另外，固相酶在化学分析及医药等方面也得到实际的应用。

在理论上，通过固相酶与天然存在酶的比较，对阐明酶的结构、活性部位以及酶反应机制等方面也具有重要的意义。

二、模拟酶

由于酶用途日益广泛，酶的固相化为酶的应用开辟了新的方式和途径。但到目前为止，酶制剂都是从生物体提取，因为酶在生物体含量少，故产量受到一定限制。如果能人工合成酶，则可大量生产和应用，这对生化工程的发展具有重要意义。

酶的人工合成是极为复杂的工作，目前尚不能用于工业生产。近年来，由于酶学研究的发展，对酶的结构与功能以及催化作用机理有了一定的了解。因此，有可能仿照酶的活性部位，用人工方法合成催化效率高的酶型催化剂，即为模拟酶。

目前，已有不少酶正在进行酶的模拟研究。如固氮酶、过氧化氢酶、糜蛋白酶，氧化还原酶、各种水解酶以及光合作用的酶等，其中研究最多的是固氮酶。

豆科植物的根瘤菌(固氮菌)中含有固氮酶,它能在常温常压下将大气中的氮转变为氨。而在合成氨工业则需要300大气压和500°C高温下,用铁为催化剂才能使氮转变为氨。因此,固氮酶的模拟极其重要。

关于固氮酶的化学结构、空间构型以及它的活性部位的组成。据目前研究表明,固氮酶有两种成分:一种是铁蛋白,含2~3个Fe,分子量约为4~6万;另一种是铁钼蛋白,分子量为27~30万。由于铁和钼在周期表上属于过渡元素。所以,在模拟时可以用其它过渡元素,如钛、钒来代替。目前已制成几种固氮酶模型,但催化能力还很低。

目前,模拟酶的研究仍处于开始阶段,但已取得了一定成果。从其发展来看,它的研究和应用具有强大的生命力。如果研究成功,那末不仅在根本上改变了发酵工艺的面貌,而且将引起现代化学工业上一场深刻的革命。

复 习 题

1. 何谓酶?其化学本质是什么?
2. 什么叫做辅酶?辅基?写出下列物质的代号及其酶催化作用中的功用:
辅酶 I、辅酶 II、辅酶 A、黄素腺嘌呤二核苷酸
3. 何谓酶的活性部位?试指出核糖核酸酶的活心部位?
4. 简述酶的结构与功能的关系。
5. 什么叫做酶的专一性?试举例说明之。
6. 试述中间产物学说的基本要点并举例说明之。
7. 阐述底物浓度对酶促反应的影响。试推导米氏公式并说明其意义。
8. 何谓固相酶、模拟酶?

第三章 核 酸

第一节 概 说

核酸与蛋白质一样，是生物体内极为重要的基本物质。现在已经知道，生物体内的一些最根本现象如生长、遗传、变异等都和核酸有非常密切的关系。

天然的核酸常常与蛋白质相结合，称为核蛋白。

核酸的发现比较晚(一八六九年)，由米歇尔(Miescher)首次从脓细胞的核中分离出来的，称为核素。这种物质的元素组成中含磷很多，并含有碳、氢、氧、氮。当发现核素在溶液中呈酸性时，就改称核酸。此后人们又从不同来源的各种细胞中都分离出了核酸。现在知道，核酸存在于一切生物中，连最简单的生物，如病毒和噬菌体中都含有。一般细菌中含有10~20% (干重计，下同)，酵母含6~8%，霉菌含1%，噬菌体含40~50%。

对于核酸的研究，最初人们并不十分重视，仅停留在核酸的化学成分研究方面，直到大量的实验证据证实了核酸是遗传信息的载体，是遗传物质。这一重要生物学功能的发现，使近三十年来对核酸的研究引起了广泛的注意。进一步研究证明，无论是用某些非天然的嘌呤碱或嘧啶碱的衍生物来取代核酸分子中的原有碱基成分，或是以理化因素来破坏核酸分子的某一环节，从而使核酸的特异结构发生任何改变时，都可引起出现突变或使其原有生物学活性的丧失及改变。微生物的诱变育种即基于此原理。为弄清生命现象的本质近年来对核酸的研究有了极为迅速的发展，成为生物学上(也是生物化学上)最重要的中心课题之一。

核酸根据其化学组成特点，可以分为两大类：一类称脱氧核

糖核酸(简称DNA),主要存在于细胞核内,微量存在于细胞质;另一类称核糖核酸(简称RNA),主要存在于细胞质内,微量存在于细胞核。两类核酸在细胞内主要都与蛋白质结合在一起以核蛋白的形式存在。生物体一般都含有这两类核酸,但对病毒而言,则只含有DNA或RNA。

通过对核酸结构的研究,在五十年代提出了DNA分子具有双螺旋结构的模型,认识了生物体的遗传特征主要由DNA决定,它通过RNA主宰蛋白质的合成(对某些病毒讲,则由RNA决定蛋白质的合成),决定蛋白质的种类和性质,而一定结构的蛋白质便带来一定的形态结构和生理特征。核酸则是通过细胞,一代一代地复制着,延绵着生物体的遗传特征。但在整个过程对遗传信息的调节控制,不明之处尚多,仍在继续研究之中。

近十年来,在分子生物学发展的基础上,形成的遗传工程,有可能按人类的需要在分子水平上加工和转移遗传物质,创造生物新品种。它为细胞分化、生长发育、肿瘤发生等有关高等生物的基础研究,提供了有效的实验手段,并可能为农业、工业和医药等某些生产领域的重大变革,开拓新的道路。

核酸研究的进展,不断地促进核苷酸及其衍生物在食品、医药和农业生产上的广泛应用。在食品方面,肌苷酸和鸟苷酸是强力助鲜剂,核苷酸也是“液体食品”的重要成分。核苷酸及其衍生物作为一类新型药物已应用于临床上,如三磷酸腺苷(ATP)、辅酶A、肌苷以及核酸降解产物5'-核苷酸混合液等,它们都是细胞机能调节的重要物质,应用很广。核酸类的抗癌药物如5'-氟尿嘧啶、5'-脱氧尿嘧啶等的应用也有很大发展。核酸降解液在农业上试验应用已广泛开展,在多种作物上取得良好的增产效果。

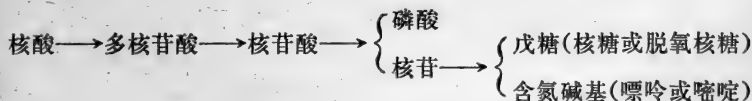
核酸工业的兴起开始于六十年代,在这以前,核酸主要是理论研究课题,制备核酸类物质主要是供作科研试剂用,大多从动植物体中提取。现在,工业上大量生产主要取之于微生物,常综

合利用发酵工业废菌体进行提取。如用啤酒酵母、面包酵母、酒精酵母、青霉菌以及谷氨酸产生菌等来生产腺苷三磷酸(ATP)、辅酶A、5'-核苷酸混合液等产品。此外还可用发酵法直接生产,如肌苷酸、肌苷的发酵及辅酶A的微生物合成法等,这些我国已投入生产。因之,核酸类物质的生产与发酵工业密切相关。随着我国社会主义革命和建设事业的深入发展,我国的核酸工业必将提高到一个新的水平。

第二节 核酸的化学组成

一、核酸的化学组成

核酸与蛋白质一样是高分子化合物。经不同程度的水解后,其产物可以有多核苷酸、核苷酸(单核苷酸)、核苷、含氮碱基(嘌呤与嘧啶)、磷酸、戊糖(核糖或脱氧核糖)。核酸的水解过程可表示如下:



从两类核酸的水解产物可看到它们的组成是有差别的,今将核酸的化学组成列于表3-1。

表 3-1 两类核酸的化学组成

核酸类别	碱 基		戊 糖	磷 酸
	嘌 呤 碱	嘧 啶 碱		
核糖核酸 (RNA)	腺嘌呤(A) 鸟嘌呤(G)	胞嘧啶(C) 尿嘧啶(U)	D-核糖	H ₃ PO ₄
脱氧核糖核酸 (DNA)	腺嘌呤(A) 鸟嘌呤(G)	胞嘧啶(C) 胸腺嘧啶(T)	D-2-脱 氧核糖	H ₃ PO ₄

从表 3-1 可看出两类核酸化学组成的差异主要在于戊糖的不同，核糖核酸含核糖，脱氧核糖核酸含脱氧核糖。另外在嘧啶碱的组成上亦有差异，核糖核酸含尿嘧啶而脱氧核糖核酸则代之以胸腺嘧啶。但在有些脱氧核糖核酸中（如枯草杆菌噬菌体中的 DNA）曾发现过尿嘧啶；而在有些核糖核酸（如酵母及一些细菌的 RNA）中也发现过一些胸腺嘧啶。

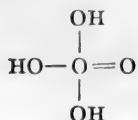
在不同来源的核酸中，也有一些其它碱基，常称为稀有碱基。如表 3-2 所示。

表 3-2 核酸中的一些其它碱基

碱基名称	核 酸 来 源
6-氨基嘌呤	某些变种大肠杆菌的 DNA 及酵母、鼠肝与某些细菌的 RNA
6-二甲氨基嘌呤	酵母、鼠肝与某些细菌的 RNA
2-甲基腺嘌呤	同上
1-甲基腺嘌呤	肝脏及酵母的 RNA
1-甲基鸟嘌呤	酵母 RNA
次黄嘌呤	酵母 RNA
5-甲基胞嘧啶	动植物的 DNA 及细菌的 RNA
5-羟甲基胞嘧啶	大肠杆菌噬菌体的 DNA
5-羟甲基尿嘧啶	枯草杆菌噬菌体的 DNA
3-甲基尿嘧啶	酵母 RNA
3-甲基胞嘧啶	酵母 RNA

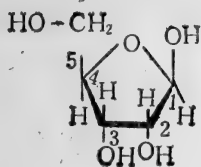
二、核酸水解产物的化学结构

1. 磷酸

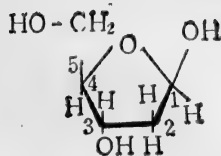


2. 戊糖

RNA 中含核糖；DNA 中含 2-脱氧核糖。它们皆为 D 系 β 型。



β -D-核糖

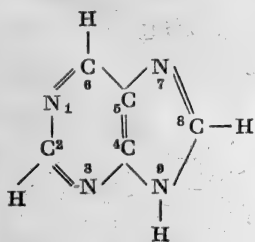


β -D-2-脱氧核糖

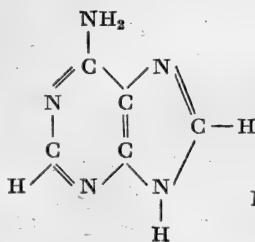
3. 碱基

是核酸中一类含氮的杂环化合物，呈碱性。核酸中的碱基是嘌呤和嘧啶的衍生物。

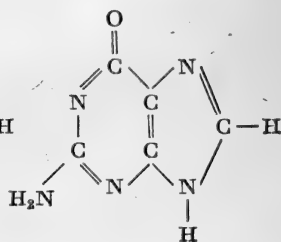
(1) 嘌呤碱 DNA 与 RNA 中有同样的嘌呤碱。



嘌呤

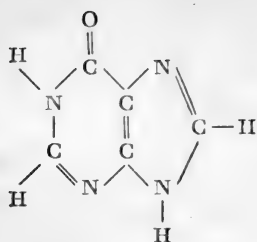


腺嘌呤(A)
(6-氨基嘌呤)

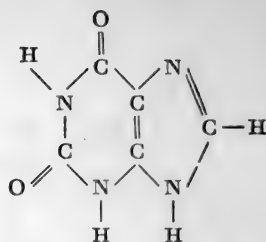


鸟嘌呤(G)
(2-氨基-6-氧嘌呤)

此外，其他重要的嘌呤衍生物有黄嘌呤、次黄嘌呤，次黄嘌呤即有名的助鲜剂肌苷酸的碱基。它们是核酸代谢的中间产物，存在于生物体内。

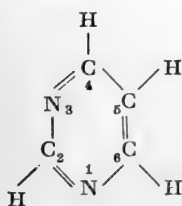


次黄嘌呤(HX)
(6-氧嘌呤)

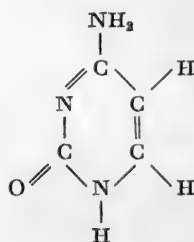


黄嘌呤(X)
(2,6-二氧嘌呤)

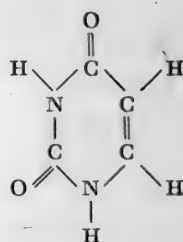
(2) 嘧啶碱 DNA 与 RNA 中最常见的嘧啶碱有三种。即胞嘧啶，尿嘧啶，胸腺嘧啶。



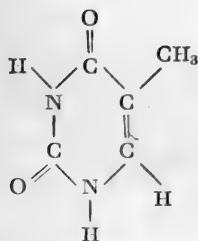
嘧啶



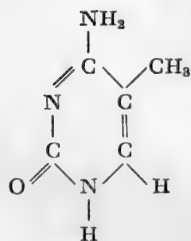
胞嘧啶(C)
(2-氧-4-氨基嘧啶)



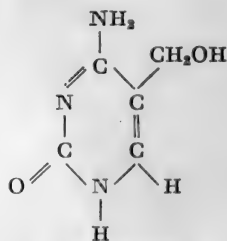
尿嘧啶(U)
(2,4-二氧嘧啶)



胸腺嘧啶(T)
(5-甲基尿嘧啶)



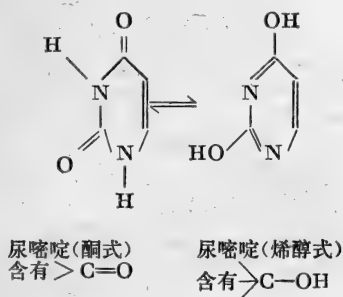
5-甲基胞嘧啶(C')



5-羟甲基胞嘧啶

此外还有嘧啶类稀有碱基，如5-甲基胞嘧啶，5-羟甲基胞嘧啶。在某些大肠杆菌噬菌体中，5-羟甲基胞嘧啶代替了胞嘧啶。

当嘌呤与嘧啶类化合物中含氧原子时（如尿嘧啶），在酮式（内酰胺—NH—CO—）和烯醇式（内酰亚胺—N=COH—）之间处于平衡状态。

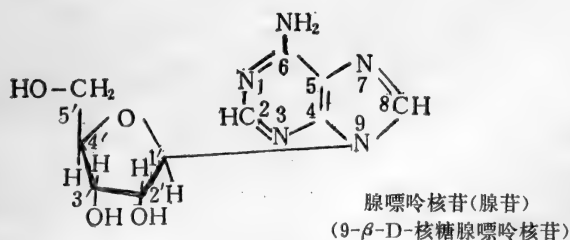


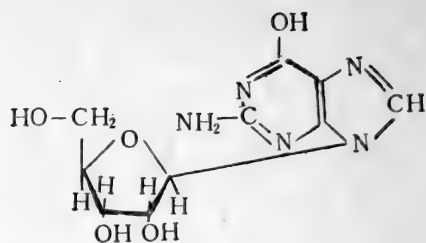
在生理 pH 时，酮式占优势，并且通过糖苷键与戊糖相结合的也是这个形式。

4. 核苷

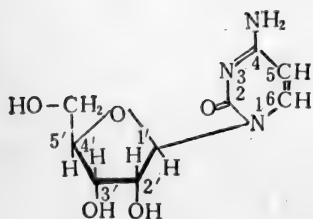
核苷是核糖与嘌呤碱或嘧啶碱的结合物。两者的结合是：核糖的第一位碳与嘧啶的 N-1 位相连成嘧啶核苷；与嘌呤的 N-9 位相连成嘌呤核苷，形成的糖苷键为 β -构型。为了避免混淆，把糖环上的碳原子标为 1'、2'……。

从 DNA、RNA 的不完全水解产物中，可分别得到四种核苷。如 RNA 水解可得到四种核苷即腺嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷、胞嘧啶核苷、尿嘧啶核苷。它们的结构如下：

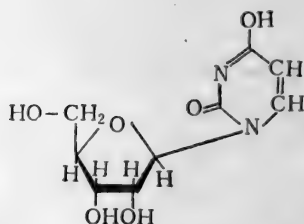




鸟嘌呤核苷(鸟苷)
(9- β -D-核糖鸟嘌呤核苷)



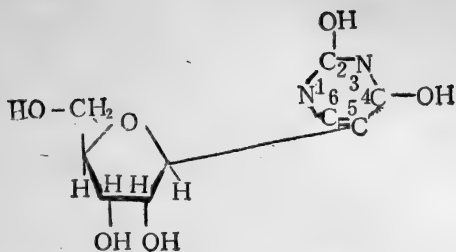
胞嘧啶核苷(胞苷)
(1- β -D-核糖胞嘧啶核苷)



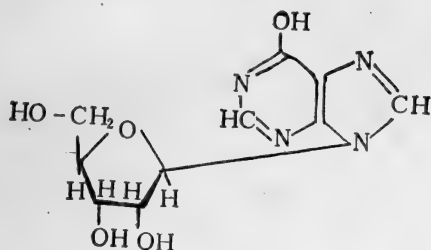
尿嘧啶核苷(尿苷)
(1- β -D-核糖尿嘧啶核苷)

DNA 水解亦可得四种相应的脱氧核苷，即腺嘌呤脱氧核糖核苷，鸟嘌呤脱氧核糖核苷，胞嘧啶脱氧核糖核苷，胸腺嘧啶核糖核苷。

某些 RNA 的水解产物中还可以获得少量 5- β -D-核糖尿嘧啶核苷，即核糖上第一位碳与嘧啶基上第五位碳相连而形成糖苷键。又称为假尿嘧啶核苷(用 φ 表示)。此外还有次黄嘌呤核苷，即肌苷。



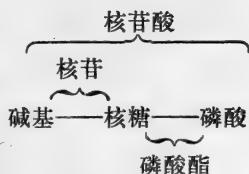
假尿嘧啶核苷(φ)
(5- β -D-核糖尿嘧啶核苷)



次黄嘌呤核苷(肌苷)
(9- β -D-核糖次黄嘌呤核苷)

5. 核苷酸

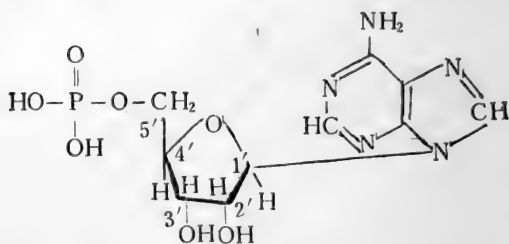
核苷酸是核苷的磷酸酯。它的简单结构如下：碱基和磷酸都连在糖上。



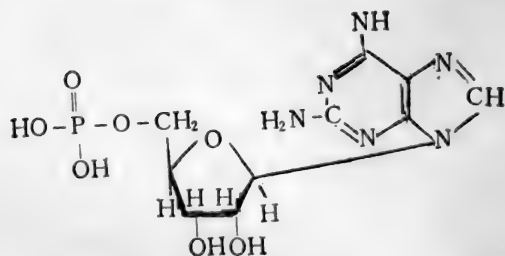
从核糖核苷形成的核苷酸称核糖核苷酸；从脱氧核糖形成的核苷酸则称为脱氧核糖核苷酸(脱氧核苷酸)。用碱法或酶法水解RNA和DNA时，可以分别得到四种核糖核苷酸和四种脱氧核糖核苷酸。四种核糖核苷酸为腺嘌呤核苷酸(AMP)、鸟嘌呤核

苷酸(GMP)、胞嘧啶核苷酸(CMP)、尿嘧啶核苷酸(UMP)。四种脱氧核糖核苷酸为腺嘌呤脱氧核苷酸(dAMP)、鸟嘌呤脱氧核苷酸(dGMP)、胞嘧啶脱氧核苷酸(dCMP)、胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)。

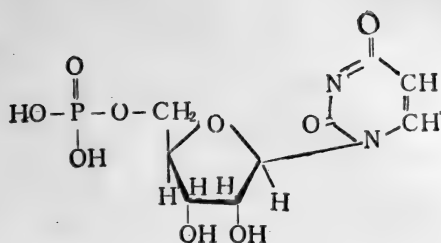
下面为 RNA 经 5'-磷酸二酯酶水解所得到的四种 5'-核糖核苷酸。



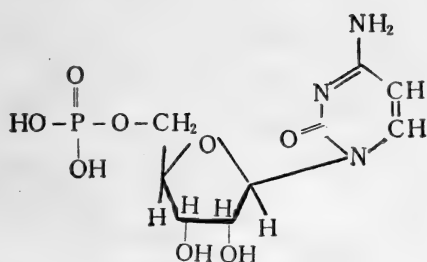
5'-腺嘌呤核苷酸
(5'-腺苷酸, 5'-AMP)



5'-鸟嘌呤核苷酸
(5'-鸟苷酸, 5'-GMP)



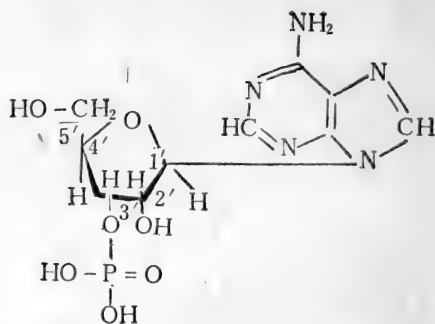
5'-尿嘧啶核苷酸
(5'-尿苷酸, 5'-UMP)



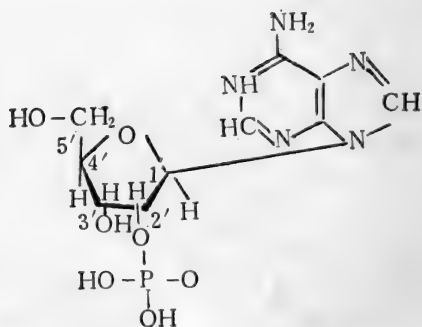
5'-胞嘧啶核苷酸
(5'-胞苷酸, 5'-CMP)

上述核苷酸，由于磷酸基连接在核糖的第五位碳上，故称为5'-核苷酸。

由于核糖核苷的糖环上的2'、3'、5位碳有三个自由的羟基，因此磷酸与核糖成酯键相连时，可以有三种方式。如以腺核苷为例，则能生成5'-腺苷酸、3'-腺苷酸及2'-腺苷酸。它们的结构如下：



3'-腺苷酸
(3'-AMP)



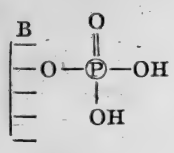
2'-腺苷酸
(2'-AMP)

同样，由鸟嘌呤核苷、胞嘧啶核苷及尿嘧啶核苷亦可分别形成各自的三种核苷酸。

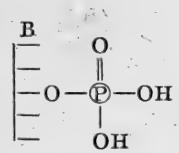
由 DNA 水解得到的四种脱氧核苷酸由于脱氧核糖的第二位碳上没有羟基，因此它们只有 3' 及 5' 脱氧核苷酸。

上述核苷酸的结构也可用下面简式表示。

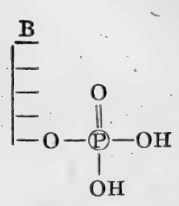
(B表示碱基, —表示糖基)



2'-核苷酸



3'-核苷酸



5'-核苷酸

第三节 核酸的分子结构

核酸是高分子聚合物，它的基本组成单位是核苷酸，对每类核酸来讲，它的核苷酸种类基本是四种，但由于数量很大，都是按一定的顺序相连而成，因此核酸的种类很多。它和蛋白质一样，都有一定的化学结构(一级结构)与立体结构。

一、核酸分子中核苷酸的连接方式(一级结构)

核酸与蛋白质、多糖一样，都是由某种同系物的小分子化合物经脱水缩合而形成了链状聚合物。蛋白质是由氨基酸所组成，由它们的氨基(—NH₂)与羧基(—COOH)之间缩合而形成肽键(—CO—NH—)相连接。同样，核酸是由核苷酸所组成，它们的连结方式是在磷酸基团与其相邻的核苷酸的戊糖的羟基(—OH)间缩合，即核苷酸之间是通过3'-5'-磷酸二酯键相连接而形成多核苷酸链。今将多核苷酸链中核苷酸间的连接方式表示如图3-1。在活细胞内的3'-5'-磷酸二酯键形成是一个复杂的过程，将在第十一章核酸的生物合成中予以讨论。

同样地RNA中多核苷酸间的连接方式可表示如图3-2。

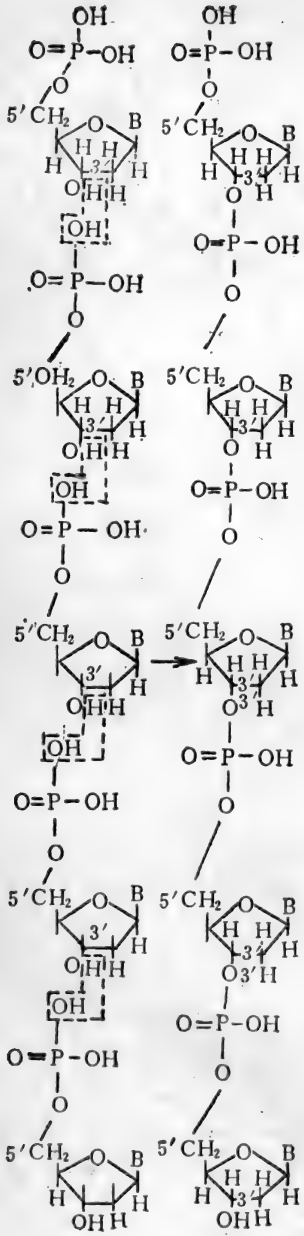


图 3-2 RNA 中的磷酸二酯键

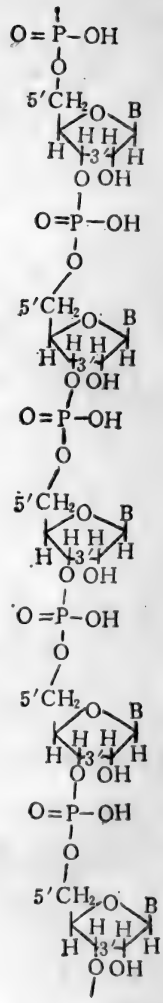
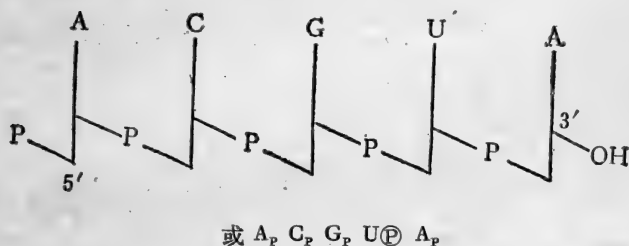


图 3-1 DNA 中多核苷酸链的磷酸二酯键 (链中的 5' 末端在图的上方。B—碱基)

在多核苷酸链一端的一个戊糖其 3' 位置 OH 基游离存在；另一端的 5' 磷酸酯亦呈单磷酸酯状态，这两个末端相应地称为 3' 末端及 5' 末端（相当于肽链的 N 端及 C 端，多糖链的还原性末端 C_1 端与非还原性末端 C_4 端）。

多核苷酸链亦可用下面的简式来表示，如一段有 5 个核苷酸所组成的多核苷酸链，可表示如下：



P——代表磷酸基 A, C, G, U——分别表示碱基

3', 5'——分别表示 3' 末端与 5' 末端

二、DNA 的双螺旋结构(DNA 的立体结构)

DNA 分子量大(核苷酸数目多)，纯化困难，因之要搞清楚一种 DNA 的核苷酸的排列次序就非常困难。对 DNA 是由许多核苷酸以 3', 5'-磷酸二酯键相联结而成为多核苷酸长链所构成，这是在四十年代就都已经了解。但对多核苷酸长链如何形成其立体结构以担负起携带大量贮存的遗传信息的生物学功能，则直到 1953 年由华特生(Watson)和克立克(Crick)根据许多资料提出了他们著名的 DNA 双螺旋模型才获得解答。它的理论要点如下：

(1) DNA 分子是由两条多脱氧核糖核苷酸长链组成，每条链的骨干是由磷酸二酯基通过 3', 5'-键与两个脱氧核苷基连接而成(参看图 3-1)。这两条链是右旋的，以相反方向围绕同一个轴盘绕，形成右旋的双螺旋结构。每转一圈的高度(螺距)为 34 埃

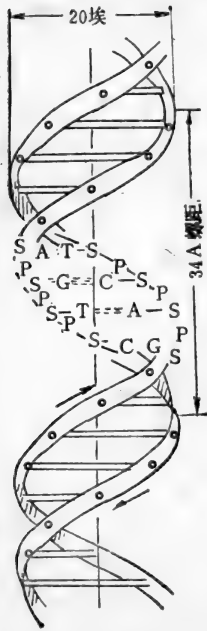


图 3-3 DNA 双螺旋结构示意图
S—脱氧核糖 P—磷酸

(Å, $1 \text{ Å} = 10^{-10}$ 米),其中含 10 个核苷酸单位(每个核苷酸高 3.4埃),螺旋的直径为 20 埃(见图 3-3)。

(2) 这两条链的骨架是糖和磷酸,链的内侧为嘌呤碱与嘧啶碱。两条链由碱基对之间的氢键相连,从而维持双螺旋的立体结构。

(3) 四种碱基相互形成氢键是有一定规律的,都是由腺嘌呤和胸腺嘧啶以氢键相连形成 $A \cdots \cdots T$ 对,由鸟嘌呤和胞嘧啶形成 $G \equiv \equiv \equiv C$ 对,见图 3-4。互相形成氢键的碱基常成对出现,所以称为碱基对。

(4) 由于 DNA 双螺旋结构中碱基之间的配对不是随意的,

总是 A 对 T, G 对 G,所以这两条链是互补的。如果一条链的一个区域碱基顺序是 $-A-G-G-G-$,那么互补链相应区域的顺序将是 $-T-C-C-C-$ 。碱基配对意味着磷酸-糖键在两条链上按相反方向延伸。从图 3-5 可看出一条链磷酸-糖键是从 3'到 5',而另一条互补链则从 5'到 3'。

DNA 双螺旋结构模型主要是根据碱基组成的测定和 X-衍射分析得出的。根据对不同来源的 DNA 进行碱基分析,发现它们的嘌呤核苷酸的总和与嘧啶核苷酸的总和相等,即 $(A+G) = (T+C)$;且其中 $A=T, G=C$ 。同一物种的 DNA 的碱基比 $(A+T/G+C)$ 相同;不同物种的 DNA 碱基比变化范围甚大,已发现不同微生物 $(A+T/G+C)$ 的值,可变动在 0.35~2.7 之间。见表

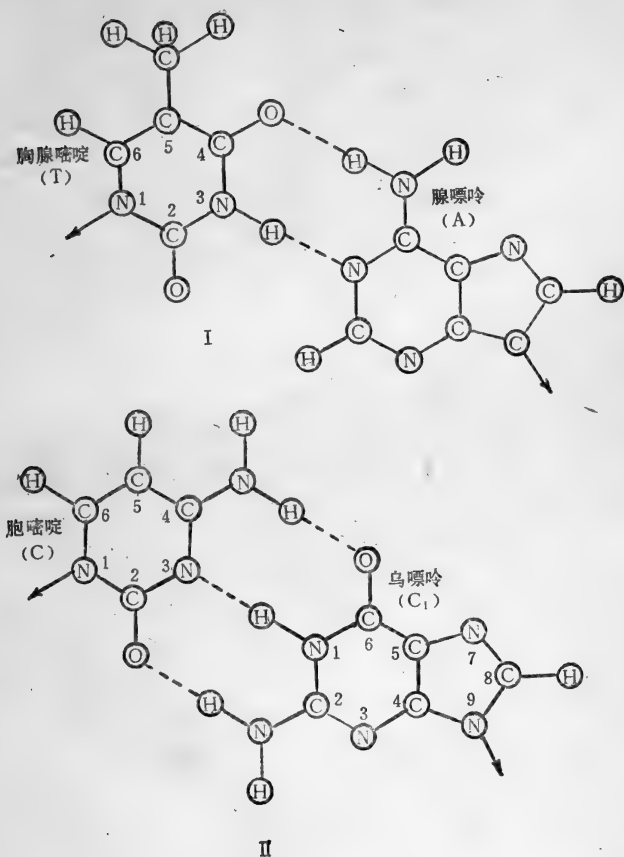


图 3-4 腺嘌呤与胸腺嘧啶和鸟嘌呤与胞嘧啶对
虚线表示氢键， 双键未表明， →表示与糖环结合点

3-3。

根据对提纯的 DNA(呈纤维状) X-射线衍射图的研究,发现嘌呤和嘧啶碱基以 3、4 埃的间距规则地排列在分子上,并每 3、4 埃出现链的一个全周期,因此建议 DNA 分子不是直线的而是扭成螺旋状。DNA 双螺旋结构模型也能满足 X-射线衍射图所提出

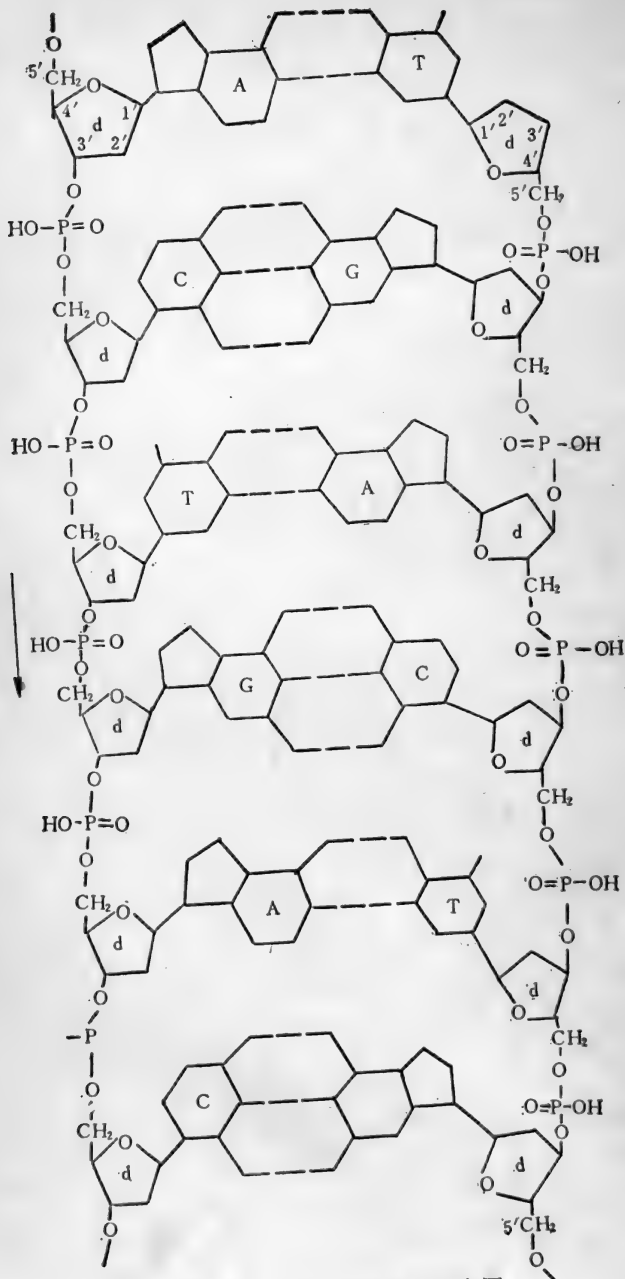


图 3-5 DNA 双链展开示意图

表 3-3

微生物的 DNA 组成

种 类	碱基比例 (克分子%)				
	G	A	C	T	$\frac{A+T}{G+C}$
藤黄八叠球菌 (<i>Sarcina lutea</i>)	36.4	13.6	35.6	14.4	0.39
金黄色化脓小球菌 Oxf (<i>Micrococcus Pyogenes</i> Oxf)	15.0	34.1	15.7	32.2	2.26
产气气杆菌 (<i>Aerobacter aerogenes</i>)	28.2	20.3	27.0	19.1	0.71
大肠杆菌 I (<i>Escherichia Coli</i> I)	26.0	23.9	26.2	23.9	0.92
枯草杆菌 (<i>Bacillus Subtilis</i>)	21.0	28.9	21.4	28.7	1.36
巨大芽孢杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)	19.1	31.8	18.5	30.6	1.66
戊酸、梭状芽孢杆菌 (<i>Clostridium Valerianicum</i>)	16.2	35.1	15.6	33.1	2.14
啤酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	18.7	31.3	17.1	32.9	1.79
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	25.1	25.0	25.0	24.9	1.00

的一切要求。

由于 DNA 双螺旋结构能解释 DNA 的部分理化性质和生物遗传现象,因之得到广泛公认。它可以完美地解释 DNA 分子的自我复制方式,从而能完成物种遗传性的代代相传。现在已经知道, DNA 分子可以很大,以大肠杆菌为例,长度大约为 1,000 微米,以碱基间距离为 3,4 埃计算,则大肠杆菌的 DNA 大约有 3×10^6 对核苷酸。根据碱基对的平均分子量约为 600,所以大肠杆菌 DNA 的分子量应是 $600 \times 3 \times 10^6$ 或 1.8×10^9 。动植物细胞的 DNA 分子可以更长些。今将各种机体细胞核的 DNA 含量列于表 3-4。

由于 DNA 分子能够大到这种程度,含有这样多的核苷酸单位,因此,四种碱基在分子中的排列次序可以千变万化,在这种碱基排列中就蕴藏着遗传密码。因此,各种生物的 DNA 分子中碱基排列的顺序总是有差异的。为了确保有机体 DNA 中核苷酸碱基的精确顺序(碱基顺序也就是物种的特征)不变地从一代(亲

表 3-4

各种机体细胞核的 DNA 含量

机 体	微 克	核 苷 酸 对
病毒: T ₂ 噬菌体	2×10^{-10}	1.9×10^5
细菌: 大肠杆菌	4.7×10^{-9}	4×10^6
酵母菌: 啤酒酵母 (单倍体)	0.07×10^{-6}	7×10^7
腔肠动物: 水母 (精子)	0.33×10^{-6}	0.3×10^9
软体动物: Schnirkel 蜗牛 (精子)	0.67×10^{-6}	6.3×10^9
脊椎动物: 蛙	48.0×10^{-6}	4.5×10^9
真骨鱼类: 鲤鱼	3.5×10^{-6}	3.3×10^9
禽类: 鸡	2.3×10^{-6}	2.1×10^9
哺乳动物: 人	6.0×10^{-6}	5.6×10^9

注: β -单倍体细胞, 其余均为双倍体细胞。

代) 传到下一代(子代), 以保持机体的遗传特征。这个过程是通过 DNA 自我复制来完成的。DNA 的自我复制是在组成多核苷酸链的那些构成单位有充分供应的情况下开始解螺旋并分裂成两条链, 情况与拉链相似, 然后各链分别按互补原则形成对应的另一链, 从而形成了与原来相同的 DNA 分子。原来螺旋中的每一股链都在新的互补链中起了模板的作用。(关于 DNA 的这种结构及其生物学功能的关系将在第三篇中“核酸与蛋白质的生物合成”予以介绍。) 细胞分裂之前细胞核中的 DNA 含量增加一倍的化学测定结果是与上述的 DNA 双螺旋结构自我复制的解释相一致的。另外用大肠杆菌做实验证实了 DNA 在自我复制过程中的解螺旋作用。这些为 DNA 双螺旋结构提供了有力的证据。

DNA 双螺旋结构概念对绝大多数天然来源的 DNA 是正确的, 但最近在少数噬菌体的研究中发现活性 DNA 并不一定是双螺旋结构, 同时双螺旋也不是一成不变的。

DNA 分子的双螺旋结构理论不仅为分子遗传学奠定了基础, 而且也进化论进一步提供了可靠的科学依据。进化论的建立是十九世纪生物学发展史上的重要里程碑。在过去的研究中, 主要

依据不同种属的生物体在形态解剖方面的比较,来决定它们在进化过程的亲缘关系。近年来随着对生物大分子结构测定的进展,对在不同种属生物体中起相同作用的蛋白质或核酸的结构作了比较,发现亲缘关系越近,其结构就越相似。有人对从细菌中分离到的 DNA 进行化学测定其碱基组成,表示出和分类学有严格的关系(见表 3-5),得出每个属的 DNA 中(G+C)的百分率都在一个较狭窄的范围内,并且相互之间的关系(如肠杆菌科的或放线菌纲的)是明显的。这进一步为进化论提供了可靠的科学依据。

表 3-5 细菌DNA中鸟嘌呤加胞嘧啶的组成 (%)

菌 属	G + C (%)	菌 属	G + C (%)
链霉菌属 (3个种)	74	沙门氏杆菌属 (7个种, 11个菌系)	49~54
小单孢菌属	72	大肠杆菌属 (10个菌系)	50~53
假单孢菌属 (3个种, 8个菌系)	63~67	芽孢杆菌属 (3个种, 11个菌系)	34~46
固氮菌 (6个菌系)	55~57.5	链球菌属 (3个种, 5个菌系)	34~39
产气气杆菌 (6个菌系)	55~59	梭菌属 (4个种, 5个菌系)	27~32
艾氏菌 (7个种)	52~54		

三、RNA 的立体结构

除少数病毒的 RNA 外, RNA 是以单链分子存在的。关于 RNA 的分子结构,由于较难提纯,研究比较困难。目前了解比较清楚的是分子量较小,大约只含 80 个核苷酸的转移 RNA (tRNA) 的结构。根据事实证明,在 RNA 分子的多核苷酸链中也能形成与 DNA 相类似的螺旋区,这是由单链自身回折,使链内可配对的碱基(A-U, G-G)相遇形成氢键(A-U 碱基对见图 3-6),使该部分扭转形成螺旋。但其螺旋结构与 DNA 的略有不同,碱基既不彼此平行,亦不垂直于螺旋的轴(见图 3-6)。这是因为在核糖的 2' 位置上多出的氧原子的大部分伸入到结构的密集部位所致。这些双股的区域会被没有互补序列的单股区域所分开,此单

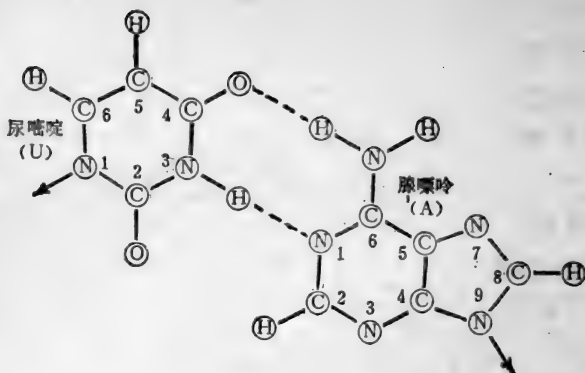


图 3-6 尿嘧啶与腺嘌呤对



图 3-7 RNA 分子中螺旋区模型



图 3-8 三叶草模型的空间排列

股区域还可形成环状突起。例如酵母丙氨酸 tRNA 的结构示意图 (见第十一章图 11-8)。一般称三叶草型结构。

三叶草型结构反映不出其在空间上是如何排列的, 故曾经提出过各种模型, 但至今仍然未能确定下来。近年来对 tRNA 的三级结构提出了倒“L”字模型。见图 3-8。

目前认为, 在转移 RNA 及核糖体 RNA 及信使 RNA 分子中都含有一些双螺旋区。

第四节 核酸在生物体内的存在方式

一、DNA 在细胞内的存在方式

细胞是生物的基本结构单位。一切高等动植物都由单细胞(受精卵)开始,经过细胞分裂,细胞数由一变二,二变四……发育分化成为成体;低等生物如原生动物、酵母菌、细菌等都以单细胞形式存在。

就细胞结构而言,高等生物与低等生物之间可按原生质的分化情况区分为真核生物(eucaryote)和原核生物(Procaryote)。前者的原生质分化为细胞质和细胞核,后者则无此分化。真核生物包括真菌以上的所有生物,原核生物包括细菌、放线菌、蓝绿藻和病毒。

经研究表明,除某些病毒(如烟草花叶病毒等)而外,DNA是一切生命形式的普遍的遗传物质。它在真核生物的细胞中与原核生物的细胞中的存在方式是不同的。在真核细胞中,DNA与大量的碱性的组蛋白及其他蛋白质分子结合成核蛋白,形成染色体。在动植物细胞内,除了染色体DNA外,还有分布于线粒体、叶绿体等处的DNA,它们能自行复制,真核细胞含有许多染色体,每个物种都有恒定的染色体数,故细胞内有恒定的染色体量。如人的体细胞染色体数为46,玉米为20,酵母菌为18,因此含有多量的DNA。这种DNA大约由 10^9 个核苷酸对组成,相当于细菌DNA一千倍大小(见表3-4),从这一事实来看,可见高等生物比低等生物具有更复杂的遗传性状。

在原核细胞(如大肠杆菌)中,DNA不与蛋白质组成结构复杂的染色体,而DNA存在于细胞质中,位于细胞的一个集中区域内,并与细胞膜相连接。细菌染色体多是含一分子呈环状的DNA,长度达1,000微米,而动物细胞中则含有许多线状的DNA分子。在细菌细胞中,DNA还有以质粒(Plasmid)的形式存在,

这是独立于染色体外的遗传因子。它具有自主复制的能力，然而在细胞内却并非必需，失掉了也不影响细菌细胞的生存。一般一个细菌细胞中可携带 20~30 个质粒，每个质粒可携带多个基因，如最大的 F 质粒有 600 个基因。一般原核细胞染色体上常携带有数千种基因；而真核细胞的染色体上则携带有上万种基因。质粒控制着许多生物学功能，目前已发现的有性因子(F 因子)、耐药性因子(R 因子)、大肠杆菌素等。

细菌质粒有不同大小，如大肠杆菌中小的质粒平均为 5×10^6 道尔顿，在每个细胞中可维持几个复制体；而大的质粒平均为 6.5×10^6 道尔顿，每个细胞中有 1~2 个复制品。大肠杆菌中质粒的 DNA 含量约为染色体含量的 2%。近年来，质粒引起人们重视，因为质粒除了在细胞质中进行稳定自主性复制外，有的质粒它可将一个特定的 DNA 序列(易位子 transposon)易位到另一质粒或染色体，而使接受易位子的质粒的大小及其分子量增加并获得基因而影响生物性状的改变。另外亦有助于进一步了解质粒之间、质粒与染色体之间基因的关系。因而质粒已成为遗传工程常用的载体之一，而受到广泛重视。

二、单链 DNA 和环状 DNA

已知 DNA 分子呈双螺旋结构，由于分子极为细长，并具有某种程度的柔软性。根据物理化学的研究，呈可卷曲的线性分子。

但经对大肠杆菌噬菌体 $\phi \times 174$ 研究，发现了单链的 DNA，因其碱基的比例与通常的 DNA 碱基组成的规律不相符合，即 A 和 T、G 和 C 之间克分子量并不相等。进一步研究发现在十分温和的条件下制得噬菌体 $\phi \times 174$ 的 DNA 不仅是单链的，而且链两端通过共价键结合成一个闭合的环。在其它一些小病毒(如噬菌体 M_{13} 、 f_2 等)中也发现了单股的环状 DNA。可是当噬菌体在细菌细胞内繁殖，DNA 进行复制时，单股的 DNA 又变成双股

环状的复制形式。

天然存在的单股线状 DNA 比较罕见，已知小鼠的细小病毒即属此类。另外双股 DNA 经变性后很容易得到单股 DNA。

双股环状 DNA 存在于某些病毒、细菌、线粒体和叶绿体中。有些双股线状 DNA 分子（如噬菌体 λ 和某些质体的 DNA）在复制时也形成环状中间体。

三、细胞中的 RNA

合成大量蛋白质的细胞含有大量的 RNA。同样地，在不生产大量蛋白质的细胞中，能查出的 RNA 就很少。通过对微生物蛋白质合成过程的详细研究，知道细胞内的 RNA 主要存在于细胞质，它们是：(1) 信使 RNA (mRNA)，(2) 核糖体 RNA (rRNA)，(3) 转移 RNA (tRNA)。它们都是在 DNA 模板上合成的。蛋白质的合成都涉及到这三种 RNA，将于第十章核酸与蛋白质的生物合成中介绍。

第五节 核酸的理化性质

一、一般物理性质

核酸的分子量很大，DNA 的分子量一般为 $10^6 \sim 10^9$ 。RNA 的分子量大小变动很大，一般 tRNA 分子量最小为 10^4 左右，mRNA 约为 0.5×10^6 或更大些，rRNA 则在 $0.6 \sim 1 \times 10^6$ 。

DNA 与 RNA 的化学组成中都含 C、H、O、N 和 P 五种元素，由于含磷量比较固定，因之常用测定磷量的方法来计算核酸（或核苷酸）的含量。

RNA、核苷酸、核苷、嘌呤碱、嘧啶碱的纯品都呈白色粉末或结晶，DNA 则为与石棉相类似的白纤维状物。核苷酸中除肌苷酸、鸟苷酸具鲜味外，大都呈酸味。

DNA、RNA、核苷酸都是极性化合物，一般讲都溶于水

表 3-6 DNA 与 RNA 中氮、磷元素的一般含量 (%)

核 酸 \ 元 素	N	P
DNA	15.2	9.2
RNA	15~16	8.5~9.0

而不溶于乙醇、氯仿等有机溶剂，因此常用乙醇沉淀法来提取核酸。它们的钠盐较易溶于水，RNA 的钠盐溶解度可达 4%。碱基和核苷在水中的溶解度都不大，而嘌呤衍生物又比嘧啶衍生物难溶于水，其溶解顺序大致是：胞嘧啶 > 尿嘧啶 > 腺嘌呤 > 鸟嘌呤。在酸性溶液中核苷酸上的嘌呤基易被水解下来，在中性或弱碱溶液中则较稳定。

核酸的钠盐水溶液具有很高的粘度。粘度是用作检定核酸物质的指标之一，如 DNA 溶液粘度变小，即标志着 DNA 发生了变性或降解，故粘度的测定有其实用价值。

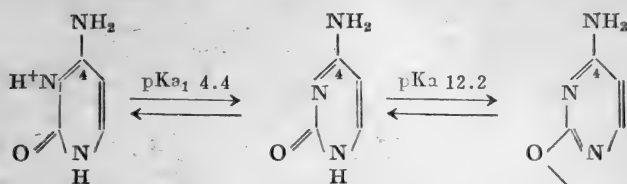
二、核苷酸与核酸的解离性质

(一) 核苷酸的解离性质

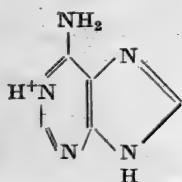
核苷酸中含有各种可解离的基团。这些可解离的基团包括来自嘌呤、嘧啶环中的氮原子及其各种取代基外，还存在有磷酸基团的一级解离和二级解离。至于核糖上羟基的解离需要在强碱性情况下才能进行，故一般不予考虑。

关于碱基的解离是由于嘌呤和嘧啶化合物环中的氮原子及各种取代基具有结合和释放氢离子的能力，所以这些物质同时兼有碱性和酸性的性质。以胞嘧啶为例，其环中所含氮原子上有一对未共用电子，可用来与氢离子结合，使 $-N=$ 转变成带正电荷的 $-N^+H=$ 基团。胞嘧啶上的烯醇式羟基与酚基很相像，具酸性，可以释放氢离子。因此在水溶液中，胞嘧啶的中

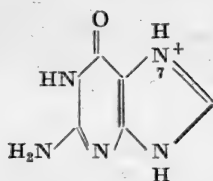
性分子、阳离子和阴离子之间，具有一定的平衡关系。



过去一直以为碱基在 pH 4 左右的电离与氨基基团有关，现在知道这种看法是错误的。实际上，在嘌呤和嘧啶碱中，其氨基的碱性非常弱，氢离子主要是与环中的氮原子相结合，这是因为嘌呤环和嘧啶环与苯环相似，具有吸引电子的能力，使得氨基的氮原子上未共同电子对不易和氢离子结合，所以氨基碱性减弱。经研究认为腺嘌呤、鸟嘌呤与氢离子结合的形式如下式所示，括弧中为其相应的 pKa 值。



腺嘌呤
(4,1)



鸟嘌呤
(3,3)

尿嘧啶的第 4 位烯醇式羟基与鸟嘌呤第 6 位烯醇式羟基的 pKa 值大约为 9 左右。

在核苷酸中，碱基部分的各 pKa 值由于糖和磷酸基的存在而发生改变。糖直接与碱基联结影响了碱基结构从而使碱基环的 pKa 值降低，也即是增强了碱基的酸性解离，故腺嘌呤核苷 pKa 值改变成 3.63，胞嘧啶核苷改为 4.1，鸟嘌呤核苷改为 1.6。而磷酸基的存在，使碱基部分的各 pKa 值较核苷略为偏碱一些，这可能是由于磷酸基负电荷的静电效应所造成。现将几种单核苷酸

的可解离基团的解离常数 pK_a 值列于表 3-7。

表 3-7 一些核苷酸的解离常数 pK_a

解离常数 pK_a 核苷酸	基团 碱基 =NH ⁺ -	烯醇式羟基	第一磷酸基	第二磷酸基
腺嘌呤核苷酸	3.70	—	0.89	6.01
鸟嘌呤核苷酸	2.30	9.33	0.70	5.92
胞嘧啶核苷酸	4.24	—	0.80	5.97
尿嘧啶核苷酸	—	9.43	1.02	5.88
胸腺嘧啶核苷酸	—	10.0	1.6	6.50

- 注：① 磷酸位置不同 (2', 3', 5'-) 的核苷酸，其基团的解离常数略有不同。
 ② 不同工作者的测定数据略有出入。
 ③ 此表所列数据取自不同工作者。

核苷酸含有碱基和磷酸基故为两性电解质，在一定条件下还可形成两性离子。图 3-9 为四种核苷酸的解离曲线。在 AMP、GMP、CMP 中， pK_{a1} 值是由于第一磷酸基— PO_3H_2 的解离， pK_{a2} 值是由于含氮环的— $N^+H=$ 的解离，而 pK_{a3} 则由于第二磷酸基— PO_3H^- 的解离。从核苷酸的解离曲线中可以看出，在第一磷酸基和碱基(— $N^+H=$) 解离曲线交点处，带负电荷的磷酸基与带正电荷的碱基数相等，这时的 pH 值即为等电点。在等电点时，上述核苷酸主要呈两性离子形式存在。核苷酸的等电点 pI 可以简单地按下式计算：

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

尿嘧啶核苷酸的碱基碱性极弱，实际上测不出其含氮环的解离曲线。故不具等电点，不能形成两性离子。

因磷酸基的酸性比碱基的碱性强，故核苷酸的等电点偏于酸性(见图 3-10)。具有两性性质的核苷酸在 pH 值相当低的情况

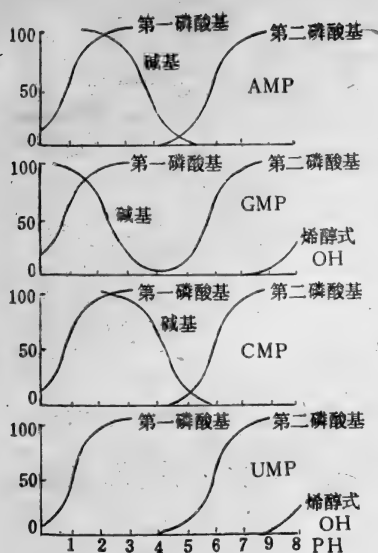


图 3-9 四种核苷酸的解离曲线

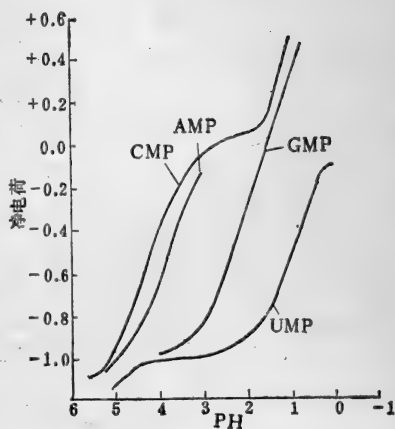


图 3-10 每种核苷酸分子上的电荷与 pH 值的关系

下，仍保留其阴离子性质。如图 3-9、3-10 所示，在 pH 5.5~2.0 范围内，随着 pH 值的下降，碱基解离增加，因而净负电荷亦减少。并因碱基在不同的核苷酸中具不同的 pK_a 值，因此在某一给定的 pH 值时，个别核苷酸上的净电荷就不相同。净电荷的不同就构成了离子交换分离的基础而能将各种核苷酸进行分离。尿嘧啶核苷酸(及胸腺嘧啶核苷酸)因碱基的 pK_a 值实际上测不出来，故不被阳离子交换树脂所吸附。

同样地，如果在一定的 pH 条件下，将各种核苷酸置于电场中，因所带电荷情况的不同，移动速度也就不同，故可用电泳法来分离与鉴定各种核苷酸。对电泳分离有重要实用意义的解离基团是磷酸根与碱基。四种单核苷酸用电泳法分离的主要根据是在 pH 3.5 时，核苷酸的一级磷酸基团完全解离而二级磷酸基团几

乎完全不解离。此时碱基的解离度也因各种核苷酸的 pKa 的不同而有所不同，见表 3-8。

表 3-8 四种单核苷酸在 pH 3.5 时的碱基解离度

核 苷 酸	pKa	解 离 度
AMP	3.70	0.54
GMP	2.30	0.05
CMP	4.24	0.84
UMP	—	—

由于每种核苷酸带有一负电荷(来自一级磷酸基团的解离)，所以净负电荷在 pH 3.5 时应为：

AMP 0.46 (1-0.54)

GMP 0.95 (1-0.05)

CMP 0.16 (1-0.84)

UMP 1.00

因此在进行电泳时单核苷酸向正极移动的速度各异，其顺序是 UMP>GMP>AMP>CMP，可达到良好的分离效果。

在核苷酸生产中，常采用离子交换法与电泳法来分离鉴定四种核苷酸。

(二) 核酸的解离性质

核酸与核苷酸一样是两性电解质，等电点偏于酸性。在中性或碱性溶液中呈阴离子，能与金属离子、碱性染料或其它碱性物质相结合。如核酸和链霉素结合后能从溶液中沉淀出来。核酸与碱性染料的结合，常被用于细胞染色用来观察细胞内各种微细结构。

三、紫外吸收性质

核酸具有吸收紫外光的性能，最大吸收峰在 260 纳米左右的

波段，并在 230 纳米处有一低谷(见图 3-11)。此性质是因组成中嘌呤环与嘧啶环的共轭双键系统所具有的，因此不论是核苷、核苷酸或核酸在此波段内都具有吸收紫外光的特性。RNA 与 DNA 在紫外吸收性质上没有任何重要的差别。

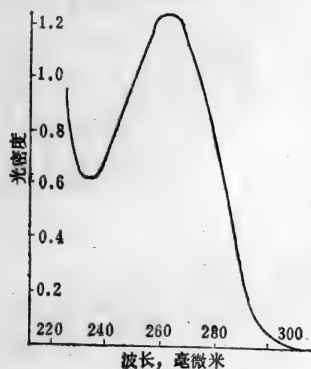


图 3-11 酵母 RNA 钠盐的紫外吸收曲线

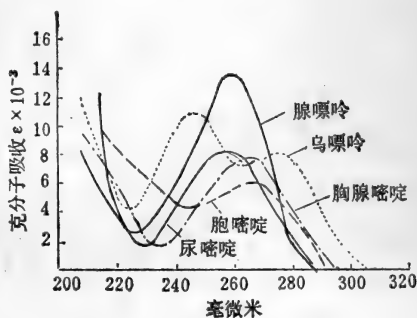


图 3-12 pH 7 时嘌呤碱与嘧啶碱的紫外吸收曲线

各种碱基的吸收高峰不同(图 3-12)，因而各种核苷酸对紫外光的吸收特性亦有所不同。表 3-9 列出了五种核苷酸的最大吸收波长及克分子消光系数。表中的数值说明，各种核苷酸对紫外

表 3-9 核苷酸的克分子消光系数

核 酸	最大吸收波长 ($m\mu$)	$^*\Sigma_{\max}$ pH 7	Σ_{260}	
			pH 7	pH 2
5'-AMP	259	15.4×10^3	15.0×10^3	14.2×10^3
5'-GMP	252	13.7×10^3	11.4×10^3	11.8×10^3
5'-CMP	280	13.2×10^3	7.4×10^3	6.2×10^3
5'-UMP	262	10.6×10^3	10.0×10^3	10.0×10^3
5'-dTMP				9.6×10^3

注： $^*\Sigma_{\max}$ 为 pH 7 时，在最大吸收波长处测得的克分子消光系数。

光的最大吸收波长及吸收强度是不同的。因之在生产实践和科研中常用不同波长处的光密度(O.D.)的比值来表示核苷酸紫外光波的特征(表 3-10-), 这种吸收光谱的特征, 可用来鉴别与定量核苷酸。在应用时, 常配合电泳法或层析法。如由 RNA 水解生产四种核苷酸样品的定性, 常用在 260 纳米的紫外光下, 辨认纸上电泳或纸上层析所得的核苷酸斑点, 从而可以很方便地用紫外分光光度计测定各波长的光密度值, 算出各波长的吸收光波比值与已知核苷酸的标准比值相比较, 从而判断是哪一种核苷酸。又根据 260 纳米的光密度值和已知核苷酸的克分子消光系数可以算出核苷酸的含量。

表 3-10 5'-核苷酸的紫外光吸收光谱的特征

核 苷 酸	O. D. 比值		O. D. 250/ O. D. 260		O. D. 280/ O. D. 260		O. D. 290/ O. D. 260	
	pH							
		2.0	7.0	2.0	7.0	2.0	7.0	
5'-AMP	0.85	0.80	0.22	0.15	0.03	0.003		
5'-GMP	1.22	1.15	0.68	0.68	0.40	0.285		
5'-CMP	0.46	0.84	2.10	0.99	1.55	0.30		
5'-UMP	0.74	0.73	0.38	0.40	0.03	0.03		
5'-dTMP	0.64		0.73					

注: O. D. 250/O. D. 260 就是在 250 纳米波长处测得的 O. D. 值与在 260 纳米波长处测得的 O. D. 值的比。余类推。

pH 值的变化会影响核苷酸中嘌呤或嘧啶碱上的某些基团的解离, 影响到其结构, 因而会改变紫外光吸收性质, 所以在表示紫外光吸收特性时, 需要注明测定时的 pH 条件 (如表 3-9、3-10)。

由于核酸对紫外光有强烈的吸收性质, 因此在培育高产优质菌种时, 也常用紫外线照射法, 使微生物细胞内的 DNA 吸收紫

外线后，引起了结构上的微细改变，但不致死亡，从而使微生物的某些性状起变化，可从中选出对生产有用的菌株。

四、核酸的变性作用

核酸与蛋白质一样能因理化因素引起变性现象，所谓变性是指多核苷酸之间维持立体结构的氢键（碱基对之间的氢键）的断裂，故变性后核酸的分子量不变，但螺旋结构变为无定形的伸展或卷曲状态(见图 3-13)。

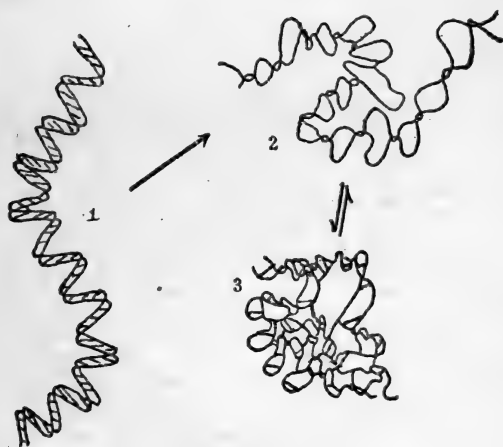


图 3-13 DNA 变性的图解

- 1—未变性的双螺旋 2—双螺旋在变性时生成两条缠绕的，没有氢键结合多核苷酸链 3—除去变性条件后重新形成的某些非特殊氢键
从 1 变至 2 是不可逆的，
而从 2 变至 3 则是可逆的

DNA 核酸的变性可用四种方法引起：① 将 DNA 溶解在纯水或非常稀的电解溶液；② 用强酸或强碱溶液处理；③ 加热；④ 加入破坏氢键的试剂如脲、盐酸胍、水杨酸等。变性后的核酸生物学活性丧失，粘度下降，对 260 纳米的紫外光吸收能力增强。

(一) DNA 溶解在水或非常稀的电解质所引起的变性

试验指出当将 DNA 溶于低于 $10^{-3}M$ 的氯化钠溶液中会发生不可逆变性。但对含二价阳离子的溶液来讲，引起变性的极限浓度远低于一价阳离子溶液，其数值为 $10^{-4,5}M$ 以下。因此在核酸的提取制备过程中必须充分注意电解质的浓度，以避免发生变性作用。

(二) 酸或碱引起的变性作用

强酸或强碱可以引起 DNA 的不可逆变性。变性的程度取决于氢键被破裂的多少，如果被破坏至一定程度则发生不可逆变性；如果氢键破坏较小，两条多核苷酸链仍可保持其相对位置，中和后，氢键可重新形成，则变性为可逆，但这种可逆并不意味着能恢复到原来状态。酸碱所引起的变性与温度有关，温度较低时则引起的变性作用较小。

(三) 加热所引起的变性作用

DNA 对热是敏感的，能引起不可逆变性，但这种变性只在一定的临界温度之上发生。临界温度的高低和离子强度（电解质对 DNA 热变性有保护作用）以及 DNA 的天然状态和来源有关，一般为 $70\sim 85^{\circ}C$ 。

(四) 变性剂的影响

脲、盐酸胍、水杨酸等是能使蛋白质氢键断裂的变性剂，也能促进 DNA 的变性作用。经研究认为它们本身并不能明显地引起 DNA 变性，但可以在其它方法所引起的变性作用中起辅助作用。变性因素的长时间作用也可导致核酸主链间的核糖-磷酸酯键的断裂造成核酸降解。由于核酸容易变性，因之在制取核酸过程中，一定要控制好条件，注意防止变性因素的影响，才能制备出具有活性的核酸。

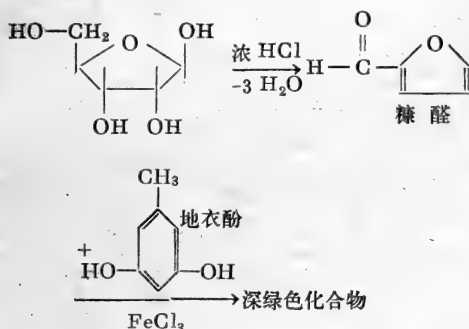
五、核酸的显色反应

核酸中含有核糖和磷酸，它们经一定的化学反应后能产生颜

色反应，可用来粗略地进行核酸的定量测定。

(一) 核糖的测定——地衣酚(3,5-二羟甲苯反应)

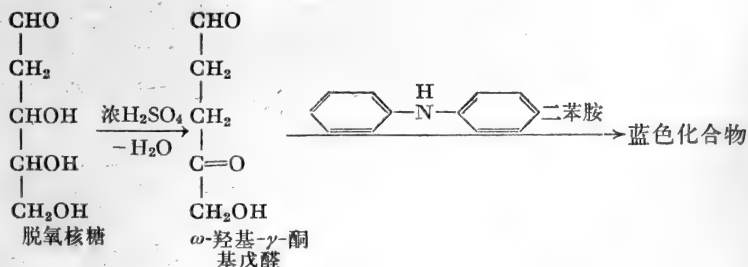
RNA 中的核糖经浓盐酸或浓硫酸作用脱水生成糠醛。糠醛能与某些酚类化合物缩合而生成有颜色的化合物。糠醛与地衣酚反应后就产生深绿色化合物，在有高铁离子(如 FeCl_3)存在时，则反应更灵敏，为测定核糖最常用的方法，其反应过程可简单表示如下：



利用此颜色反应，可用 675~680 纳米的滤色片进行比色测定。

(二) 脱氧核糖的测定——二苯胺反应

DNA 中脱氧核糖经浓硫酸作用，脱水生成 ω -羟基- γ -酮基戊醛，与二苯胺在酸性溶液中加热后生成蓝色化合物。可用 595~620 纳米的滤色片进行比色测定。其反应过程可简单表示如下：

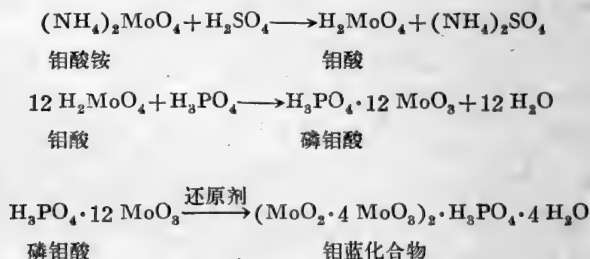


此反应如采用加乙醛，并以 30°C 保温数小时的方法来代替在 100°C 加热几分钟，则反应灵敏度大为增加，而其他化合物干扰的影响将显著降低。

上述两种测定戊糖的颜色反应都具有一定的专一性，但受蛋白质的干扰，并也受粘多糖产生的糠醛的干扰，因此在测定时一定要将此等杂质去掉。

(三) 磷的测定——钼蓝反应

核酸中含有磷，可用强酸(如 10N H₂SO₄)将核酸高温消化，使有机磷变成无机磷。进一步与钼酸铵作用生成磷钼酸，在还原剂(常用抗坏血酸)作用下，生成蓝色的钼蓝化合物，可用 650 纳米的滤光片进行比色测定。反应过程可表示如下：



由于核酸组成中含磷量是一定的，故测得磷的含量后，便可计算出核酸的含量。但样品须经预处理以消除其它含磷物质的干扰。

第六节 核苷酸及其衍生物

核苷酸的名称，原来是给予核酸部分水解后得到的基本组成单位的。然后在生物体内也有另一些不出现在核酸中的重要核苷酸，它们可以含有不同于嘌呤或嘧啶的碱基(如烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸、黄素单核苷酸等。见第二章辅酶的组成)。因此，核苷酸的定义可以更普遍地适用于含有以糖苷键连接着一个碱基的磷

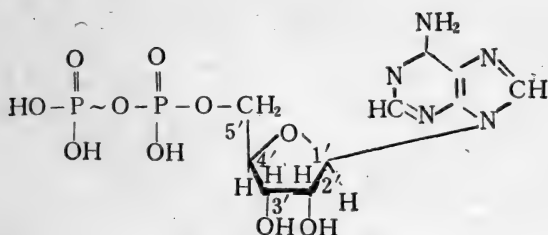
酸糖的化合物(即碱基-糖-磷酸)。

在生物体中,核苷酸除了作为核酸的基本组成外,也有以游离形式(常作为辅酶、代谢中间产物)而存在。有一些核苷酸及其衍生物(如腺嘌呤核苷酸的磷酸酯 ATP 及 NAD, 辅酶 A 等)在代谢中有重要作用,也有一定的医疗效果,可以从生物体中提取或用发酵法生产。

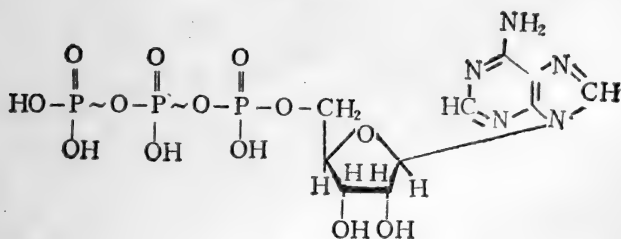
今将几种嘌呤、嘧啶类核苷酸的结构与功能简单介绍于下,其余如 NAD、辅酶 A 等见第二章辅酶的组成。

一、ATP 与 ADP

5'-腺嘌呤核苷酸(5'-AMP)又可简称为腺一磷,它可以在5'位碳上继续磷酸化,生成腺一磷的磷酸酯——腺二磷(ADP)、进一步生成腺一磷的焦磷酸酯——腺三磷(ATP),它们的结构如下:



腺二磷(ADP)



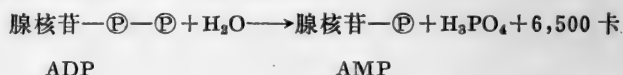
腺三磷(ATP)

在所有的核苷酸化合物(及其它代谢产物)中,磷酸基团常被写成— P ,于是ATP可写作腺核苷— P — P — P ;ADP可写成腺核苷— P — P 。

ATP在适当的酶或稀酸、稀碱的作用下可水解,把末端— P 去掉形成ADP。此反应在pH 7时的标准自由能(G)大约是一8,000卡,比一般磷酸酯键水解时($\Delta G = -2,200$ 卡)的能量要大得多,因之称它为高能键,用“ \sim ”表示。



类似地,ADP水解为AMP的反应里,也有很高的能量变化,在pH 7时, $\Delta G = 6,500$ 卡



因而ATP与ADP更确切的表示应分别写成腺核苷— $\text{P} \sim \text{P} \sim \text{P}$ 与腺核苷— $\text{P} \sim \text{P}$ 。

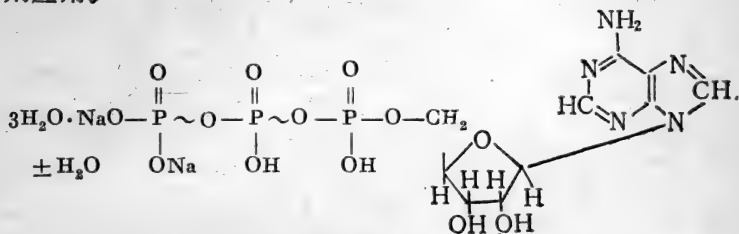
5'-鸟核苷酸(GMP),5-胞核苷酸(GMP),5'-尿核苷酸(UMP)等都可以进一步磷酸化形成相应的磷酸酯和焦磷酸酯。



ADP、GDP、GDP、UDP各含有一个高能磷酸酯键,ATP、GTP、GTP、UTP各含有二个高能磷酸酯键。由于这些化合物分子中含较高能量,因此可供给生物体活动时所需能量,也可供给磷酸基,是生物体内能量代谢与物质代谢的重要物质。生物体内的不少化学反应,如氧化-还原反应,合成反应都是在它们的参与下(以辅酶形式)进行的。已经证明其中ATP特别重要,借助于从ADP形成ATP这一反应,ATP被用来贮存生化反应所释放的能量;然后由ATP再转变成ADP,以释放能量并供应磷酸基。

ATP 具有如此重要的生理功能，近年来将它应用于临床取得良好效果。

ATP 生产主要利用酵母 RNA 经 5' 磷酸二酯酶降解成混合单核苷酸后，经离子交换树脂分离得 AMP，再经光合磷酸化成 ATP，亦有用化学合成法由 AMP 合成 ATP。然后以钠盐形式作成针剂应用。

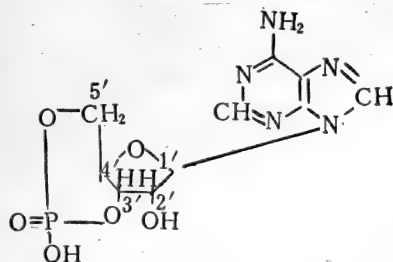


ATP 钠盐的结构式

二、环-磷酸腺苷(简称 cAMP)

环-磷酸腺苷或 3', 5'-环腺核苷-磷酸(cAMP) 是在一九五七年研究肾上腺素(激素)与高血压素(激素)对糖元分解作用时发现的。它是 AMP 的一种衍生物，也是腺核苷的磷酸二酯。其结构如下：

现在已经知道，很多激素的作用都通过 cAMP。它在生物体内不仅促进糖元分解，还影响多种酶活性，从而起调节体内生化过程和生理功能的作用，表现出重大的生物学意义。近年来又知



环-磷酸腺苷 (cAMP)

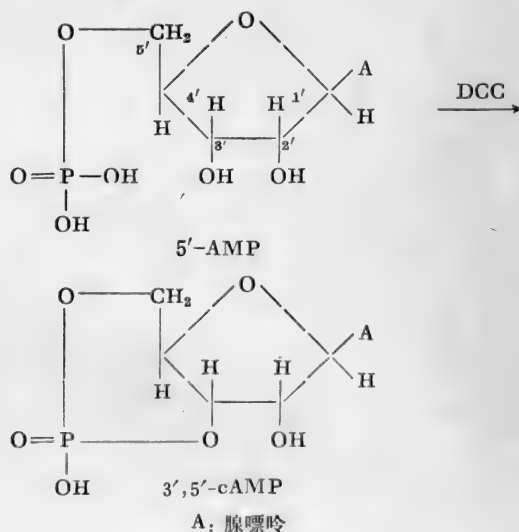
道 cAMP 对蛋白质合成有关, 有些实验证明它对肿瘤细胞的生长有抑制作用。

cAMP 广泛地存在于一切细胞中, 从低等的微生物一直到高等哺乳动物的各种组织细胞中都含有 cAMP, 作为细胞内重要的调节因素。

在生物体内 cAMP 是通过位于细胞膜内的腺苷酸环化酶对底物 ATP 作用环化为 cAMP, 此过程需有镁离子(Mg^{++})存在。cAMP 在磷酸二酯酶的作用下, 可转变为 5'-AMP 而失去活性, 已知细胞内 cAMP 浓度主要以下列方式保持平衡。



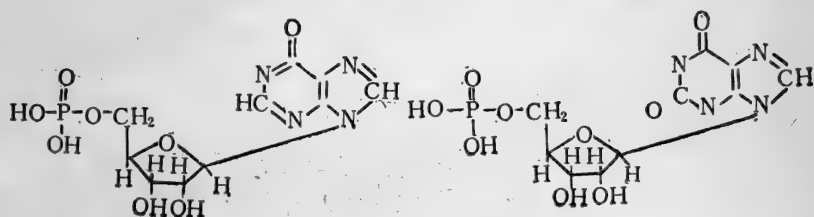
由于 cAMP 具有重要的调节作用, 近年来已作为药品应用于临床。但在组织中它的含量很低, 以每克湿组织计算, 大都在纳克分子甚至皮克分子的水平, 因此很难测定。由于研究工作与临床试验需要大量的 cAMP, 现采用合成法由 5'-AMP 的磷酸基团经双环己基碳化二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide DCC)活化后, 缩合成 cAMP。反应如下:



合成法制备 cAMP, 为大量生产创造了有利条件。

三、次黄嘌呤核苷酸与黄嘌呤核苷酸

5'-次黄嘌呤核苷酸又名肌苷酸 (5'-IMP), 5'-黄嘌呤核苷酸又名黄苷酸 (5'-XMP), 是生物体内合成腺核苷酸和鸟核苷酸的中间产物。其结构如下:



5'-次黄嘌呤核苷酸(5'-IMP)

5'-黄嘌呤核苷酸(5'-XMP)

次黄嘌呤核苷酸除在生物体内为合成嘌呤核苷酸的关键物质外, 在味觉上它具有肌肉的鲜味, 是一种助鲜剂, 与味精(谷氨酸钠盐)以不同比例混合能制成各种有特殊风味的强力味精。另外它亦可用于临床上以治疗白血球减少症等。它的降解物肌苷(次黄嘌呤核苷)亦已用于治疗肝脏疾患等。

我国已用发酵法生产肌苷酸与肌苷。

复 习 题

1. 试简述核酸的生物学重要性。
2. 比较两类核酸在化学组成上的异同。
3. 核苷酸分子是如何组成的? 组成核酸的基本核苷酸有哪几种(可用代号表示)?
4. 试比较两类核酸在结构上的异同。
5. 简述 DNA 双螺旋结构理论要点, 并试述它对遗传学的

贡献。

6. 已知酵母 DNA 的碱基组成中, 胸腺嘧啶含量为 32.9%, 试计算此分子中其他碱基的%?

7. 已知某 DNA 分子量为 3×10^7 , 试计算此双螺旋结构的长度? (碱基对的平均分子量约 618)

8. 试述核苷酸解离性质的实用意义。

9. 核酸、核苷酸何以具紫外吸收性质? 有何实用意义。

10. 何谓核酸的变性作用? 有何实用意义。

11. 试简述 ATP、ADP、AMP 与 cAMP 相互间转变关系, 并简述它们的生理重要性。

第二篇 新 陈 代 谢

第四章 新陈代谢概论

第一节 新陈代谢概念

生物不是孤立地存在，而是与外界环境发生密切联系的。它们在生命活动过程中，一方面不断地从外界环境中吸收营养物质；另一方面又不断地排出废物。这种生物体与外界环境的物质交换作用，就是生物的新陈代谢，或称为物质代谢。生物体的各种生命活动，如生长、发育、繁殖、遗传、变异乃至运动、思维等都是通过新陈代谢来实现的。因此，没有新陈代谢，就没有生命。

在自然界中，从低等的微生物到高等的动植物，尽管它们的形态、大小、结构千差万别，但它们的代谢途径都大同小异，因此新陈代谢是生命的基本特征之一。

所谓发酵就是微生物的新陈代谢过程。在发酵过程中，微生物通过本身的新陈代谢活动，使原料发生了一系列的生物化学变化，最后变成人们所需要的产品。例如在酒精发酵中，酵母菌从外界环境吸收了糖，通过新陈代谢活动，最后排出了酒精和二氧化碳。因此物质的交换是新陈代谢的现象，而它的本质是物质的转化。

新陈代谢过程包括营养物质的吸收、中间代谢以及代谢产物

的排泄等阶段。就微生物而言，营养物质的吸收和代谢产物的排泄是物质透过细胞膜的过程，物质在细胞内发生的一系列化学变化、能量转变等则称为中间代谢。本篇重点讨论中间代谢。

中间代谢依其不同方向的代谢变化，可以分为合成代谢与分解代谢。伴随着合成和分解代谢而发生在生物体内的化学能、热能、机械能等能量的相互转化和代谢变化称为能量代谢。

合成代谢是指一种或数种物质合成较大、较复杂的分子的过程，一般是消耗能量的反应。在合成代谢过程中，也常伴有某些物质的分解反应。分解代谢是指一种物质变为较小、较简单的分子的过程，一般是释放能量的反应。在分解代谢过程中，也常伴有某些物质的合成反应。例如，生物体内各种氨基酸合成为复杂大分子蛋白质的过程是合成代谢，这是需要供给能量的代谢过程；又如糖原在生物体内分解为葡萄糖，最终又分解为二氧化碳和水，是分解代谢，这是释放能量的代谢过程。

将中间代谢分为合成与分解两种过程，绝不是意味着这两种过程在生物体的生命活动过程中是单独分别进行的。合成与分解是一对矛盾，共处于一个统一体中，它们既是对立的，又是统一的。两者相互联结，相互依赖，相互渗透，相互贯通，互为条件，相反相成。合成过程中所要的物质和能量由分解过程提供，分解过程产生的物质和释放的能量又用于合成过程。由于能量和物质的相互依存，从而维持了生物体内物质的动态平衡以及能量供给与消耗的动态平衡，构成了新陈代谢的统一性。

中间代谢是复杂的物质转化过程。合成代谢和分解代谢都包含着一连串生物化学反应，这一系列生化反应按其发生的先后顺序组成代谢途径。各种不同的物质在生物体内的代谢途径并不相同，而且同一种物质在生物体内的转化也可能有几条不同的代谢途径，各代谢途径之间有时存在着若干分支点。因此各种不同物质的代谢，又可能经过这些分支点而相互沟通。

代谢过程虽然错综复杂，但它却有严格的规律性。研究中间

代谢包括了解其过程中各个反应的顺序、中间产物及最终产物，这些反应是在生物体的那些部位进行；阐明代谢过程中的能量变化；探讨它们之间的相互联系和相互制约，从中找出规律性的东西，并运用这些从生物体中揭示出来的规律来改造自然。

第二节 微生物新陈代谢的特点

各种生物的新陈代谢过程虽然复杂，却有共同的特点。

(1) 新陈代谢过程中所发生的化学反应往往不是一步完成，而是通过一连串的中间反应过程来完成的。反应步骤虽多，但有其顺序性。

(2) 绝大多数的中间代谢反应都是由酶所催化，所以代谢过程是在比较温和的条件下进行的。

(3) 代谢过程具有灵敏而巧妙的自动调节作用，因此发生于生物体内为数众多、错综复杂的各个代谢反应及各种代谢途径之间相互联系，相互配合，彼此协调，有条不紊地进行。

微生物同样具有这些生物体所共有的新陈代谢特点，另外还有其特殊之处。①微生物分布广泛，种类繁多，自然界中目前已发现的微生物多达 10 万种以上。各种微生物的营养要求与代谢方式均有所不同，表现为微生物营养和代谢的多样性。②微生物细胞构造简单，没有象高等生物那样具有特殊分化的营养器官，而是依靠整个细胞的表面直接与周围环境的接触来吸收养料，因此微生物具有远比高等生物快得多的代谢速度。例如，在合适的条件下，细菌每 20 分钟就可繁殖一代。24 小时可分裂繁殖 72 代，就是说一个细菌在一天之内可繁殖出 4722000000 亿万个；又如乳酸菌每小时可产生相当其体重 1000~10000 倍的乳酸；产朊假丝酵母合成蛋白质的能力是大豆的 100 倍等等。③正由于微生物的细胞直接与周围环境接触，其代谢方式也容易受到外界因素(营养和培养条件)的影响，表现为微生物对环境因素的适应

性。例如酵母菌在无氧而微酸性的条件下进行酒精发酵，而在有氧条件下则能使糖彻底氧化成二氧化碳和水；另外在无氧微碱性或添加亚硫酸盐的条件下则进行甘油发酵。这是各种不同的环境因素对酵母菌的代谢方式产生影响的结果。④在某些特殊的环境因素(诱变因素)的作用下，微生物容易在基因水平上发生变异，从而可能在其下一代表现出代谢方式的改变，使微生物的代谢方式更加丰富多采。

第三节 新陈代谢与发酵工业

新陈代谢的研究也和其它自然科学一样，是由三大革命运动实践推动和发展起来的。人们从实践中总结出来的新陈代谢的理论又进一步指导实践，为实践服务。近十几年来在代谢研究领域中对种种代谢规律的阐明大大推动了微生物发酵工业的发展。微生物发酵是利用各种微生物本身所特有的生理生化特性，在人工控制的条件下，微生物通过自身新陈代谢的活动将不同的物质进行分解或合成，转化成人们所需要的各种代谢产物。这就是说为要大量获得人类所需要的产品，取决于选择合适的微生物及人为地给予适宜的包括营养和培养条件在内的特定的环境因素这两个基本条件。而研究和掌握微生物的代谢活动规律及其调节机制，则能为满足这两个条件提供必要和可靠的依据，从而使微生物发酵更符合人们的需要，并在此基础上有目的地改造微生物，广泛开辟利用微生物发酵生产更多产品的途径。

第四节 研究中间代谢的方法

中间代谢研究方法的选择，要考虑研究的对象和要求解决的问题。研究的对象可以是动物、植物和微生物等。对于微生物的代谢，因研究对象的微小和生活方式的不同，研究方法就与脊椎

动物和绿色植物的代谢研究方法有所不同。至于所谋求解决的代谢问题也是多种多样的，可以是涉及到生物物质中某一类物质的分解和合成；可以是各类物质代谢之间的相互联系和相互制约；也可以是和营养、生长、繁殖、遗传、变异相联系的代谢问题等等。基于上述考虑，产生了很多研究中间代谢的方法，它们各有一定的应用范围，现就微生物中间代谢的研究方法，在试验材料处理和代谢途径的探讨方面作一概要介绍。

一、试验材料处理

微生物的中间代谢是指完整的、正常的微生物个体或群体对各种物质的分解和合成途径，以及各种内外因子对代谢过程的调节和影响。因此用正常的整体细胞作为研究试验材料，无疑是比较符合实际的。但它又有许多局限性，因此更多的是将完整的微生物细胞打碎，进而将它的各种细胞器(亚细胞组分)，甚至单独一种酶分离开来作为试验材料，然后将各种系列反应或个别反应的结果综合成代谢途径。

(一) 整体细胞

整体细胞水平进行代谢试验，通常采用静息细胞。所谓静息细胞是将培养到一定阶段的菌体(一般采用迅速生长的细胞)以缓冲液或生理盐类混合液等洗涤菌体，有时还继续在生理盐水中培养一段时间，使细胞内代谢物被消耗掉，静息细胞的制备比较方便，而且容易标准化，主要问题是应当设法消除菌体分裂周期的差异，利用同步培养法可以使分裂周期、生理状态基本一致。

静息细胞仍含有各种酶系统，故在适当培养下仍可继续生长，进行正常的代谢作用，在限制生长条件下，可以对有限底物进行分解和合成许多物质，因此可以比较精确研究一些物质的代谢和某些生长因子的需要以及部分酶的活性。完整细胞的主要优点在于细胞保持了正常状态。但是在完整细胞内物质的中间代谢过程错综复杂。因此单用完整细胞的试验结果就不能正确判明某

一物质的代谢变化途径和中间产物，更不能知道它在何种细胞器中进行，以及催化其各步反应的酶和调节因子。此外，由于细胞质膜通透障壁存在，许多物质不能渗入细胞，因此完整细胞材料的应用就有一定的限制。

(二) 无细胞制剂

将完整细胞用适当方法如研磨、超声波、溶菌酶处理、反复冰冻等予以破碎，即为无细胞制剂(或称细胞匀浆)。其主要特点是除去了细胞膜障壁，而仍然保持细胞内的酶活性，从而使许多原来不能渗入细胞的物质可以参加代谢作用。此外可将细胞匀浆通过透析除去许多小分子物质和辅酶，因此可以进行更多物质的代谢研究。其缺点是，细胞整体受到破坏，而体系仍然复杂。

(三) 亚细胞组分制剂

无细胞制剂通过超离心技术可将各种细胞器以及细胞原生质可溶组分分开，制备成各种亚细胞组分制剂，这也是代谢研究的一类重要材料。这就可能对细胞各个组分分别进行试验研究，从而了解与物质的中间代谢反应有关的酶系在细胞内分布和作用情况，推知某些代谢反应究竟在细胞内的那一部分发生，使代谢研究深入到细胞器水平。它的主要缺点是亚细胞组分离开了整体，不免带进人为的因素，如何使它保持在正常状态，是制备工作的一个重要问题。

(四) 酶提取液和提纯酶

利用酶的提取与纯化手段(见第二章)可以制得微生物细胞的酶的粗提取液和纯化酶。使用酶的粗提取液，可以利用酶对底物的专一性进行许多代谢反应包括个别反应和系列反应的研究试验；使用纯化酶制剂作为代谢试验材料，则能深入到个别代谢反应的作用历程和机理水平，并可作为整体细胞、细胞匀浆、酶的粗提取液等酶促反应存在的依据。

(五) 人工重组体系

试验材料由使用完整细胞到个别纯化酶是代谢研究由细胞水

平深入到分子水平的发展，也是由综合到分析的一种研究方式的发展。但是个别反应是否正确反映总体反应的实际情况，需要进一步加以验证，人工重组体系便是这种验证方法之一。所谓人工重组体系，即将某些系列反应的酶或亚细胞组分逐一分离出来，然后再按已有的认识，将它们重新组合起来进行代谢研究，使发生于整体细胞、细胞器或酶粗提取液的复杂反应在试管内重演（所以又名试管试验）。目前关于细胞的呼吸作用、核酸和蛋白质的合成，都能通过这种人工重组体系得到重现，使代谢研究又由个别到总体，由分析到综合方面发展，使人们对于代谢过程的认识提高到进一步的水平。但是不能说人工重组体系已经能达到再造完整细胞和细胞器的水平，而且对目前人工重组体系所实现的反应是否完全符合实际情况，仍然要采取慎重的态度，只有经过反复试验，才能得到正确的结论。

二、代谢途径的探讨

微生物中间代谢由许多连续的生物化学反应组成，这些反应大多数在酶(包括辅酶)的催化下进行，通过整体细胞、无细胞制剂或人工重组体系可以实现一些底物转化成另一些产物，但反应可能经历数个乃至数十个中间步骤。根据已有的化学知识，固然可能提出一些中间步骤的设想，而证明这些步骤存在的可靠而直接的办法是将这些中间步骤的各种中间产物分离分析出来，但是由于中间产物处于不断的动态平衡之中，其数量一般甚微，有的还不很稳定，因此按照普通的分离分析方法难以发现其踪迹。通过实践人们设计了一些方法，从而不断地分离分析到一些中间代谢物，现举数例如下。

(一) 酶活性的抑制

在反应体系中加进某种专一的酶的抑制剂，使该酶催化的反应不能进行，便可使该步反应之前的中间产物积累，得以分离分析。如在糖的酵解途径中，加入碘乙酸可抑制 3-磷酸甘油醛脱氢

酶的活性，从而使磷酸丙糖(磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛)积累，便可以分离分析。

(二) 同位素示踪法

以含有同位素的代谢物质加入反应体系，然后跟踪其去向，是中间代谢研究方法最常用最有效的方法。常用的同位素如表 4-1。

表 4-1 常用同位素表

同 位 素	放 射 性	半 衰 期
$^1\text{H}^2$	无	—
$^1\text{H}^3$	β^-	12.46 年
$^{12}\text{C}^{13}$	无	—
$^{12}\text{C}^{14}$	β^-	5720 年左右
$^{14}\text{N}^{15}$	无	—
$^{16}\text{O}^{18}$	无	—
$^{31}\text{P}^{32}$	β^-	14.5 天
$^{32}\text{S}^{35}$	β^-	87.1 天
$^{56}\text{Fe}^{59}$	$\beta^-、\gamma$	47 天
$^{59}\text{Co}^{60}$	$\beta^-、\gamma$	4.95 年
$^{131}\text{I}^{131}$	$\beta^-、\gamma$	8 天

含有同位素的物质，例如，含有重氧的脂肪酸，含有重氮的氨基酸以及含有放射性磷或放射性碳的磷酸葡糖或核苷酸，它们的化学性质与生理功能和不含同位素的同一物质完全相同。这些含同位素的物质进入反应体系后，它们的中间代谢程序也应与不含同位素的物质完全相同，即在代谢反应上可将含同位素的物质看作一种正常的代谢物，但因它们具有特殊的物理性质，所以用物理方法可以追踪它们的反应历程，并探寻它们所变成的代谢产物。

(三) 抗代谢物的应用

抗代谢物(Antimetabolite)是代谢物化学结构上的类似物，它

们在代谢反应中跟正常的代谢物相拮抗，从而减少正常代谢物参加反应的机会，因此抗代谢物也称为代谢拮抗物。例如，丙二酸与丁二酸(琥珀酸)在化学结构上类似，在反应体系中加入丙二酸能抑制琥珀酸的氧化(竞争性抑制)，从而使反应体系中琥珀酸积累，便于分离分析。

(四) 营养缺陷型菌株的应用

利用微生物诱变手段，使微生物的野生型发生变异，生成营养缺陷型的突变株。该变异菌株由于一种酶或数种酶的缺损，即丧失了合成某些代谢物的能力，因此必须在培养基中加入这些代谢物或其代用物才能生长。同时由于酶的缺损，还可能导致某些中间产物的积累。研究许多营养缺陷型变异菌株的营养需要以及积累物的化学本质，有助于对代谢途径的了解。应用营养缺陷型变异菌株，曾经对许多氨基酸合成途径的阐明起了很大的作用。例如，通过对芳香族氨基酸“多种营养缺陷型”变异菌株的研究表明，莽草酸可以代替酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、对-氨基苯甲酸等为该变异株的营养物，结合其它方法和对苯丙氨酸、色氨酸营养缺陷型菌株的研究，终于弄清了莽草酸的合成途径和整个芳香族氨基酸的合成途径。

(五) 酶活测定

根据对代谢途径已有的认识，对于代谢途径不详的菌种，应用各种试验材料进行酶活测定，也是了解代谢途径的重要方法，即在反应体系中加入一定的底物测定代谢途径中的特征性酶或特征反应。例如，对 EMP 途径和 HMP 途径可以分别测定其特征性酶——醛缩酶和 6-磷酸葡糖脱氢酶的活性，以判断该菌种有无 EMP 途径或 HMP 途径。

以上所述是比较常用的一些方法，还有不少其它的方法，各种方法对于试验材料和研究内容的适用性，试验结果的可靠性以及对设备和操作的要求各有不同，一般根据需要与可能采取几种材料和方法，互相验证和补充。

复 习 题

1. 什么叫新陈代谢?
2. 试述微生物新陈代谢的特点。

第五章 生物氧化

第一节 概 说

一、生物氧化概念

一切生物在生命活动过程中必须经常获得能量才能维持生存。这些能量的来源基本上都是来自参加代谢的物质(如糖类、脂类、蛋白质等)在体内不断地氧化。这些有机物在氧化过程中,可以释放大量的能量。如每克分子葡萄糖氧化成二氧化碳和水时释放出自由能 686 千卡。

生物体内,一切氧化作用释放能量的反应都称为生物氧化作用。

生物氧化作用是生物体新陈代谢重要的基本反应。与一切在生理条件下所能发生的其他反应(水解、脱羧、醇醛缩合等)相比较,其所能提供的能量最多。因此生物氧化是生物体生命活动最重要、最基本的供能方式。

二、生物氧化方式

高等动物通过肺进行呼吸,吸入氧气,排出二氧化碳。吸入的氧气用以氧化摄入体内的营养物质,获得能量。所以生物氧化也称呼吸作用。微生物则以细胞直接进行呼吸,故又称细胞呼吸。吸入氧气,排出二氧化碳,是呼吸的现象,它的本质是物质在生物体内的氧化作用。十九世纪,人们发现微生物不仅能在有氧条件下生存,许多微生物在无氧条件下也能进行氧化作用。因此,根据生物氧化(呼吸作用)是否有分子氧参加,而将其分为两种方

式：

1. 有氧氧化

有氧氧化也称为有氧呼吸，许多好气和兼性厌氧的微生物能利用空气中的分子氧来氧化底物，最终生成二氧化碳和水，这种方式氧化彻底，释放的能量多。

2. 无氧氧化

无氧氧化也称为无氧呼吸，这是指以非分子氧（其它氧化性物质）氧化底物的方式，又可分为两种情况：

(1) 兼性厌氧的微生物能利用体内的有机物来氧化底物，最终生成氧化不完全的产物，常称为“发酵作用”^{*}。这种方式氧化不彻底，释放的能量少。

(2) 许多厌氧微生物能以无机物氧化底物，这种情况下的氧化较为彻底，但释放的能量不如有氧氧化方式多。

三、生物氧化特点

生物氧化与非生物氧化的化学本质是相同的，都是脱氢、失去电子或与氧直接化合的过程。过程中产生能量的本质也是相同的。

然而生物氧化是在活细胞内进行的，故又具有如下的特点：

(1) 生物氧化是在酶的催化下进行的，反应条件温和。

(2) 底物的氧化是分阶段逐步进行的，故能量也是逐步释放的。这样不会因氧化过程中能量骤然释放而损害机体，同时使释放出的能量得到有效的利用。

(3) 生物氧化过程所释放的能量通常都先贮存在一些特殊的高能化合物中，主要是腺苷三磷酸(ATP)中。通过这些物质的转移作用，满足机体吸能反应的需要。

* 发酵工业上“发酵”的涵义是：不论有氧或无氧的情况下，微生物进行的任何生物化学过程都称为发酵，如酒精发酵（无氧），谷氨酸发酵（有氧）。而在生物化学中“发酵”的涵义则指微生物对有机物的无氧氧化作用。

第二节 生物氧化体系和酶类

一、生物氧化体系

生物氧化作用主要是通过脱氢反应来实现的，一般包括脱氢、递氢、受氢三个环节。这就是说，底物上脱下的氢大多数情况下不是直接交给受氢体，而是经过一些递氢体进行传递，最终交给受氢体。对于不同的微生物来说，所含有的氧化还原酶类不同，因此它们的氧化方式不同，脱氢、递氢、受氢过程也不相同，于是构成各种不同的生物氧化体系。现就生物氧化过程中底物上的氢如何脱下，以及在有氧与无氧的情况下氢的去路问题，分别讨论如下：

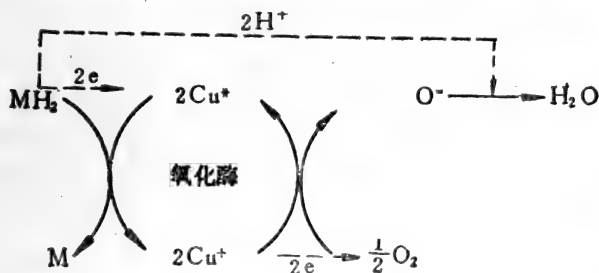
(一) 有氧氧化体系

以分子氧为最终受氢体的有氧氧化中，根据是否有传递体进行递氢过程，可分为不需传递体体系和电子传递体系。

1. 不需传递体体系

这是最简单的一种体系，该体系中没有递氢过程，底物上脱下的氢与分子氧的结合只需一种酶参与催化。根据所催化的酶的不同，又可分为氧化酶类型和需氧脱氢酶类型。

(1) 氧化酶类型 该类型的反应模式如下：



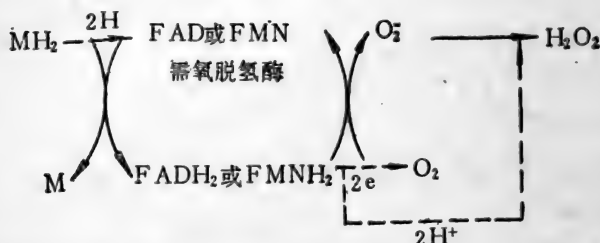
MH_2 ——底物

M ——被氧化的底物

氧化酶不能激活底物上的氢,当底物的氢解离成氢离子(H^+)和电子(e)时,氧化酶分子中的金属离子(例如 Cu^{++})取得电子,并将电子传给分子氧,使之活化成 $O^=$, $O^=$ 与氢离子结合成水。

由氧化酶催化的反应不能在无氧的情况下进行,没有任何其它的受氢体可以代替氧。

(2) 需氧脱氢酶类型 此类反应的模式为:



需氧脱氢酶能激活底物上的氢,使之脱下,其辅酶(FAD或FMN)能将氢(H_2)释放出的两个电子传给分子氧,使之活化成为 $O_2^=$, $O_2^=$ 与氢离子结合生成过氧化氢。以此种类型进行氧化的生物体内往往具有过氧化氢酶,可将 H_2O_2 分解,以避免它对机体的毒害。

在无氧的情况下,甲烯蓝或醌可代替氧作为受氢体,而使反应进行。

(3) 不需传递体体系中两种类型的比较

- ① 氧化酶不能从底物上脱氢;而需氧脱氢酶能脱氢。
- ② 最终电子受体为氧时,氧化酶类型中氧化的最终产物是水;而需氧脱氢酶类型中氧化的终产物是过氧化氢。
- ③ 氧化酶类型只能以氧作为最终电子受体;而需氧脱氢酶类型于无氧的情况下,可以甲烯蓝或醌代替氧作为最终电子受体。

2. 电子传递体系

这是生物体主要的生物氧化体系,这种体系的成员包括:以NAD为辅酶的不需氧脱氢酶、以FAD或FMN为辅基的黄素蛋

白(FP)、泛醌(UQ)、细胞色素(Cyt)b、 c_1 、c及细胞色素氧化酶(细胞色素 $a+a_3$)。在此体系中,底物脱下的氢不是直接交给氧,而是经由一系列传递体,最终传给氧。该体系通常称为电子传递体系或电子传递链,也称为呼吸链。

具有线粒体的生物中,典型的电子传递链有两种,按接受底物上脱下的氢的初始受体不同,分为NAD传递链和FAD传递链。

(1) NAD传递链 整个传递链可由图5-1表示。

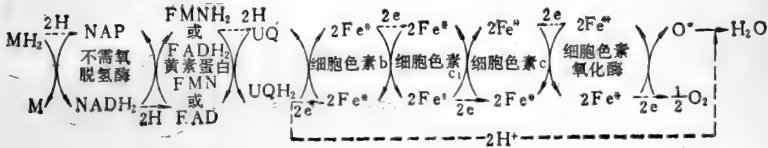


图 5-1 NAD 传递链图解

在这种电子传递链中,催化底物脱氢的是以NAD为辅酶的不需氧脱氢酶,NAD作为初始受氢体,接受氢变成NADH₂,接着NADH₂把氢传给了黄素蛋白(FP)的辅基FAD或FMN。现在认为黄素蛋白的受氢可能有非血红素铁硫蛋白参与作用。黄素蛋白的辅基FAD或FMN受氢成为FADH₂或FMNH₂。一般情况下,下一步的递氢体是泛醌(UQ),其从还原性的黄素蛋白辅基FADH₂或FMNH₂上接受氢,成为UQH₂。传递到这一步,氢开始被解离成两个氢离子(H⁺)和两个电子(e⁻),两个电子由细胞色素依次传递,各种细胞色素借铁卟啉基团上Fe²⁺/Fe³⁺的变换传递电子,传递顺序为:细胞色素b→细胞色素c₁→细胞色素c→细胞色素氧化酶。最后由细胞色素氧化酶将电子传给分子氧,使之活化成为O⁻,此时被泛醌解离的2H⁺与O⁻结合生成水,从而完成氧化过程。

(2) FAD传递链 该传递链中,催化脱氢的是以FAD为辅

基的不需氧脱氢酶，它也是一种黄素蛋白，但与 NAD 传递链中的黄素蛋白不同。

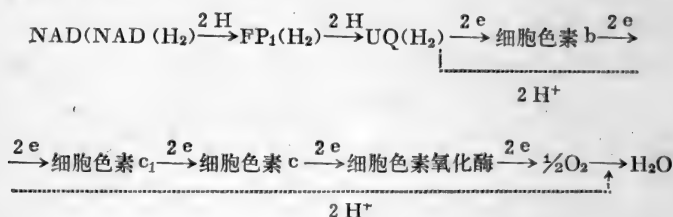


图 5-2 NAD 传递链和 FAD 传递链

从图 5-2 可以看出，FAD 传递链比 NAD 传递链少了一步递氢过程，底物上脱下的氢直接由不需氧脱氢酶的辅基 FAD 接受，随后的传递步骤和 NAD 传递链相同。

(3) 其它传递链 无线粒体的细菌的电子传递链与上述典型的传递链大致相似，不同的菌类中传递链的传递体组成有所不同，如草分枝杆菌中没有泛醌，而以维生素 K(Vk) 代替泛醌的作用，各种菌含有的细胞色素也有所差异。另外在一个细菌中，常常不只含有一种细胞色素作为传递链末端的氧化酶。

细菌可能的几种传递链如图 5-3 所示。

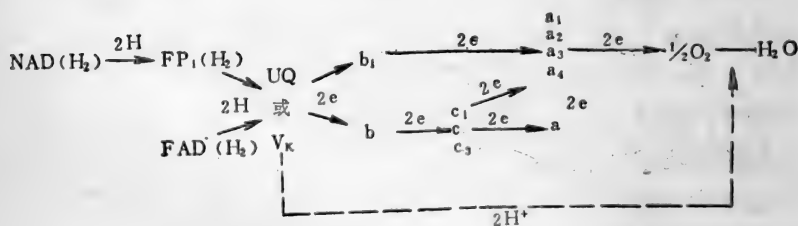


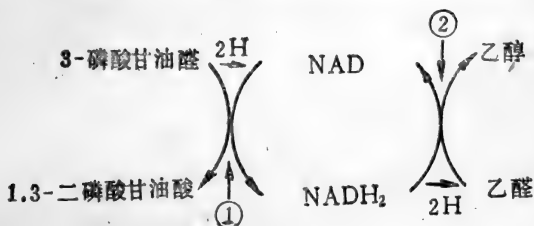
图 5-3 细菌中可能的几种传递链

(二) 无氧氧化体系

这是指在无氧情况下，以有机物或无机物为最终受氢体的生物氧化体系，分述如下：

1. 以有机物为最终电子(氢)受体的氧化体系(即发酵作用的氧化体系)

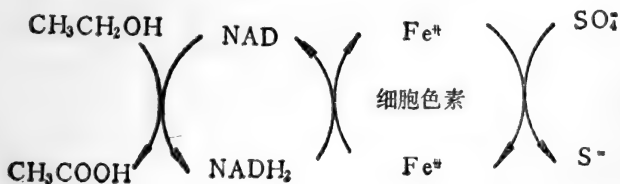
在此体系中, 作为最终电子(氢)受体的有机物通常是代谢物质中间分解产物。绝大多数情况下, 底物上脱下的氢交给了 NAD(P), 使之还原成为 NAD(P)H₂, 再由 NAD(P)H₂ 将氢转交给另一有机物。如酵母利用葡萄糖进行酒精发酵过程中:



3-磷酸甘油醛被 3-磷酸甘油醛脱氢酶脱氢, 氧化成为 1,3-二磷酸甘油酸, 脱下的氢交给 3-磷酸甘油醛脱氢酶的辅酶 NAD, 使其还原成 NADH₂。而乙醛则作为最终氢(电子)受体, 在乙醇脱氢酶(辅酶也为 NAD)的催化下, 通过 NADH₂ 把 2H 转移给乙醛生成乙醇。

2. 以无机氧化物为电子(氢)受体的无氧氧化体系

此体系常以 NO₃⁻、NO₂⁻、SO₄⁼、S₂O₃⁼、CO₂ 等无机氧化物为最终电子(氢)受体。氢(电子)的传递过程不仅有 NAD, 还有细胞色素参与。根据最终电子(氢)受体的不同, 传递体的组成也有所不同。如脱磺脱硫弧菌(*Desulfouibrio desulfuricans*)的无氧氧化体系大致为:



二、生物氧化酶类

在生物体内，氧化作用都是由酶催化的，下面讨论几种有关的氧化酶类及传递体。

(一) 氧化酶类

氧化酶是一类含铜或铁的色蛋白。氰化物和硫化氢对氧化酶有抑制作用。这类酶不多，按其所含的金属离子的不同，可分为：

(1) 含铜氧化酶 如酚氧化酶、抗坏血酸氧化酶、漆酶、酪氨酸酶等。

(2) 含铁氧化酶 如细胞色素氧化酶(也含有铜离子)。

(二) 脱氢酶类

催化脱氢的酶类，根据其是否直接将脱下的氢交给分子氧，分为需氧脱氢酶和不需氧脱氢酶。

1. 需氧脱氢酶

此类酶种类较多，皆以黄素衍生物 FAD 和 FMN 作为辅酶，呈现黄色，故称为黄素蛋白，也称为黄酶。

几种重要的需氧脱氢酶见表 5-1。

表 5-1 某些重要的需氧脱氢酶

酶 名*	辅酶或辅基	催 化 反 应
D-氨基酸氧化酶	FAD	D-氨基酸 → 酮酸 + NH ₃
L-氨基酸氧化酶	FMN	L-氨基酸 → 酮酸 + NH ₃
甘氨酸氧化酶	FAD	甘氨酸 → 乙醛酸 + NH ₃
醛氧化酶	FAD, Fe, Mo	醛 → 酸
黄嘌呤氧化酶	FAD, Fe, Mo	次黄嘌呤 → 黄嘌呤 → 尿酸
乙醇酸氧化酶	FMN	乙醇酸 → 乙醛酸
葡萄糖氧化酶	FAD	D-葡萄糖 → D-葡萄糖酸
胺氧化酶	FAD	胺 → 醛 + NH ₃

* 第一纵行所列各酶名称均系俗名，实际上是需氧脱氢酶。

2. 不需氧脱氢酶

不需氧脱氢酶可按其辅酶的不同，分为两类。

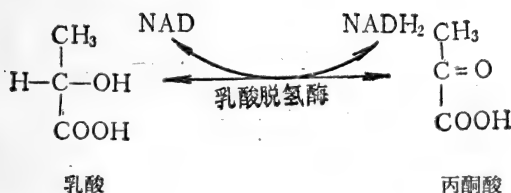
(1) 以 NAD、NADP 为辅酶的不需氧脱氢酶类 此类酶很多，已发现 150 种以上，表 5-2 列出其中几种。虽然它们的辅酶仅是 NAD 和 NADP 两种，但每一种辅酶可与各种不同的酶蛋白配合，形成各种不同的脱氢酶。酶蛋白与辅酶结合松弛。此类酶主要催化—CHOH—基团脱氢，脱下的氢为 NAD 或 NADP 所接受。

表 5-2

某些不需氧脱氢酶

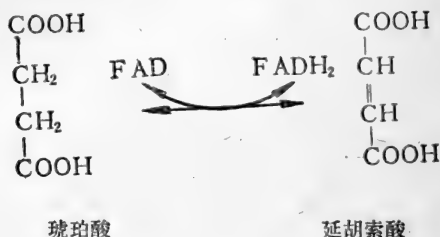
酶 名	辅酶或辅基	催 化 反 应
D- α -磷酸甘油脱氢酶	NAD	磷酸甘油 \rightleftharpoons 磷酸二羟丙酮
乳酸脱氢酶	NAD(NADP)	乳酸 \rightleftharpoons 丙酮酸
苹果酸脱氢酶	NAD(NADP)	苹果酸 \rightleftharpoons 草酰乙酸
β -羟丁酸脱氢酶	NAD	β -羟丁酸 \rightleftharpoons 乙酰乙酸
醇脱氢酶	NAD	醇 \rightleftharpoons 醛
葡萄糖脱氢酶	NADP	葡萄糖 \rightleftharpoons 葡萄糖酸
L-谷氨酸脱氢酶	NAD(NADP)	谷氨酸 \rightleftharpoons α -酮戊二酸 + NH ₃
3-磷酸甘油醛脱氢酶	NAD + 谷胱甘肽	磷酸甘油醛 \rightleftharpoons 1,3-二磷酸甘油酸
醛脱氢酶	NAD	醛 \rightleftharpoons 酸
β -羟脂酰脱氢酶	NAD	β -羟脂酰 CoA \rightleftharpoons β -酮脂酰 CoA
6-磷酸葡糖脱氢酶	NADP	6-磷酸葡糖 \rightleftharpoons 6-磷酸葡糖内酯
异柠檬酸脱氢酶	NADP(NAD)	异柠檬酸 \rightleftharpoons 草酰琥珀酸 \rightleftharpoons α -酮戊二酸
脂酰 CoA 脱氢酶	FAD	脂酰 CoA \rightarrow 烯脂酰 CoA
琥珀酸脱氢酶	FAD	琥珀酸 \rightarrow 延胡索酸

例如，乳酸脱氢酶：



(2) 以 FAD 为辅酶的不需氧脱氢酶类 这类酶不多(见表 5-2), 是一类以 FAD 为辅基的黄素蛋白, 酶蛋白与辅基结合牢固, 主要对有机物的 $-CH_2-CH_2-$ 基团脱氢, 脱下的氢为辅基 FAD 所接受。

例如, 琥珀酸脱氢酶:



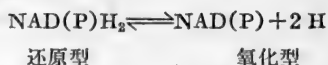
三、生物氧化体系中的传递体

传递体分为氢传递体及电子传递体两类。

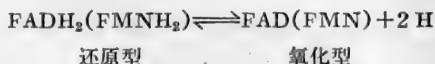
(一) 氢传递体

氢传递体能从底物上接受氢原子($H^+ + e$), 并把它传递给另一个适当的受氢体。氢传递体可分为以下几种:

(1) 烟酰胺核苷酸类 它们都是不需氧脱氢酶的辅酶, 有 NAD(辅酶 I) 和 NADP(辅酶 II) 两种。它们的氧化型和还原型互相转变时起了递氢作用。



(2) 异咯嗪核苷酸类 它们是黄素蛋白的辅基, 有 FAD 和 FMN 两种。它们也是以氧化型和还原型之间的相互转变起递氢作用。



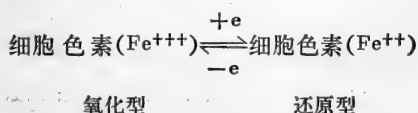
(3) 泛醌(UQ) 泛醌又称为辅酶 Q, 它是小分子化合物, 氢传递到 UQ 后, 被解离成氢离子和电子, UQ 将电子传给细胞色

素，在呼吸链中，UQ 的分子数往往比细胞色素多好几倍。

各类递氢体的递氢机制详见第二章。

(二) 电子传递体

电子传递链中，由细胞色素专门传递电子，它们都是以铁卟啉为辅基的色蛋白。按各种细胞色素处于还原态时吸收光带的不同，将它们分为 a、b、c 三大类。不同的细胞色素，蛋白质部分和铁卟啉的侧链都不相同。其传递电子的机制是借辅基铁卟啉上铁原子价的可逆变化而进行的。



细胞色素的基本结构详见第二章。

第三节 生物氧化过程中能量的转移和利用

生物氧化的功能是为生物体的生命活动提供能量，生物体只能利用化学能和光能(植物和某些光合细菌)。本节将讨论生物氧化过程中化学能的释放、转移和利用。

一、氧化还原电位及自由能的变化

化学能是化合物的属性，化学能主要以键能的形式贮存在化合物的原子间的化学键上，原子间的化学键靠电子以一定的轨道绕核运行来维持。电子占据的轨道不同，其具有的电子势能就不同。当电子自一较高能级的轨道转移到一较低能级的轨道时，就有一定的能量释放，反之，则要吸收一定的能量。氧化还原的本质是电子的迁移，即电子从一个化合物至另一个化合物(从某一能级至另一能级)的迁移运动。因此，不难理解，生物氧化过程中，由于被氧化的底物上的电子势能发生了跃降而有能量释放。

(一) 氧化还原电位

在生物氧化反应中，通过研究各种化合物对电子的亲合力，可以了解它们容易被氧化(作为电子供体)，还是容易被还原(作为电子受体)。通常用氧化还原电位相对地表示各种化合物对电子亲合力的大小。

许多重要的生物物质氧化还原体系的氧化还原电位已被测定。表 5-3 列出生物体中某些重要氧化还原体系的氧化还原电势 E'_0 。

表 5-3 生物体中某些重要氧化还原体系的氧化还原电势 E'_0 (pH7.0, 25~30°C)

氧化还原体系 (电极式)	标准电位 E'_0 (伏)
乙酸 + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons 乙醛	-0.58
2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons H ₂	-0.42
α -酮戊二酸 + CO ₂ + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons 异柠檬酸	-0.38
乙酰乙酸 + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons β -羧丁酸	-0.346
NAD ⁺ + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons NADH + H ⁺	-0.32
NADP ⁺ + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons NADPH + H ⁺	-0.197
丙酮酸 + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons 乳酸	-0.185
草酰乙酸 + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons 苹果酸	-0.166
FAD + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons FADH ₂	-0.06
延胡索酸 + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons 琥珀酸	-0.031
2 细胞色素 bFe ⁺⁺⁺ + 2e \rightleftharpoons 2 细胞色素 Fe ⁺⁺ (氧化型) (还原型)	+0.03
辅酶 Q + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons 还原型辅酶 Q	+0.10
2 细胞色素 CFe ⁺⁺⁺ + 2e \rightleftharpoons 2 细胞色素 CFe ⁺⁺ (氧化型) (还原型)	+0.235
2 细胞色素氧化酶 Fe ⁺⁺⁺ + 2e \rightleftharpoons 2 细胞色素氧化酶 Fe ⁺⁺ (氧化型) (还原型)	+0.385
$\frac{1}{2}$ O ₂ + 2H ⁺ + 2e \rightleftharpoons H ₂ O	+0.816

从表中所列的数据，可以预期任何两个氧化还原体系如果发生反应时，其氧化还原反应朝哪个方向进行。因为氧化还原电势较高的体系，其氧化能力也较强。反之，氧化还原电势较低的体

系，其还原能力也强。从表 5-3 中可看出 $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 系统可能氧化所有在它以下的各个体系，反过来说，这些体系也都可使 $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 体系还原。

氧化还原体系对生物体之所以重要，不只是因为生物体内许多重要反应都属于氧化还原反应，更重要的是生物体的能量来源于体内所进行的氧化还原反应。要了解氧化还原体系和能量之间的关系必须弄清有关能量的一些基本概念。

(二) 生物氧化中自由能的变化

对于生化过程能量变化的描述，热力学概念中最有说明意义的是自由能 G 。生物氧化反应近似于在恒温恒压状态下进行，过程中发生的能量变化可以用自由能变化 ΔG 表示。 ΔG 表达了不包括体积功在内，反应所提供的最大的可利用的能量。按照惯例，反应是自发进行的， ΔG 具有负值，表示过程中有能量释放；如果反应是被动进行的，则 ΔG 具有正值，表示反应必须从外界获得能量才能进行。 ΔG 的符号表达了反应发生的方向；而 ΔG 的数值则表达了自由能变化的量的大小。

在实验的基础上，总结出反应的自由能变化与两个体系的氧化还原电位之差有如下关系：

$$\Delta G = -nF\Delta E$$

式中 n ——迁移的电子数

F ——法拉第常数(23063 卡/伏特)

ΔE ——发生反应的两个氧化还原体系之电位差

利用这个式子对于任何一对氧化还原反应都可由 ΔE 方便地计算出 ΔG

例如，NAD 传递链中 $\text{NAD}/\text{NADH} + \text{H}^+$ 的氧化还原标准电位为 -0.32 V ，而 $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 的氧化还原标准电位为 $+0.82 \text{ V}$ ，则一对电子自 NADH_2 传递至氧原子的反应中，标准的自由能变

化可按上式得到：

反应中电位差：

$$\Delta E = 0.816 - (-0.32) = 1.136 \text{ (伏)}$$

自由能变化：

$$\Delta G = -2 \times 23063 \times 1.136 = -52.4 \text{ (千卡)}$$

然而在生物体内，并不是有电位差的任何两体系间都能发生反应，如上述 $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ 和 $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 两体系之间的电位差很大，它们之间直接反应的趋势很强烈。但是这种直接反应通常不能发生，因为生物体是有高度组织的（本章最后讨论），氢（电子）通过组织化了的各传递体按顺序传递，能量的释放才能逐步进行。

二、氧化磷酸化

生物氧化过程中所释放的能量，除一部分被同时发生的吸能反应利用或转化为热而散发外，还有一部分转移至高能化合物贮存起来，以供需要时使用。

（一）高能化合物

高能化合物是指含转移势高的基团（即很容易转移的基团，如高能磷酸基团和带硫酯键的 $\sim\text{SCoA}$ 基团）的化合物。连接这种高能基团的键，通常称为高能键，以符号 \sim 来表示。高能键水解时，可释放出大量的能量。如一般磷酸酯键水解时，仅能释放出 1~3 千卡能量，而高能磷酸键水解时所释放的能量可达 7~14 千卡。

生物体内的高能化合物有许多种，其中以 ATP 为最重要，当 ATP 水解转变成 ADP 时所放出的能量约为 8 千卡。嘌呤、嘧啶类核苷酸高能化合物详见第三章。此外，微生物体内还含有其它几种高能化合物，见表 5-4。

生物体内的各种生化反应，有放能反应，也有吸能反应。放

表 5-4

其它几种高能化合物

高能化合物	高能键形式	水解时 ΔG (千卡/克分子)
磷酸烯醇式丙酮酸	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C}-\text{O} \sim \text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{O} \end{array}$ 烯醇磷酸键	-14.8
1,3-二磷酸甘油酸	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O}-\text{P} \\ \\ \text{CHOH} \quad \text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{C}-\text{O} \sim \text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$ 酰基磷酸键	-13.6
乙酰磷酸	$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{CH}_3\text{C}-\text{O} \sim \text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$ 酰基磷酸键	-10.1
乙酰辅酶A	$\begin{array}{c} \text{O} \\ // \\ \text{CH}_3\text{C} \sim \text{SCoA} \end{array}$ 硫酯键	-7.5
琥珀酰辅酶A	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_3\text{C} \sim \text{SCoA} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{O} \end{array}$ 硫酯键	-7.7

能反应放出的能量通常被贮存在高能化合物（主要是ATP及酰基辅酶A）中，然后再转给吸能反应。当放能反应释放出的能量较少，不足以形成高能键时，这一部分能量就只能以热的形式散发；当一个放能反应放出的能量形成高能键有余时，剩余的能量也只能以热的形式散发。故生物体内能量的利用率不可能达到100%。

ATP和脂酰辅酶A在能量转移中所起的作用举例说明如下：

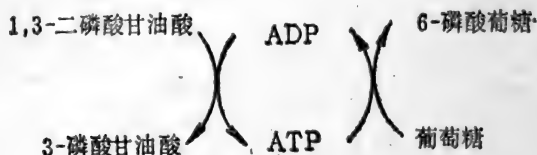
例1 在酵解途径中，由葡萄糖生成6-磷酸葡萄糖是吸能反应，不能单独进行，当由ATP供给能量时，反应才能进行：



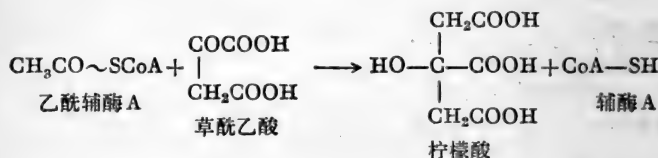
所生成的 ADP 可与其它高能磷酸化合物作用，把高能磷酸键转移过来，形成 ATP，如：



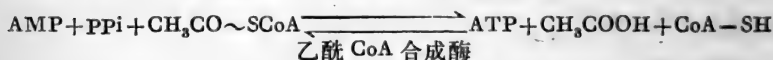
整个反应过程可表示如下：



例 2 脂酰辅酶 A 是具有硫酯键的高能化合物，它的高能键可以直接供合成某些化合物之用，如乙酰辅酶 A 可用来合成柠檬酸：



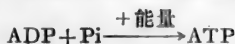
另外，乙酰辅酶 A 的能量也可用以合成 ATP：



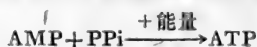
可见在生物体内，ATP 与能量转移的关系最为密切，因此 ATP 的生成和利用成了生物体能量代谢的中心问题。

(二) ATP 的生成

在生物体内，ATP 主要由 ADP 的磷酸化所生成：



少数情况下，可由 AMP 的焦磷酸化而生成：



底物磷酸化与氧的存在与否无关，它是以发酵作用进行生物氧化取得能量的唯一方式。

2. 电子传递磷酸化

这是生成 ATP 的一种主要方式，往往就简称为氧化磷酸化。在传递链中，底物上脱下的氢进入电子传递体系，最终传给了氧。人们发现这个过程正常进行时，只要有 ADP 和 P_i 存在，就有 ATP 生成，也就是说电子传递过程和磷酸化作用是相偶联的。

过程中氧的消耗和 ATP 生成的个数之间有着一定的关系。这种关系用 P/O 比值来表示，P/O 比值的高低表明了每消耗一个原子的氧所能生成的 ATP 分子个数的多少。P/O 比值可用华勃呼吸仪测定氧的消耗，同时测无机磷酸的消耗量或 ATP 的增加量来推算。

通过实验测定底物上的 H_2 经 NAD 传递链进入电子传递体系直至被氧化成水，其 P/O 比值为 3，这表示了在这个过程中每消耗一个氧原子有三分子 ATP 生成。在 FAD 呼吸链中，测得 P/O 比值是 2。另外，人为地以细胞色素 C 作为初始电子供体时，测得 P/O 比值为 1。

实验表明，NAD 传递链中，3 分子 ATP 不是集中在某一传递步骤中产生，而是可能分别产生于下列的部位：

至于每一步 ATP 生成的机理，目前尚未能确定。

已知 NAD 传递链中，电子自 $NADH_2$ 传递至 $1/2 O_2$ ，可以释放出 52.5 千卡的能量，而在这过程中由 3 分子 ADP 和 P_i 生成 3 分子 ATP 时，被贮存的能量为 $3 \times 8 = 24$ 千卡，能量利用率为 42% 左右。

如果不需传递体系，其氧化过程虽也能释放能量，但因未与磷酸化作用相偶联，能量只能以热的形式散发。

(三) 电子传递磷酸化的解偶联作用

电子传递磷酸化是一种偶联作用，正常情况下，电子经传递链传递时总伴随有 ATP 的生成。但有些化合物则能破坏这种偶

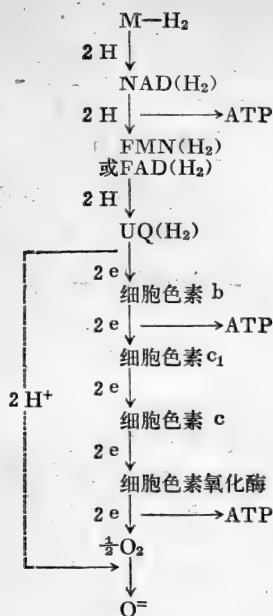


图 5-4 NAD传递链中ATP生成的可能位置

联关系，此类化合物并不影响电子的传递，却抑制了ATP的生成。这些化合物有二硝基苯酚(DPN)、寡霉素、短杆菌肽、缬氨霉素等，称为解偶联剂。大部分解偶联剂都是脂溶性弱酸，它们的作用与呼吸抑制剂不同，呼吸抑制剂能破坏电子的传递，得不到能量，ATP当然无法生成。

关于解偶联剂的作用机制目前尚未研究透彻，不过它们的特殊作用使得它们可以成为探讨氧化磷酸化机理的一种有用的工具。

三、线粒体与氧化磷酸化的关系

一般可以在细胞质中发生的反应，只要反应中间产物能接触到下一步的酶，反应就能进行下去。然而电子传递磷酸化作用则不同，在递氢递电子过程中许多还原态的小分子要依次序反应，

这就要求排除其它氧化环境的影响。

二十世纪以后，人们观察到具有线粒体的真粒细胞中，电子传递磷酸化作用是在线粒体内膜上进行的。线粒体的结构特点为其提供了免受干扰的场所（见图 5-5）。线粒体的外膜和内膜都是由类脂和蛋白质组成的，它们对离子和电子的自由通过起了一定的障碍作用，使得膜的两侧即使存在很大的电位差时，氧化还原反应也不能随便发生，这样在内膜上进行的氧化磷酸化作用就不受外界氧化环境的影响。

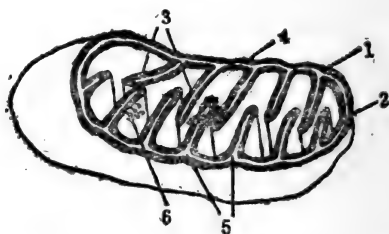


图 5-5 线粒体模式图

1—外膜 2—内膜 3—嵴 4—基质 5—内外膜间隙
6—内膜上的颗粒

现在已知各种细胞色素都是非水溶性的，它们能够结合在内膜上类脂的疏水环境中起传递电子作用。现代研究还发现，电子传递体系中的各传递体是按一定的顺序排列在内膜上，整个递氢、递电子过程犹如工厂的流水作业线一样按顺序进行。在这个过程中，ATP 是在内膜的颗粒上生成的，这些颗粒是 ATP 酶的复合物。

无线粒体的原核细胞也能进行氧化磷酸化作用。根据研究，发现细菌有一种复杂的细胞器，称为间体 (mesosome)，间体是由细胞质膜内凹而成的膜系统。虽然这些膜系统的功能大多未能肯定，但一般认为间体上含有细菌的琥珀酸脱氢酶及与电子传递有关的酶类和传递体。因而认为间体具有类似线粒体的功能。

复 习 题

1. 生物氧化作用对于生物体有何意义？
2. 何谓“发酵作用”，试举例说明。
3. 其核细胞与原核细胞的电子传递体系有何不同？
4. ATP 与能量代谢的关系如何？

第六章 糖类代谢

第一节 概 说

糖类是生物体的基本营养物质和重要组成成分。糖类的代谢，即糖类物质在生物体内所起的一切生物化学变化，包括分解和合成两个方面。不同生物的代谢各有其特殊性，但它们的基本过程则相类似。

糖的分解代谢是指糖类物质分解成小分子物质的过程。糖在生物体内经过一系列的分解反应后，便释放出大量能量，可供生命活动之用。同时，糖分解过程中形成的某些中间产物，又可作为合成脂类、蛋白质、核酸等生物大分子物质的原料(作为碳架)。例如葡萄糖分解代谢的中间产物丙酮酸可以转化成丙氨酸，作为合成蛋白质的原料；丙酮酸又可转化为乙酸(以乙酰辅酶A形式)，从乙酸可以合成高级脂肪酸，它是合成脂肪的原料。由此可见，糖类物质是大多数微生物、动物及人类在生命活动过程中的主要能源和碳源。

糖的分解代谢可分为无氧分解和有氧分解两类。在无氧条件下，糖的分解常不完全，此时释放的能量较少，并产生各种代谢产物。在有氧条件下，则可完全氧化，最终生成二氧化碳和水，并释放出大量能量。

糖的合成代谢是指生物体将某些小分子非糖物质转化为糖或将单糖合成低聚糖及多糖的过程。这是需要供给能量的过程。例如某些光能自养型微生物和绿色植物能以二氧化碳作为碳源，日光作为能源合成糖类；大多数微生物能以单糖合成包括细胞壁多糖在内的各种多糖。

糖的分解代谢和合成代谢并不孤立地进行，而是互有联系或是可逆地变化的。同时，在糖类代谢过程中需要酶(包括辅酶)及无机离子参加。

必须指出，糖的代谢还包括生物体对糖的吸收以及代谢产物的排泄。就微生物而言，这些过程是通过细胞膜来完成的。只是一般不列入中间代谢范畴内讨论。本章着重讨论微生物体内的糖类的分解代谢。

糖类物质是目前发酵工业中最常用的原料，其中尤以淀粉质原料和糖质原料为主，如薯类、大米、大麦、小麦、玉米、高粱、糖蜜以及各种水果等。在糖的分解代谢产物中，有些直接就是发酵产品，如酒精、乳酸、甘油、柠檬酸等。有些中间产物经过转化则能生成氨基酸、核苷酸、酶、抗菌素等产品。例如糖代谢的中间产物 α -酮戊二酸，经过还原氨基化作用后即生成谷氨酸。因此，掌握糖代谢的规律，从而根据微生物的营养要求和代谢特点，找出发酵的最适宜条件，使微生物的代谢活动能按照人们要求的方向进行，这对于提高发酵产率，发展新产品具有重要的指导意义。

第二节 多糖的分解

多糖是由很多单糖组成的复合糖类，如淀粉、纤维素、菊糖、琼脂、半纤维素、果胶质等，大量存在于植物体内。微生物细胞中的多糖可分为两类：一类为细胞的贮藏物质，在细胞内呈不溶性颗粒。如酵母菌及一些细菌和霉菌的细胞中含有糖原的颗粒。另一类参与细胞结构，如组成细菌的荚膜和各种微生物的细胞壁等(表6-1)。

多糖的分子结构都很复杂，从化学组成分析，多糖是由大量单糖分子脱水缩合而成，分子很大，所以不能透过细胞膜。多糖作为微生物营养时，必须在微生物细胞外被相应的酶水解为单糖

表 6-1

组成微生物细胞结构的几种多糖

多糖名称	水解产物	微生物
多聚葡萄糖	葡萄糖	肠膜状明串珠菌、圆酵母菌的荚膜
多聚果糖	果糖	枯草芽孢杆菌等的粘液层、链球菌的荚膜
多聚半乳糖	半乳糖	青霉菌某些种的细胞壁
酵母菌荚膜多糖	木糖甘露糖葡萄糖酸	新隐球酵母菌
多聚戊糖	木糖	圆酵母菌的荚膜
纤维素	葡萄糖	胶粘醋酸菌的粘液层、水生真菌的细胞壁
几丁质(甲壳质)	氨基葡萄糖	大多数真菌的细胞壁

或双糖，才能被吸收和利用。

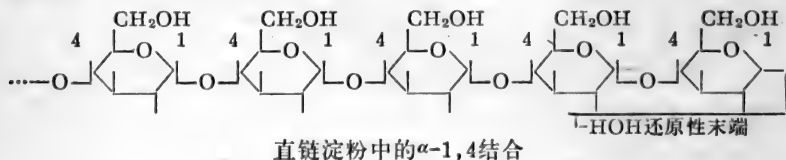
一、淀粉和淀粉酶

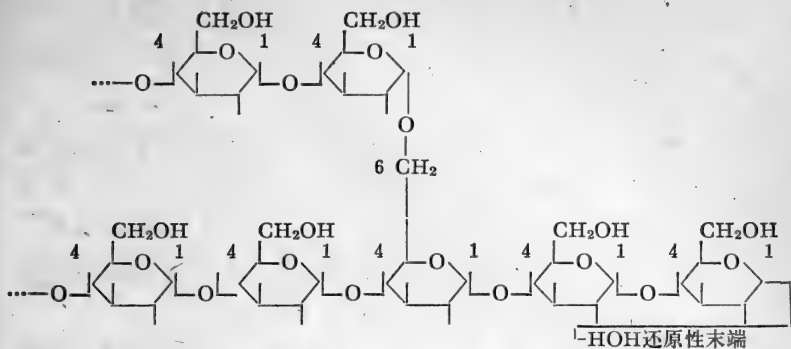
淀粉是最重要的多糖。植物的种子(稻、麦、玉米、小米等)和果实(栗子、银杏等)以及块根、块茎(山芋、马铃薯等)中都含有大量的淀粉。许多野生植物的种子、果实和块根、块茎中也都含有较多的淀粉。淀粉是粮食的主要成分，也是发酵工业的重要原料。

(一) 淀粉分子的结构

淀粉在植物体中往往以颗粒状态存在，这种颗粒称为淀粉颗粒。淀粉颗粒由大量的淀粉分子所组成。

淀粉颗粒中的淀粉分子，根据其化学结构的特点可以分为直链淀粉和支链淀粉两类。直链淀粉由大量葡萄糖分子脱水缩合，以 α -D-1,4-葡糖苷键(简称 α -1,4结合)组成不分支的链状结构。支链淀粉也由大量葡萄糖分子脱水缩合组成，它的结构中除 α -1,4结合外，还有 α -1,6结合构成的分支，形成具有分支的链状结构。





支链淀粉中的 α -1,4 结合和 α -1,6 结合

直链淀粉和支链淀粉的分子大小都不是均一的，并且分子间大小相差很大。直链淀粉分子大小可以在 240~3800 葡萄糖单位的范围之间。支链淀粉的分子大小及分支程度也是不同的。一般认为在支链淀粉分子中，每隔 8~9 个葡萄糖单位就有一个分支，平均每个分支的长度约为 20~30 个葡萄糖单位，一个支链淀粉分子中有几十到几百个分支，支链淀粉分子大小在 1000~37000 个葡萄糖单位之间。（淀粉分子中含有的葡萄糖单位的数量称为重合度，用符号 DP 表示。例如某淀粉分子的 DP 为 1000，表示这种淀粉分子由 1000 个葡萄糖单位组成。）

直链淀粉和支链淀粉虽由大量葡萄糖构成，但各葡萄糖单位的具有还原性的醛基在 α -1,4 结合和 α -1,6 结合中构成糖苷键，因此在直链淀粉分子中祇剩有末端一个葡萄糖单位上有一未结合的自由醛基，称为还原性末端，另一末端称为非还原性末端。支链淀粉分子中虽有几十个甚至几百个分支末端，但其中祇有一个还原性末端。

（二）淀粉的水解

淀粉可用酸水解，水解的最终产物是葡萄糖。淀粉不完全水解时则生成糊精。淀粉酶也可催化淀粉的水解。

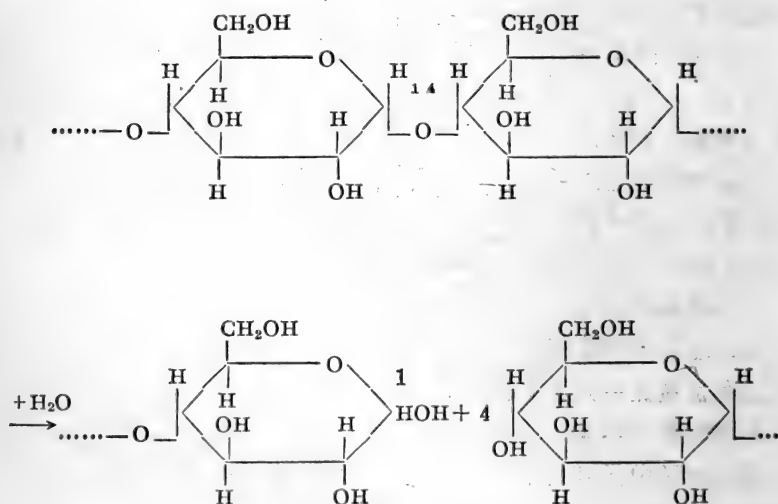
糊精是淀粉不完全水解的产物，它的结构与淀粉结构相似。

由于糊精是在淀粉水解过程中产生的，它的分子大小没有一定，可以是比淀粉稍小一点的分子，也可以是只包含4~5个葡萄糖单位的小分子。

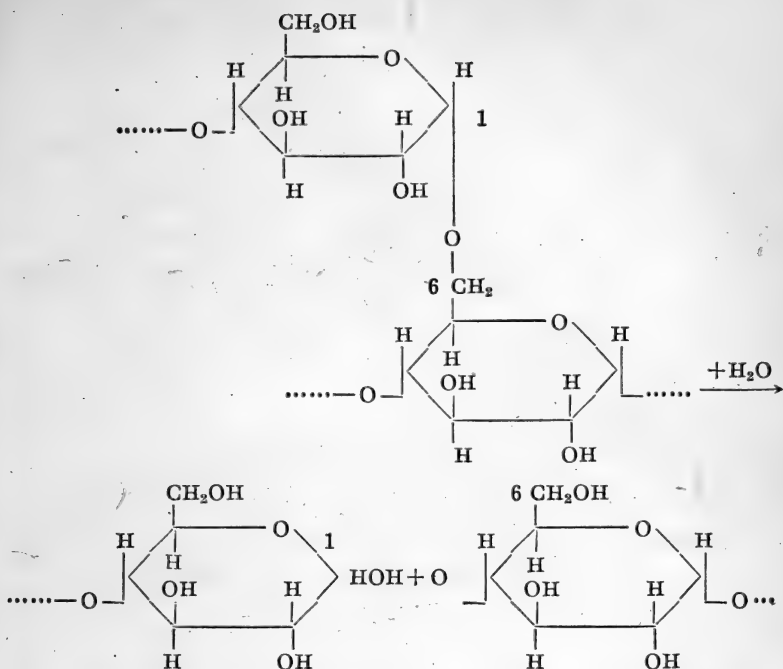
由于淀粉分子很大，所以它不能透过微生物细胞膜进入细胞内。某些能利用淀粉的微生物，可以向细胞外分泌淀粉酶，使淀粉水解成葡萄糖后才被吸收入细胞内作进一步降解。而另一些不能分泌淀粉酶的微生物，则必须用酸或借助于其他来源的淀粉酶水解淀粉成葡萄糖后，才能被其吸收利用。

淀粉酶是催化水解淀粉分子中糖苷键的一类酶的总称。淀粉酶对淀粉分子中两种糖苷键的水解反应如下：

α -D-1,4-葡萄糖苷键的水解：



α -D-1,6-葡萄糖苷键的水解：



各种生物产生的淀粉酶的性质不同，它对两种糖苷键的水解能力及反应产物也各不相同。根据其作用特点大致可分为四类

表 6-2

淀粉酶分类表

酶 名	来 源	作用的键	反应主要产物
淀粉-1,4-糊精酶	动物(唾液、胰脏) 植物(麦芽等) 细菌霉菌、酵母	α -D-1,4-葡萄糖苷键	糊精
淀粉-1,4-麦芽糖苷酶	植物(甘蔗、大麦) 细菌	α -D-1,4-葡萄糖苷键	麦芽糖, 糊精
淀粉 $\begin{smallmatrix} 1,4 \\ 1,6 \end{smallmatrix}$ -葡萄糖苷酶	霉菌	α -D-1,4-葡萄糖苷键 与 α -D-1,6-葡萄糖苷键	葡萄糖
淀粉-1,6-糊精酶	酵母、马铃薯	α -D-1,6-葡萄糖苷键	糊精

(表 6-2):

1. 淀粉-1,4-糊精酶(α -淀粉酶、液化型淀粉酶)

此酶能在淀粉链的内部水解 α -D-1,4-葡萄糖苷键 (图 6-1), 生成小分子糊精及少量麦芽糖和葡萄糖, 淀粉链越长, 水解的速度越快, 淀粉溶液的粘度迅速下降。当淀粉被水解成为短链糊精时, 水解速度就很慢, 要使糊精进一步水解则需很长时间, 所以此酶的主要作用是使淀粉水解生成糊精, 故称液化型淀粉酶或糊精化酶。

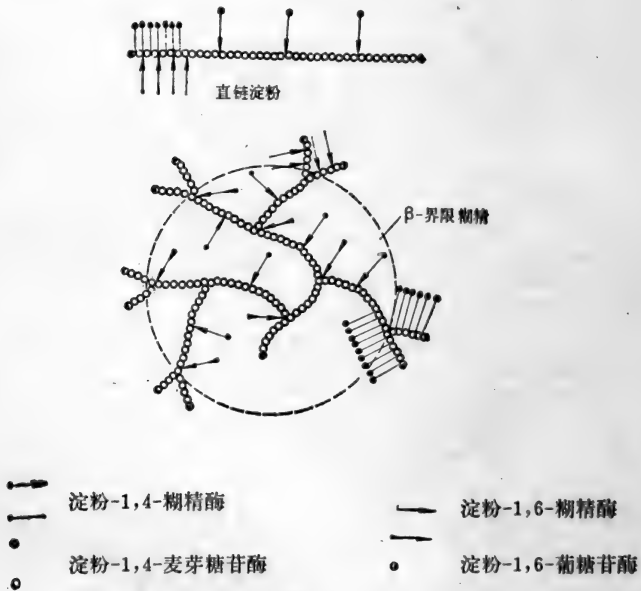


图 6-1 各种淀粉酶对直链淀粉、支链淀粉的作用方式示意图

此酶虽然能水解淀粉链的 α -D-1,4-葡萄糖苷键, 但它不能水解麦芽糖, 它的最小作用底物是麦芽三糖。

此酶水解淀粉生成的麦芽糖及葡萄糖都是 α -型，所以又称为 α -淀粉酶。

此酶不能水解 α -D-1,6-葡萄糖苷键，所以它作用于支链淀粉时，有异麦芽糖产生。

2. 淀粉-1,4-麦芽糖苷酶(β -淀粉酶)

此酶作用于淀粉时，从淀粉链的非还原性端开始，水解它的 α -D-1,4-葡萄糖苷键，水解时沿着淀粉链每次水解掉两个葡萄糖单位(图6-1)，产物为麦芽糖。由于它只能从淀粉链的外部开始依次进行水解，故水解速度较慢，不能象 α -淀粉酶那样使淀粉溶液粘度迅速降低。

此酶在水解淀粉的 α -D-1,4-葡萄糖苷键的同时，起了一个转位反应，将 α -型转变为 β -型，即水解产物为 β -麦芽糖，因此又称为 β -淀粉酶。

此酶不能水解 α -D-1,6-葡萄糖苷键，故在水解支链淀粉到达分支点时，就停止作用，而且也不能绕过分支点继续作用，因此剩下大分子量的分支糊精(称为 β -界限糊精)不能被水解。

3. 淀粉-1,4-葡萄糖苷酶(葡萄糖淀粉酶、 γ -淀粉酶)

这类淀粉酶能水解淀粉的 α -D-1,4-葡萄糖苷键和 α -D-1,6-葡萄糖苷键。它作用于淀粉时从淀粉的非还原性端开始，顺次水解 α -D-1,4-葡萄糖苷键，将葡萄糖一个一个水解下来(图6-1)。对于支链淀粉，当水解到分支点时，一般先将 α -D-1,6-葡萄糖苷键断开，然后继续水解，所以能够将支链淀粉全部水解成葡萄糖。

此酶在水解时，也能起转位反应，所以产物为 β -葡萄糖。

此酶虽能水解 α -D-1,6-葡萄糖苷键，但不能水解异麦芽糖，即不能水解单独存在的 α -D-1,6-葡萄糖苷键，但它能水解 β -界限糊精。

4. 淀粉-1,6-糊精酶(脱支酶)

这类酶能水解支链淀粉分子中的 α -D-1,6-葡萄糖苷键，使支链淀粉变成直链状的糊精(图6-1)，所以称为脱支酶。各种不同

来源的脱支酶，如酵母中的异淀粉酶、某些植物中的 R-酶均有脱支能力，但各种脱支酶的最小作用底物稍有差异。

(三) 糖原和糖原的降解

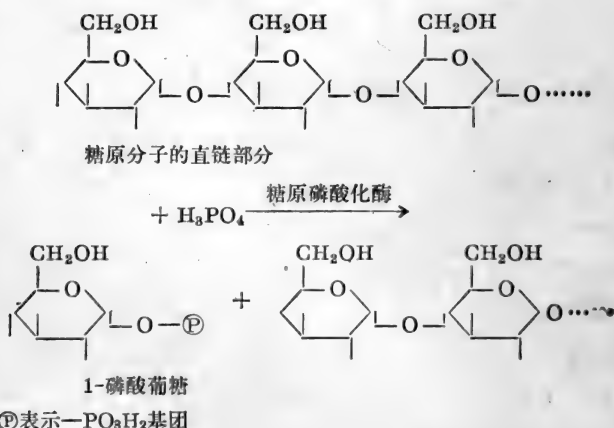
1. 糖原

淀粉是植物体中作为营养物质贮存的多糖，糖原是在微生物及人体和动物的肝脏中贮存的一种多糖。糖原的化学结构与支链淀粉十分相似，但糖原的分支程度比支链淀粉高。平均每隔 3~5 个葡萄糖单位就有一个分支，每个分支的平均长度约在 8~12 个葡萄糖单位。糖原的分子大小与支链淀粉相近，分子量约在几百万上下。

2. 糖原的降解

目前认为生物体内糖原的降解主要是由糖原磷酸化酶和脱支酶合作，可以降解糖原分子为 1-磷酸葡糖及少量葡萄糖。

糖原磷酸化酶作用于糖原分子的 α -D-1,4-葡糖苷键，从直链部分的非还原性端开始，逐个进行磷酸解反应。

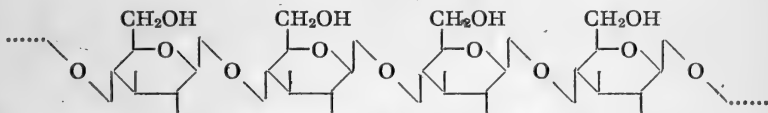


糖原磷酸化酶不能作用于 α -D-1,6-葡糖苷键，所以不能完全降解糖原分子，残剩的具分支的糖原部分称为糖原磷酸化酶极限糊精。

具分支的磷酸化酶极限糊精可为脱支酶水解其 α -D-1,6-葡萄糖苷键，产物为葡萄糖和另一直链糊精，该糊精又可为糖原磷酸化酶继续降解。糖原磷酸化酶和脱支酶的协同作用，则可使其完全降解。所生成的 1-磷酸葡萄糖及少量葡萄糖即进入葡萄糖的降解途径被进一步分解。

二、纤维素和纤维素酶

纤维素大量存在于植物细胞壁中，少数水生真菌细胞壁也有纤维素。纤维素从组成上来说和淀粉一样，都是由葡萄糖组成，但它是由于 β -D-1,4-葡萄糖苷键组成的多糖，所以在性质上与淀粉有显著的区别。天然纤维素以直链式结构存在，链与链之间有一定的晶状结构和排列次序较差的无定形结构；许多纤维素分子以定形或无定形方式组合成微原纤维；许多微原纤维集束成微纤维；微纤维穿插于填充性物质——半纤维素和木质素之中。



纤维素分子结构中的 β -D-1,4-葡萄糖苷键

纤维素分子也是分子很大的多糖，分子量可达数十万，甚至数百万，不能为微生物细胞所直接吸收利用。天然纤维素可用无机酸水解成葡萄糖。有些微生物能够产生纤维素酶。纤维素酶是水解纤维素的一类酶的总称。它至少包括三种类型，即破坏天然纤维素晶状结构的 C_1 酶，水解游离(直链)纤维素分子的 C_x 酶和水解纤维二糖的 β -葡萄糖苷酶。三类纤维素酶的作用顺序如下：



纤维素酶的存在有两种方式：胞外酶，溶解游离于培养基中，霉菌中产生的纤维素酶属于这种形式；细胞表面酶，结合存在于细胞表面上，如粘细菌的纤维素酶存在于细胞壁内。

产生纤维素酶的微生物，在真菌中有木霉、漆斑霉、黑曲霉、青霉、根霉等；在细菌中有纤维粘菌属、生孢纤维粘菌属和纤维杆菌属。在放线菌中有黑红旋丝放线菌、玫瑰色放线菌、纤维放线菌及白玫瑰放线菌等。总的说来，在已发现的产生纤维素酶的菌株中，分解天然纤维素的能力较弱，即 C_1 酶的活力不高。因此在应用方面受到一定的限制。

第三节 双糖的分解

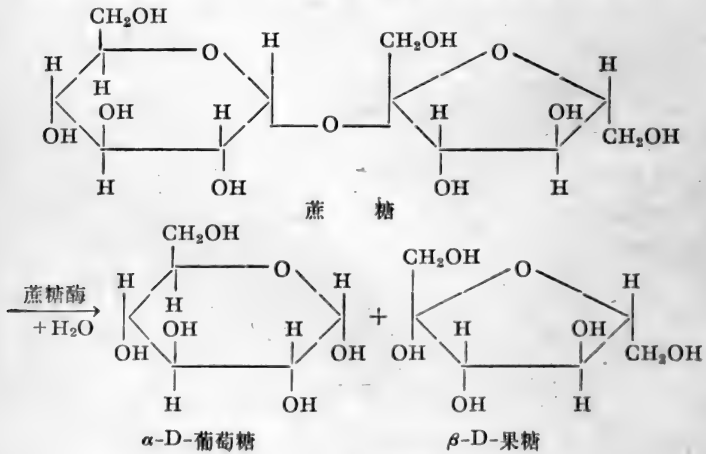
许多双糖可被微生物利用。例如蔗糖、麦芽糖、乳糖等。微生物利用这些双糖时，首先将其水解或磷酸解，然后再进入单糖降解途径。

分解双糖的酶大多为胞外酶，也有在细胞表面或细胞内的。

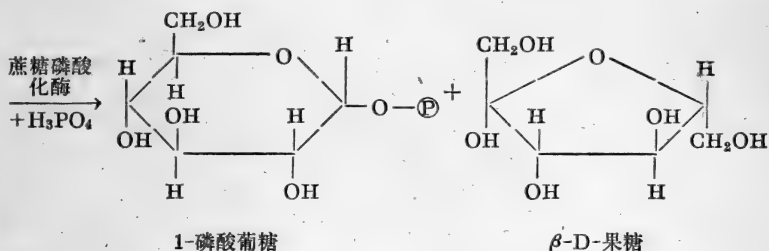
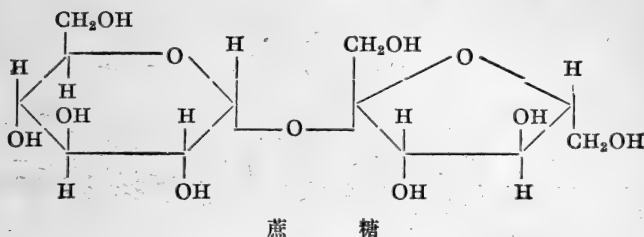
一、蔗糖的分解

蔗糖由葡萄糖和果糖构成，广泛分布于自然界，如植物的叶、茎、种子、果实和根内。

蔗糖可被蔗糖酶(又称转化酶)水解为葡萄糖和果糖。



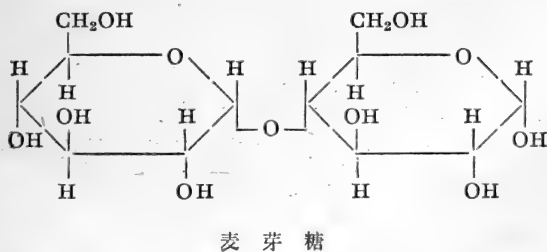
在某些微生物体内含有蔗糖磷酸化酶，可催化蔗糖磷酸解反应，生成 1-磷酸葡萄糖和果糖。

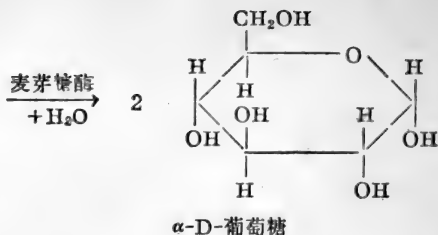


二、麦芽糖的分解

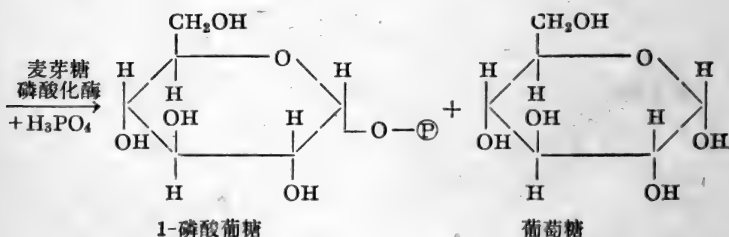
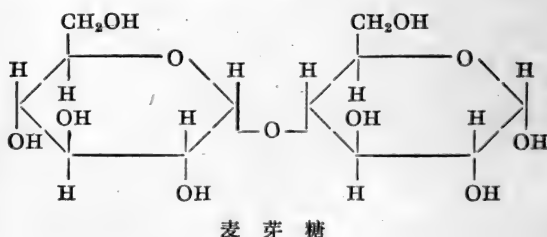
麦芽糖由 2 分子葡萄糖构成，大量存在于发芽的谷粒，特别是麦芽中。

麦芽糖可由麦芽糖酶催化水解为 2 分子葡萄糖。





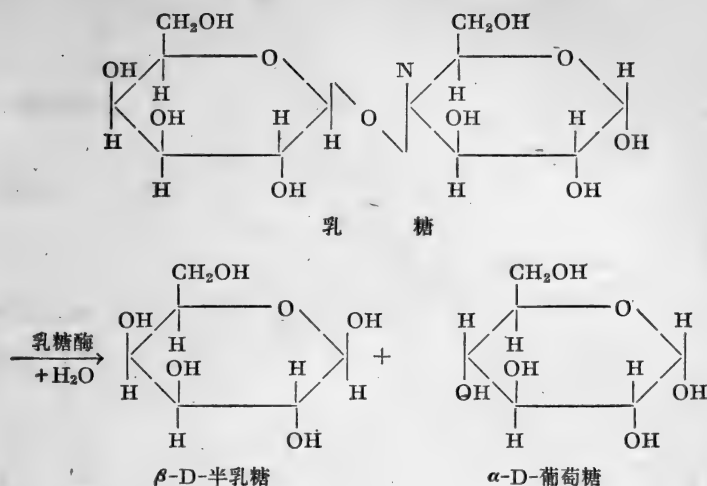
在某些微生物体内有麦芽糖磷酸化酶，可催化麦芽糖磷酸解反应，生成1-磷酸葡萄糖和葡萄糖。



三、乳糖的水解

乳糖是哺乳动物乳汁内主要的糖，由半乳糖和葡萄糖构成。

乳糖可由乳糖酶（又称为β-半乳糖苷酶）催化水解，生成半乳糖和葡萄糖。



第四节 葡萄糖的降解

在单糖中以葡萄糖为最重要，它是大多数异养微生物都能利用的碳源和能源。其它糖类的分解也同葡萄糖的代谢有密切关系。

葡萄糖的分解代谢途径较多，不同的微生物及在不同的条件下，它的分解代谢途径也有不同。本节介绍几种主要的降解途径。

一、葡萄糖的酵解

葡萄糖的酵解途径几乎是所有具有细胞结构的生物所共有的主要代谢途径。它最初是从研究酵母的酒精发酵而被阐明的，故称为糖酵解途径。通常又称为 Embden-Meyerhof-Parnas 代谢途径(简称 EMP 途径或 E-M 途径)。这条途径包括以葡萄糖经磷酸化生成 1,6-二磷酸果糖进而分解并逐步生成丙酮酸为主要特征的一系列生物化学过程。反应发生于细胞质中。

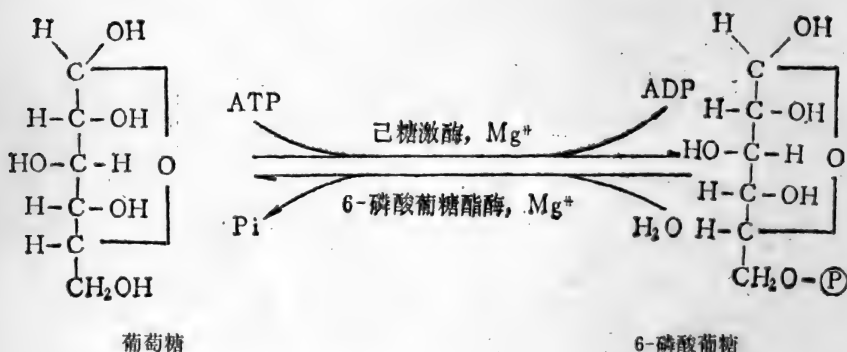
(一) EMP 途径的生物化学过程

EMP 途径包括 10 个连续的酶促反应 (图 6-2)。大致分为 1,6-二磷酸果糖的生成; 1,6-二磷酸果糖分解为两个磷酸丙糖及磷酸丙糖转化成丙酮酸等三个阶段。

第一阶段: 葡萄糖经磷酸化生成 1,6-二磷酸果糖。这个阶段的主要变化是磷酸化及异构化, 是糖的活化过程。

1. 葡萄糖的磷酸化

葡萄糖在己糖激酶的催化下, 由腺苷三磷酸(ATP)供给磷酸基, 转化成 6-磷酸葡萄糖, ATP 则变为腺苷二磷酸(ADP)。反应需 Mg^{++} 激活。

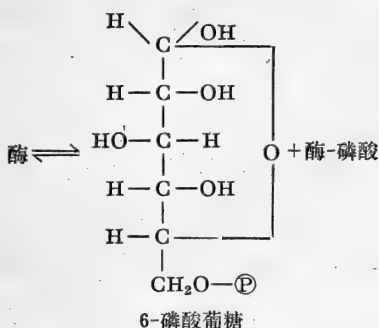
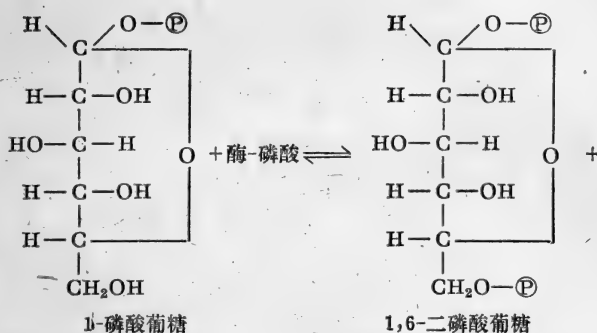


在此反应中可以看到, 贮存于 ATP 分子中的能量用于合成 6-磷酸葡萄糖, ATP 分子失去了一个高能磷酸键, 而葡萄糖取得了一个普通磷酸键, 所以是一个放能反应。在一般情况下此反应不可逆。6-磷酸葡萄糖酯酶在 Mg^{++} 参与下可催化其逆反应, 即 6-磷酸葡萄糖被水解为葡萄糖和无机磷酸。

此反应的意义在于使葡萄糖分子活化。此外, 葡萄糖分子能扩散透过细胞膜, 而 6-磷酸葡萄糖则不能透过细胞膜, 说明葡萄糖的磷酸化具有细胞防止糖类渗出的功能。

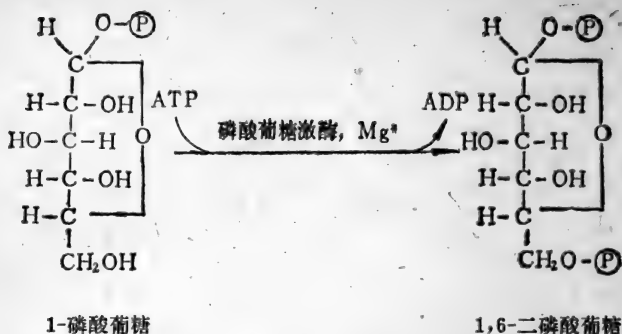
由糖原或双糖磷酸解所生成的, 以及其它来源的 1-磷酸葡

糖,在磷酸葡萄糖变位酶的催化下可转化成 6-磷酸葡萄糖,进入 EMP 途径。变位反应需 1,6-二磷酸葡萄糖参加。变位机制不是 1-磷酸葡萄糖分子内部的磷酸基转移,而是它与 1,6-二磷酸葡萄糖互换磷酸基。这种互换作用则是通过磷酸葡萄糖变位酶的磷酸化型和非磷酸化型的转变而进行的。



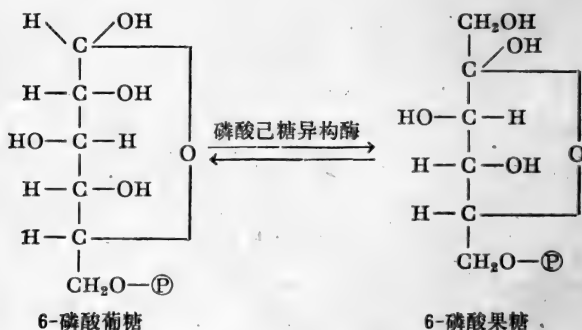
反应式中酶-磷酸及酶分别表示磷酸葡萄糖变位酶的磷酸化型和非磷酸化型。

作为启动反应的少量 1,6-二磷酸葡萄糖,由 1-磷酸葡萄糖在磷酸葡萄糖激酶催化和有 ATP 参与下,经磷酸化反应生成,一旦生成少量即可反复作用。

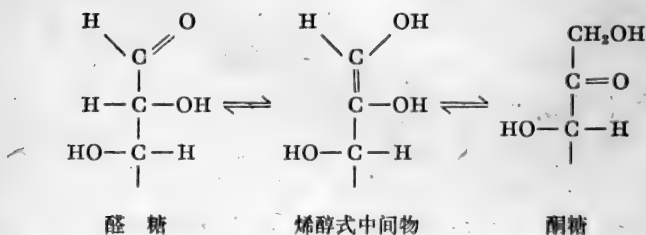


2. 6-磷酸葡萄糖和 6-磷酸果糖的互变

6-磷酸葡萄糖在磷酸己糖异构酶的催化下,发生同分异构变化,转变成 6-磷酸果糖。

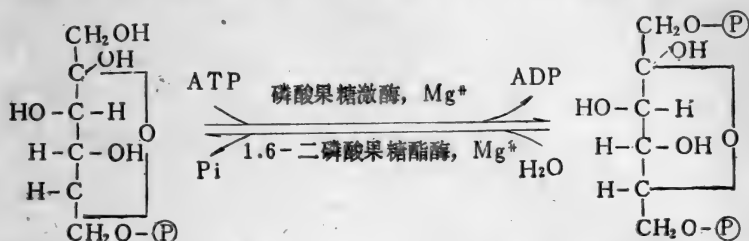


酶作用的机制可能是通过烯醇式中间产物使醛糖与酮糖相互转化,即:



3. 6-磷酸果糖的磷酸化

6-磷酸果糖在磷酸果糖激酶催化下，由ATP供给磷酸基及能量，进一步磷酸化为1,6-二磷酸果糖。反应需 Mg^{++} 激活。



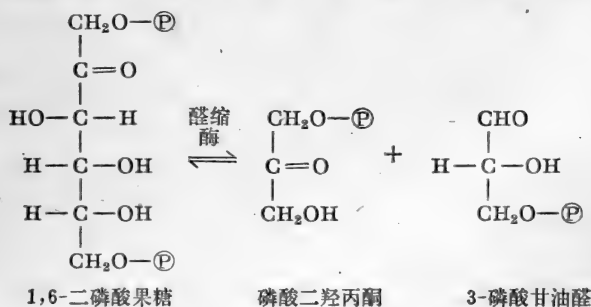
此反应与第一步反应相似，为不可逆反应。1,6-二磷酸果糖酯酶及 Mg^{++} 可催化其逆反应，结果水解生成6-磷酸果糖和无机磷酸。

值得指出的是，当ATP过量时会对6-磷酸果糖的磷酸化作用产生抑制作用，而ADP、AMP、Pi及1,6-二磷酸果糖可以解除抑制。

第二阶段：1,6-二磷酸果糖(二磷酸己糖)裂解成为2分子磷酸丙糖。

4. 1,6-二磷酸果糖的裂解

1分子1,6-二磷酸果糖在醛缩酶的催化下，使其第3碳与第4碳原子之间的键断开，分裂生成2分子磷酸丙糖。即上端的三个碳原子构成磷酸二羟丙酮，下端的三个碳原子构成3-磷酸甘油醛。

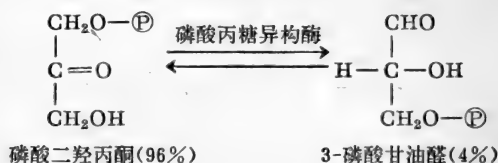


反应是可逆的，即磷酸二羟丙酮和 3-磷酸甘油醛可逆行缩合成为 1,6-二磷酸果糖。此缩合反应是由磷酸二羟丙酮分子上第三碳原子的醇基与 3-磷酸甘油醛分子上的第一碳原子的醛基进行醇醛缩合，所以催化此反应的酶称为醇醛缩合酶或醛缩酶。

这是酵解过程中的一个关键步骤，从这一步开始，己糖分子裂解为 2 个丙糖分子，葡萄糖的分解反应实质上是从这一步开始的。正由于它是从双磷酸己糖开始降解的，故酵解作用又称为双磷酸己糖途径(HDP 途径)。

5. 磷酸丙糖的互变

磷酸二羟丙酮与 3-磷酸甘油醛是同分异构体，两者在磷酸丙糖异构酶的催化下互相转变，反应平衡时趋向生成磷酸二羟丙酮(占 96%)。

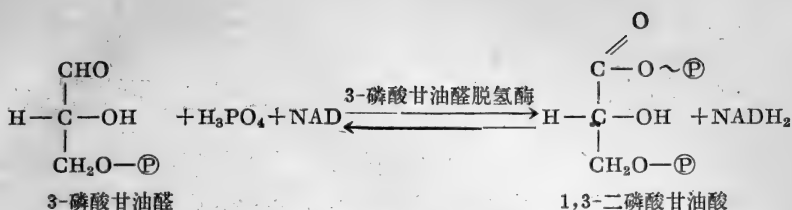


在酵解过程中，3-磷酸甘油醛参加下一步反应，不断被消耗，所以磷酸二羟丙酮也不断转变为 3-磷酸甘油醛。

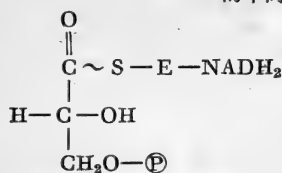
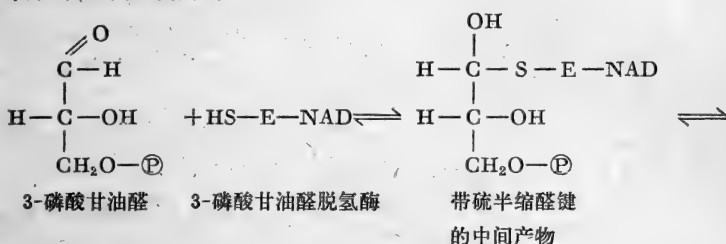
第三阶段：3-磷酸甘油醛经氧化(脱氢作用)并磷酸化生成 1,3-二磷酸甘油酸，然后将其高能磷酸键转移给 ADP，以产生 ATP。再经磷酸基变位和分子内重排后又可给出一个高能磷酸键，而后变成丙酮酸。这个阶段的反应特点是形成高能磷酸键。

6. 3-磷酸甘油醛的氧化

这是酵解过程中的又一个关键性步骤。生物体通过这步氧化反应而获得能量。反应包括醛基的氧化及磷酸解作用，氧化反应释放的能量贮存于高能磷酸键中。

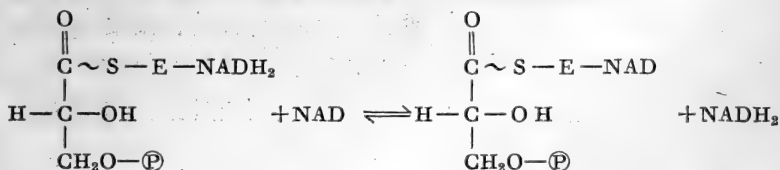


催化这步反应的酶是 3-磷酸甘油醛脱氢酶，此酶的活性基团为-SH，所以此酶活性可被碘乙酸抑制。NAD 为该酶的辅酶。酶催化反应的机制如下：

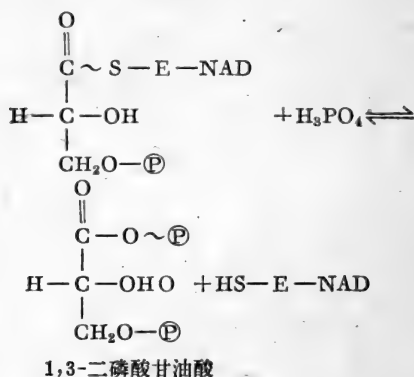


带高能硫酯键的中间产物

3-磷酸甘油醛首先与 3-磷酸甘油醛脱氢酶相结合，形成一个活泼的带有硫半缩醛键的中间产物，然后脱氢，脱氢过程中释放的能量集中在第一碳原子上，形成高能硫酯键，脱下的氢用来还原 NAD 而形成 NADH₂。3-磷酸甘油醛脱氢酶与大多数以 NAD 为辅酶的脱氢酶不同，酶蛋白与其辅酶 NAD 的结合比较牢固，故 NADH₂ 一般不与酶蛋白脱离，而将其氢转交给另一个 NAD。

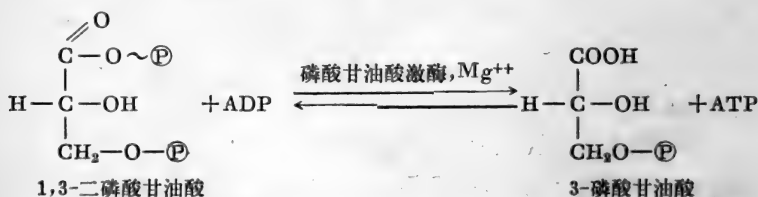


最后起磷酸解作用，生成含有一个高能磷酸键的 1,3-二磷酸甘油酸。



7. 3-磷酸甘油酸的生成

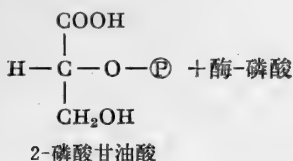
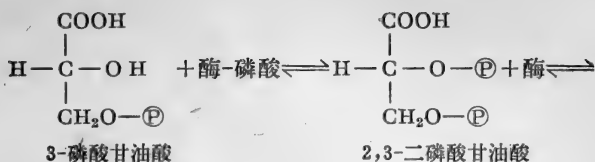
1,3-二磷酸甘油酸在磷酸甘油酸激酶的催化下，将其高能磷酸键转移给 ADP，产生 ATP。其本身转变为 3-磷酸甘油酸。反应可逆，需 Mg^{++} 激活。



由酵解的第一、二阶段反应可知，每 1 个葡萄糖分子可生成 2 分子磷酸丙糖，通过 6、7 两步反应可生成 2 分子 ATP，故酵解第一阶段中消耗的 2 分子 ATP 在此已得到补偿。

8. 3-磷酸甘油酸与 2-磷酸甘油酸的互变

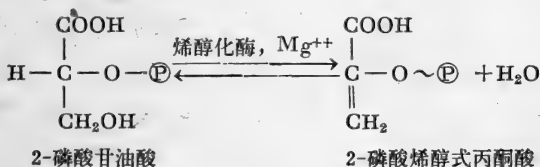
这一反应由磷酸甘油酸变位酶催化，变位机制与磷酸葡糖变位酶相似，即 3-磷酸甘油酸与 2,3-二磷酸甘油酸 互换磷酸基，互换作用则由磷酸甘油酸变位酶的磷酸化型和非磷酸化型的互变而进行。



反应式中酶-磷酸与酶分别表示磷酸甘油酸变位酶的磷酸化型和非磷酸化型。

9. 2-磷酸烯醇式丙酮酸的生成

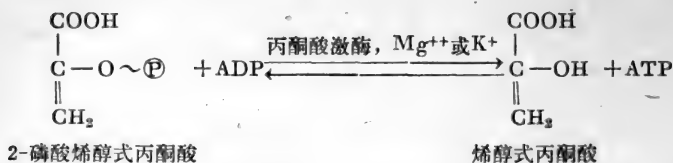
2-磷酸甘油酸在烯醇化酶的催化下失去1分子水，生成2-磷酸烯醇式丙酮酸，反应需 Mg^{++} 作激活剂。在脱水过程中分子内部能量重新分布，使一部分能量集中在磷酸键上，从而形成一个高能磷酸键。



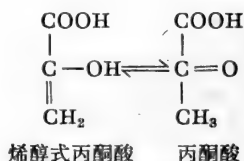
氟化钠是烯醇化酶的抑制剂，因为氟离子在磷酸盐存在下与 Mg^{++} 形成氟磷酸镁复盐，从而抑制酶活性。

10. 丙酮酸的生成

2-磷酸烯醇式丙酮酸由丙酮酸激酶催化，将高能磷酸键转移给ADP，生成ATP，其本身则转化成烯醇式丙酮酸。 Mg^{++} 或 K^+ 对反应有激活作用， Ca^{++} 及 Na^+ 对反应有抑制作用。反应为可逆，平衡偏向生成ATP一方。

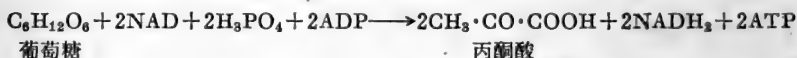


烯醇式丙酮酸极不稳定，不需酶的催化，即可转变为比较稳定的(酮式)丙酮酸。



EMP 途径的生物化学过程可归结为图 6-2。

综合上述反应，则葡萄糖经 EMP 途径降解成丙酮酸的总反应式为(未计水分子出入)：



从总反应式可以看出，1 分子葡萄糖生成了 2 分子丙酮酸及 2 分子 ATP，并使 2 分子 NAD 还原成 NADH₂，但反应中生成的 NADH₂ 不能积存，必须脱氢重新氧化成 NAD 后，才能继续不断地推动全部反应。NADH₂ 的氢在无氧条件下可以交给其它有机物；在有氧条件下，则可经呼吸链最终交给分子氧。

由 EMP 途径生成的丙酮酸，在代谢过程中具有重要作用。通常还将继续降解，降解的途径则随不同情况而异。在无氧的条件下，可继续降解生成各种不同的代谢产物；在有氧的条件下，则进入三羧酸循环，被彻底氧化成二氧化碳和水。

因此，葡萄糖转化成丙酮酸的 EMP 途径可以在有氧或无氧条件下进行，而丙酮酸的进一步降解，则因有氧或无氧条件而有不同的途径。

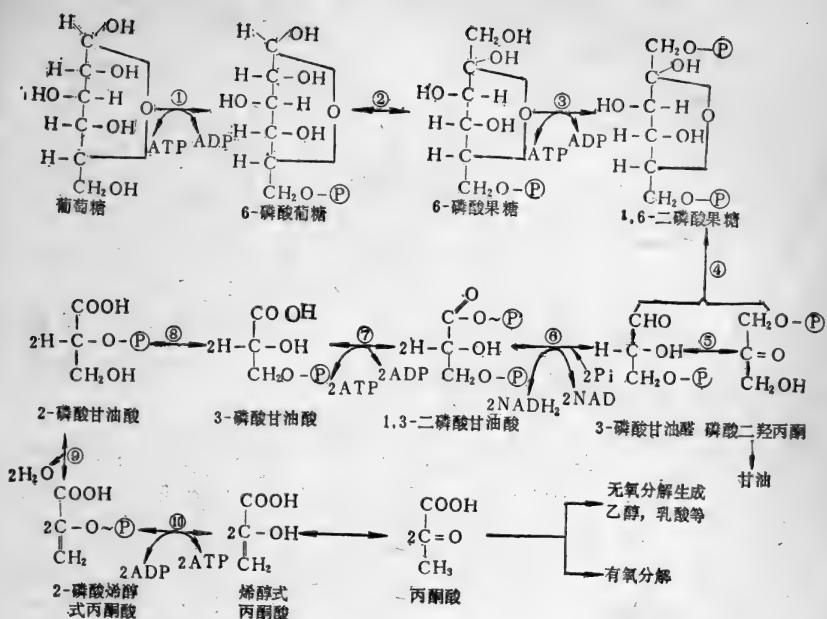


图 6-2 EMP 途径图解

- ① 己糖激酶 ② 磷酸己糖异构酶 ③ 磷酸果糖激酶 ④ 醛缩酶
 ⑤ 磷酸丙糖异构酶 ⑥ 3-磷酸甘油醛脱氢酶 ⑦ 磷酸甘油酸激酶
 ⑧ 磷酸甘油酸变位酶 ⑨ 烯醇化酶 ⑩ 丙酮酸激酶

(二) 丙酮酸的无氧降解

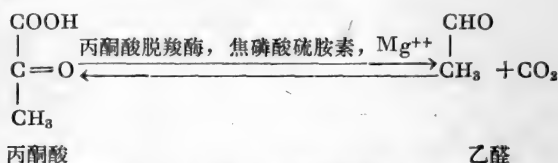
葡萄糖经 EMP 途径生成丙酮酸后，在无氧条件下继续降解，通常仍归于葡萄糖酵解的范畴，降解过程则因不同的微生物或不同的条件而异。同时，EMP 途径中所产生的 NADH_2 ，在此过程中将氢转交给合适的有机物，遂形成各种不同的代谢产物。根据其主要产物的不同，分别有酒精发酵、甘油发酵、乳酸发酵、丁酸型发酵等。

1. 酒精发酵

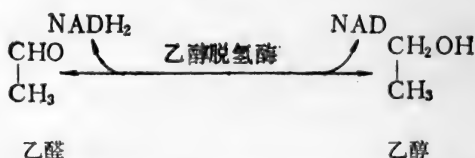
酵母菌在无氧条件下将葡萄糖分解产生丙酮酸，丙酮酸继续

降解产生乙醇，其反应历程如下：

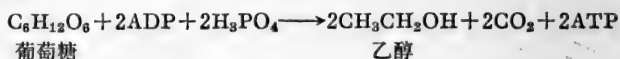
(1) 丙酮酸的脱羧 丙酮酸在丙酮酸脱羧酶和羧化辅酶（焦磷酸硫胺素）的催化下脱去羧基，生成乙醛和二氧化碳。反应需 Mg^{++} 激活。



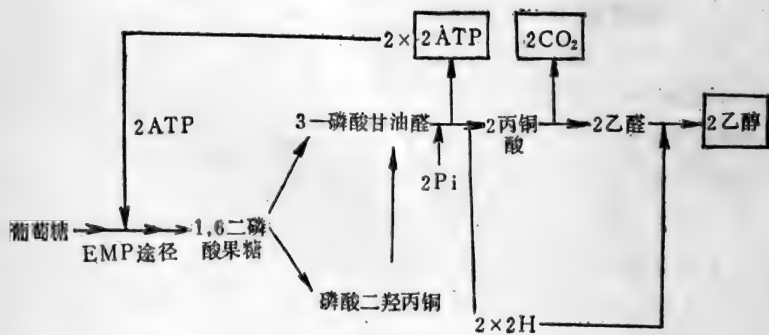
(2) 乙醛的还原 乙醛在乙醇脱氢酶及其辅酶（NAD）的催化下，还原生成乙醇。还原所需要的氢由 3-磷酸甘油醛脱氢时供给。



由葡萄糖经酒精发酵产生乙醇的总反应式为（未计 ADP 磷酸化的水分子出入）：



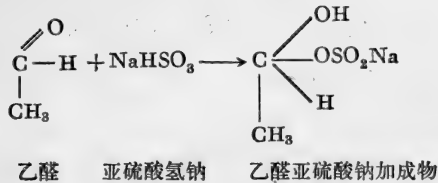
其图解如下：



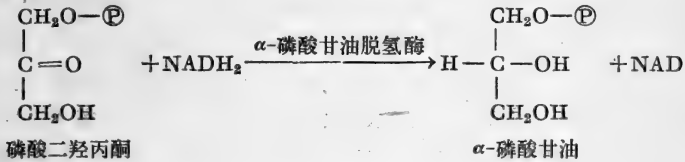
2. 酒精酵母的甘油发酵

酵母菌在特定的条件下，可以进行甘油发酵，酵母菌的甘油发酵有下列两种方法：

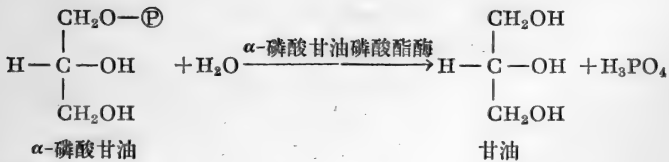
(1) 亚硫酸盐法甘油发酵 酵母在酒精发酵时，如加入亚硫酸氢钠，它能与乙醛起加成作用，生成难溶的结晶状亚硫酸钠加成物。



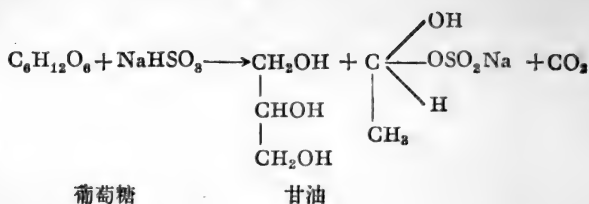
这样就使乙醛不能作为受氢体，而迫使磷酸二羟丙酮代替它作为受氢体，在 α -磷酸甘油脱氢酶(NAD为其辅酶)催化下生成 α -磷酸甘油。



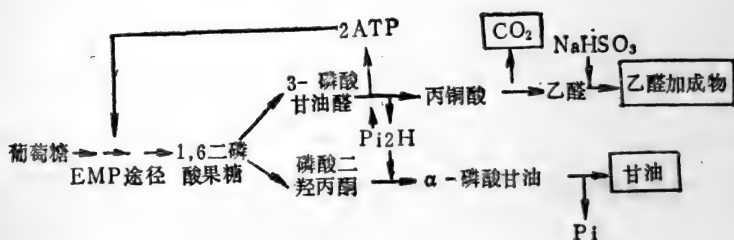
α -磷酸甘油在 α -磷酸甘油磷酸酯酶的催化下水解。生成甘油。



自葡萄糖开始的总反应式为：

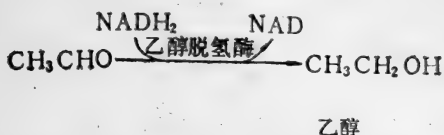
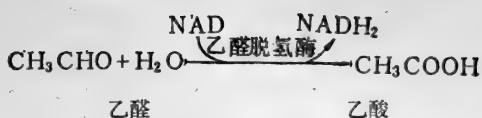


其图解如下：



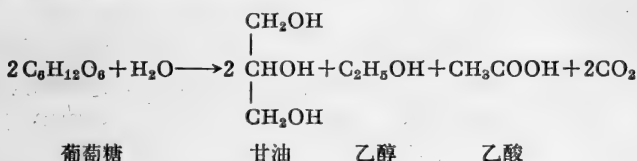
由总反应式可以看出，用亚硫酸盐发酵生产甘油时，1分子葡萄糖只产生1分子甘油，同时，并不产生ATP。这是因为1,6-二磷酸果糖生成2分子磷酸丙糖，其中1分子（磷酸二羟丙酮）生成了甘油，只有1分子（3-磷酸甘油醛）脱氢生成了1分子丙酮酸，所以只产生2分子ATP，而EMP途径的1、3两步反应需用去2分子ATP，故ATP无积余。可见在甘油发酵过程中亚硫酸盐不能加得太多，否则会使酵母因得不到能量而停止发酵。即必须留有一部分酒精发酵，以使获得一些能量，供生命活动所需。这样，实际上1分子葡萄糖还得不到1分子甘油。在生产上可采用回收酵母发酵，以增加甘油产率。

(2) 碱法甘油发酵 若将上述酵母酒精发酵的发酵液保持碱性(pH 7.6)，则发酵产生的乙醛不能作为正常的受氢体，而是2分子乙醛之间起歧化反应，相互氧化还原，生成等量的乙醇和乙酸。

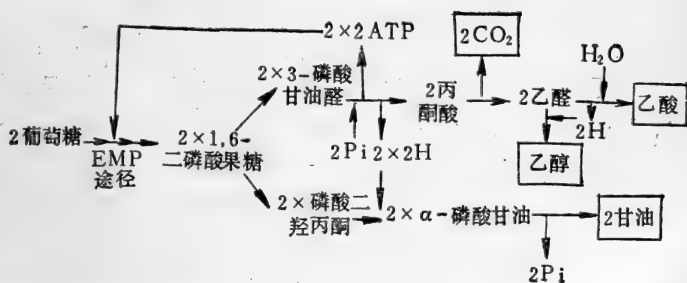


此时，由3-磷酸甘油醛脱氢生成的 NADH₂ 用来还原磷酸二羟丙酮，并进而生成甘油。

自葡萄糖开始的总反应式为：



其图解如下：



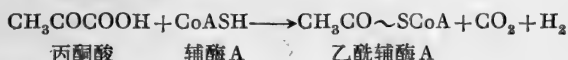
由总反应式可以看出，碱法甘油发酵的产品有三个，即甘油、乙酸、乙醇。同时，也不产生 ATP，所以此法只能在酵母的非生长情况下进行发酵。

3. 乳酸菌的乳酸发酵

丁酸型发酵的生化过程比较复杂，有些细节尚不清楚。现将其各种主副产物的来源概述如下：

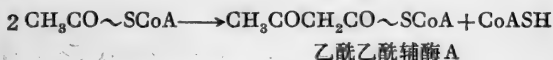
(1) 梭状芽孢杆菌在无氧条件下，将葡萄糖经 EMP 途径降解为丙酮酸。

(2) 丙酮酸在丙酮酸脱羧酶、焦磷酸硫胺素、硫辛酸、辅酶 A 的催化下，生成乙酰辅酶 A、二氧化碳和氢气。

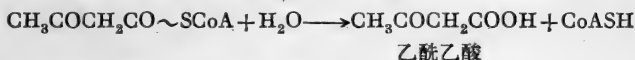


(3) 丙酮与异丙醇的形成

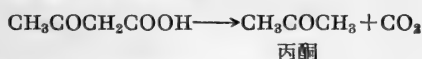
① 2 分子乙酰辅酶 A 在乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶催化下生成乙酰乙酰辅酶 A



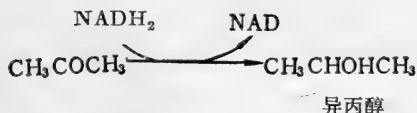
② 乙酰乙酰辅酶 A 水解为乙酰乙酸



③ 乙酰乙酸脱羧生成丙酮

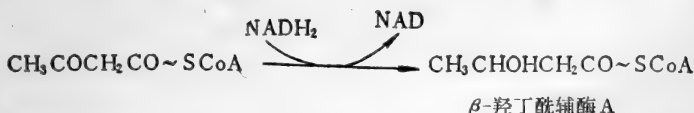


④ 丙酮还原生成异丙醇

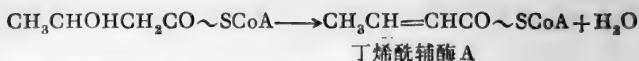


(4) 丁酸及丁醇的生成

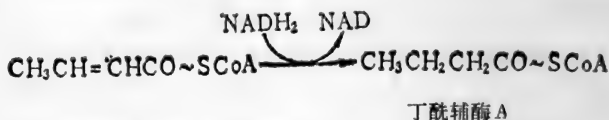
① 乙酰乙酰辅酶 A 还原生成 β-羟丁酰辅酶 A



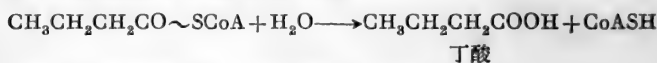
② β-羟丁酰辅酶 A 脱水生成丁烯酰辅酶 A



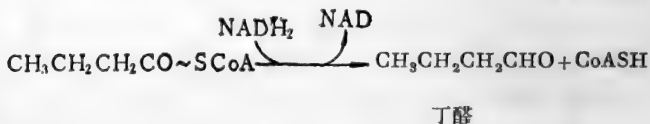
③ 丁烯酰辅酶 A 还原生成丁酰辅酶 A



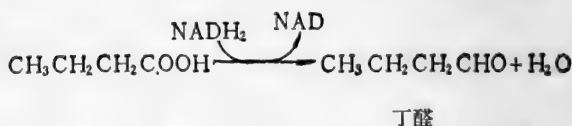
④ 丁酰辅酶 A 水解生成丁酸



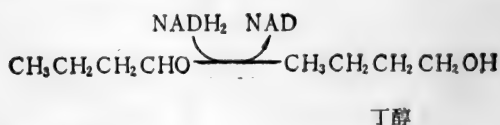
⑤ 丁酰辅酶 A 或丁酸还原成丁醛



或

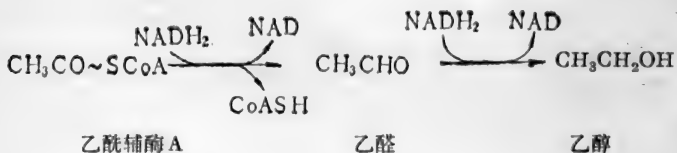


⑥ 丁醛还原生成丁醇



(5) 乙醇的生成

乙醇来自乙酰辅酶 A 的还原。



(6) 乙酸的生成

① 乙酰辅酶 A 在磷酸乙酰转移酶催化下，发生磷酸解作用，生成乙酰磷酸。

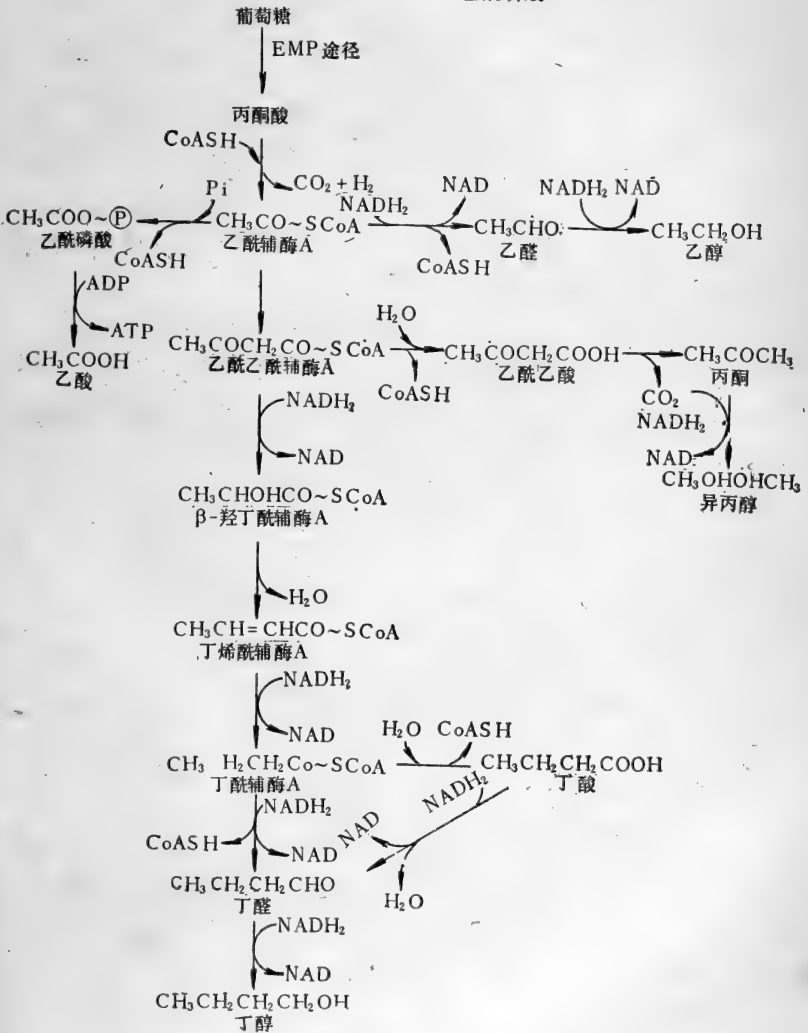
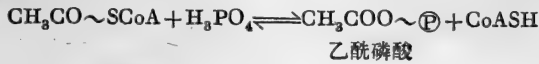
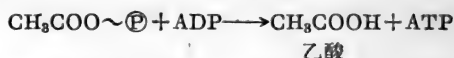


图 6-3 丁酸型发酵图解

② 乙酰磷酸在乙酸激酶催化下，将磷酸基转移给 ADP，生成乙酸和 ATP。



丁酸型发酵途径可归结为图 6-3。

(三) 葡萄糖酵解的能量问题

在无氧条件下进行的 EMP 途径，因最终产物的不同，所释放的能量及形成的 ATP 数各不相同。以酒精发酵和乳酸发酵为例，每 1 分子葡萄糖通过底物磷酸化（图 6-2 的反应 7、10）产生 4 分子 ATP，但在葡萄糖磷酸化过程（反应 1、3）中消耗 2 分子 ATP，净得 2 分子 ATP。

酒精发酵时，总反应释放的自由能为 56 千卡。



发酵过程中产生 2 分子 ATP，其贮存的能量可供生命活动之用。

$$\text{故能量利用率} = \frac{2 \times 8}{56} \times 100\% = 28.6\%$$

乳酸发酵时，总反应释放的自由能为 47 千卡。

发酵过程中也形成 2 分子 ATP，

$$\text{其能量利用率} = \frac{2 \times 8}{47} \times 100\% = 34.0\%$$

二、丙酮酸的有氧降解

葡萄糖经 EMP 途径生成的丙酮酸，在无氧条件下可以生成各种发酵产物，已如前述。在有氧条件下，EMP 途径中所产生的 NADH_2 可经过呼吸链再氧化成 NAD ，在这种情况下，不需要丙酮酸或其转化产物作为受氢体，丙酮酸则进入三羧酸循环，彻底氧化成二氧化碳和水，并释放出大量能量。丙酮酸的有氧分解在细胞线粒体上进行，在原核细胞中则于细胞质内膜上进行。

丙酮酸的有氧分解可分为两个阶段，首先是丙酮酸经氧化脱羧作用形成乙酰辅酶 A，然后是乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环被彻底氧化。

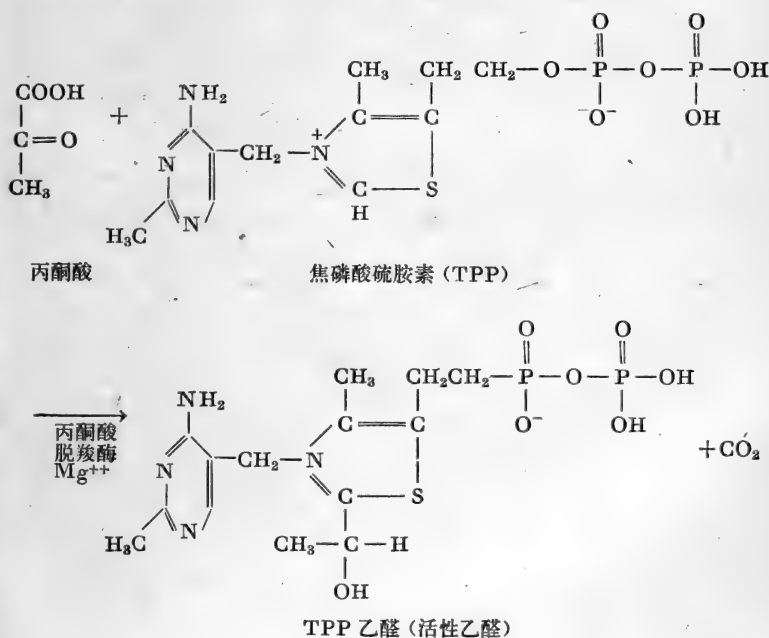
(一) 丙酮酸的氧化脱羧——乙酰辅酶 A 的生成

丙酮酸在进入三羧酸循环之前，先被氧化脱羧生成乙酰辅酶 A。此反应由丙酮酸氧化脱羧酶系催化。该酶系由丙酮酸脱羧酶、硫辛酸还原酶、乙酰转移酶、二硫辛酸脱氢酶及相应的辅酶

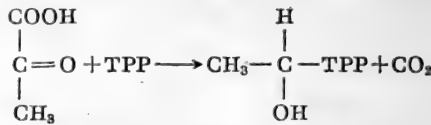
焦磷酸硫胺素(TPP)、6,8-二硫辛酸 $\left(\begin{array}{c} \text{S} \\ | \\ \text{L} \\ | \\ \text{S} \end{array}\right)$ 、辅酶 A(CoASH)、

FAD、NAD 及 Mg^{++} 等组成。其反应机制如下：

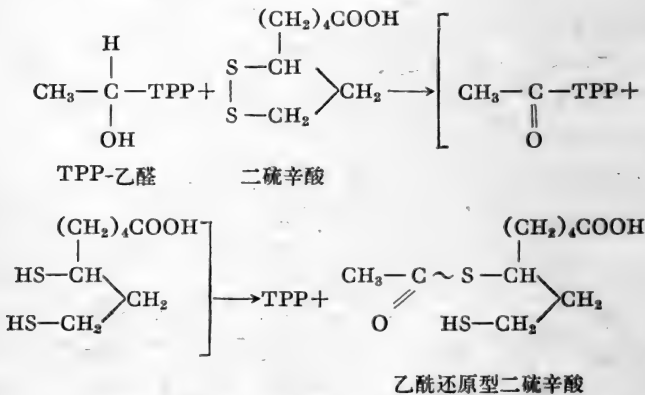
(1) 丙酮酸由丙酮酸脱羧酶催化，结合于该酶的辅酶——焦磷酸硫胺素(TPP)的硫胺素部分中的噻唑基上，形成 TPP-乙醛加成物(或称活性乙醛)；同时脱羧，生成 CO_2 。



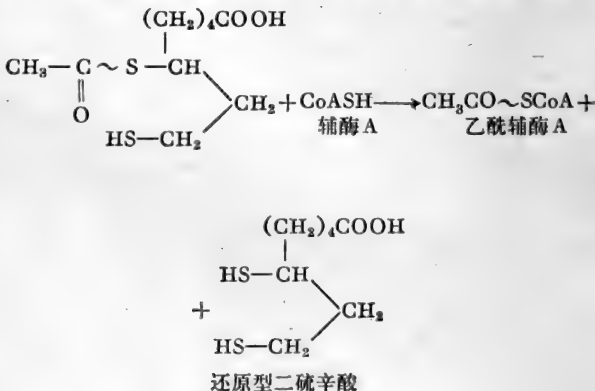
简写上式



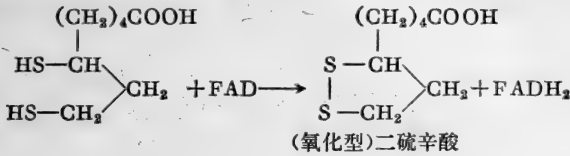
(2) TPP-乙醛被硫辛酸还原酶(辅酶为6,8-二硫辛酸)催化,生成乙酰还原型二硫辛酸和TPP,其反应过程包括TPP-乙醛的氧化及乙酰基转移到硫辛酸上。



(3) 乙酰还原型二硫辛酸被乙酰转移酶催化,将乙酰基转移给辅酶A,生成乙酰辅酶A,其本身则变成还原型二硫辛酸。



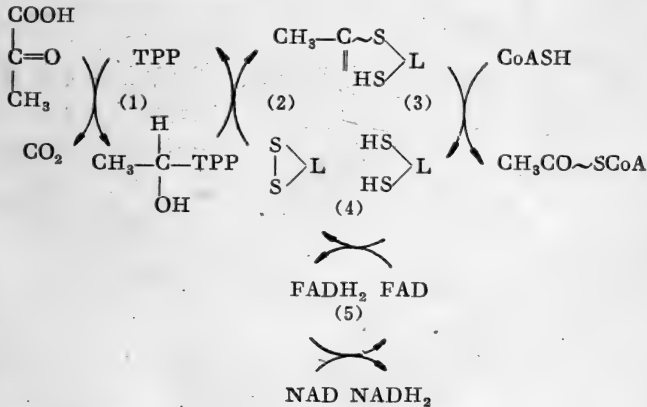
(4) 还原型二硫辛酸在二硫辛酸脱氢酶(此酶为一黄素蛋白, 辅基为 FAD)催化下, 脱氢后又恢复为氧化型二硫辛酸, 重新参与前述反应, 脱下的氢由 FAD 接受。



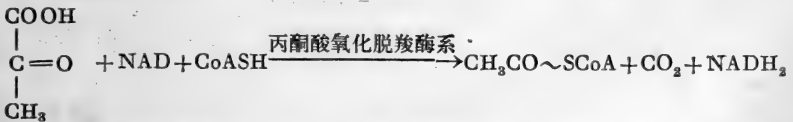
(5) 还原型黄素蛋白由 NAD 重新氧化。



反应过程可图示如下:



总反应式为



丙酮酸氧化脱羧过程中所释放的能量形成乙酰辅酶 A 中的高能硫酯键。乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环。

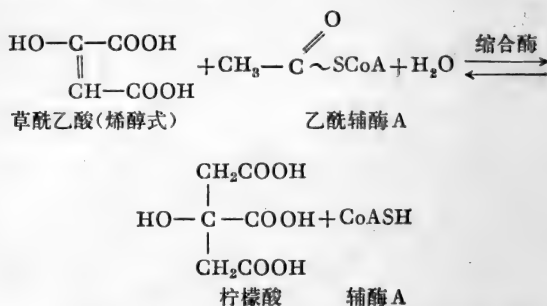
(二) 乙酰辅酶 A 的彻底氧化——三羧酸循环

三羧酸循环(TCA 环)又称 Krebs 循环 或 称柠檬酸循环。整

个过程由十步反应组成。

1. 柠檬酸的生成

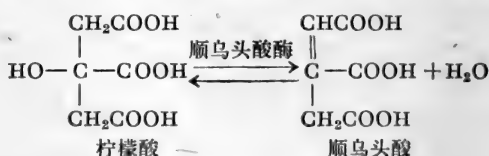
乙酰辅酶 A 与草酰乙酸及 1 分子水在缩合酶（又名柠檬酸合成酶）的催化下，生成柠檬酸。



缩合反应所需的能量由乙酰辅酶 A 的高能硫酯键水解供应，正反应为强烈的放能反应，所以反应主要向柠檬酸合成方向进行。在某些生物体内存在柠檬酸分解酶，可专一催化其逆反应。

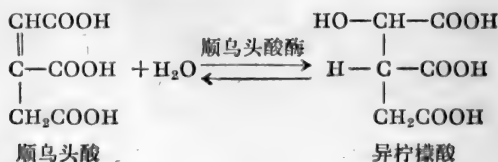
2. 柠檬酸脱水成顺乌头酸

此反应由顺乌头酸酶（又称顺乌头酸水化酶）催化，当有 Fe^{++} 和半胱氨酸或还原型谷胱甘肽存在时，此酶表现最大活性。



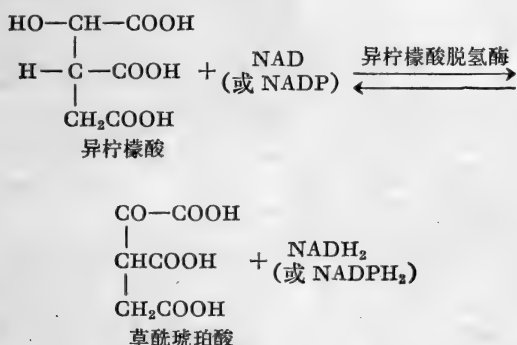
3. 顺乌头酸加水成为异柠檬酸

此反应也为顺乌头酸酶催化。



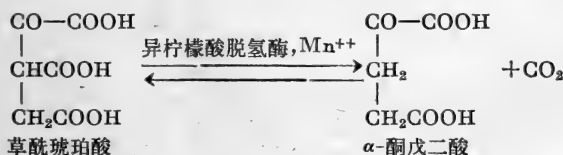
4. 异柠檬酸脱氢生成草酰琥珀酸

此反应在异柠檬酸脱氢酶催化下进行。异柠檬酸脱氢酶在微生物中已发现有两种，一种需 NAD 为辅酶；另一种需 NADP 为辅酶。



5. 草酰琥珀酸脱羧生成 α -酮戊二酸

此反应也为异柠檬酸脱氢酶所催化。现在认为这种酶具有两种催化能力，即脱氢和脱羧。脱羧反应需要 Mn^{++} 。因此草酰琥珀酸可以看作是异柠檬酸脱氢、脱羧生成 α -酮戊二酸的中间产物。

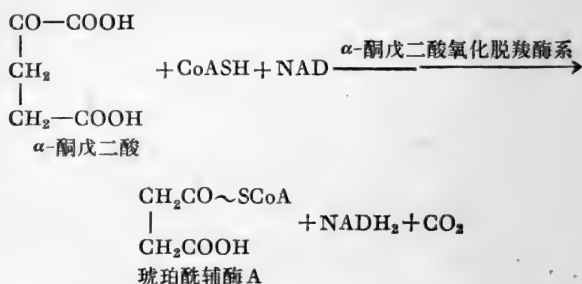


这个反应是一个分界点，在此反应以前都是三羧酸的转化，以后则是二羧酸的变化了。

6. α -酮戊二酸的氧化脱羧

α -酮戊二酸氧化脱羧后生成琥珀酰辅酶 A。其反应机制与丙酮酸的氧化脱羧相似，催化此反应的是 α -酮戊二酸氧化脱羧

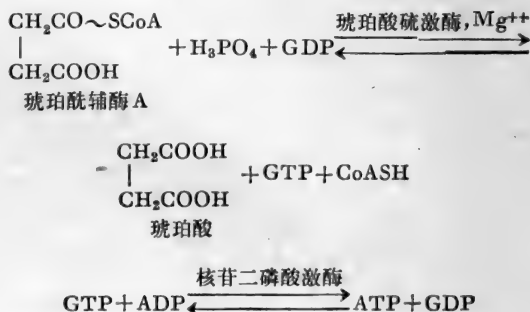
酶系,同样需要焦磷酸硫胺素(TPP)、6,8-二硫辛酸 $\left(\begin{array}{c} S \\ | \\ S \end{array}\right) L$ 、辅酶A、FAD、NAD参加。 α -酮戊二酸氧化脱羧反应是不可逆的。其综合反应为:



脱氢反应中释放的能量贮存于琥珀酰辅酶A的高能硫酯键中。

7. 琥珀酰辅酶A生成琥珀酸

琥珀酰辅酶A在琥珀酸硫激酶(或称琥珀酰辅酶A合成酶)催化下,与鸟苷二磷酸(GDP)及无机磷酸作用,释出辅酶A,同时将高能硫酯键的能量连同无机磷酸转移到GDP,产生琥珀酸和鸟苷三磷酸(GTP)。GTP在核苷二磷酸激酶作用下,将高能磷酸键转移给ADP,产生ATP。

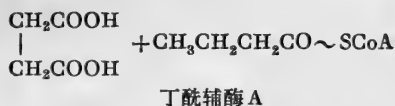
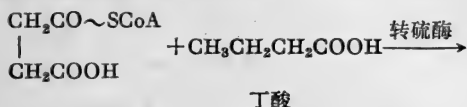


在某些微生物中,琥珀酰辅酶A转变成琥珀酸还有其它方

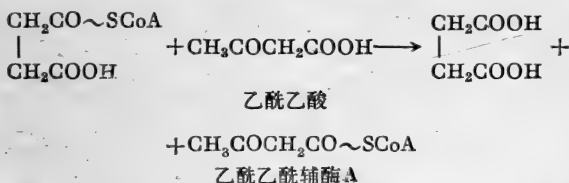
式，如：

(1) 由转硫酶催化，琥珀酰辅酶 A 与丁酸(或戊酸，或己酸)反应，生成琥珀酸及丁酰辅酶 A (或戊酰辅酶 A，或己酰辅酶 A)。

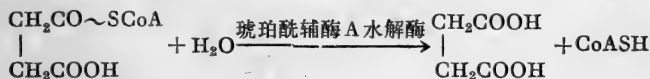
以与丁酸反应为例，反应式为：



(2) 琥珀酰辅酶 A 与乙酰乙酸反应，生成琥珀酸和乙酰乙酰辅酶 A，反应由琥珀酰辅酶 A-乙酰乙酸辅酶 A 转移酶催化。

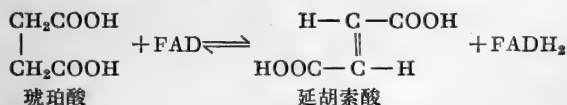


(3) 琥珀酰辅酶 A 被琥珀酰辅酶 A 水解酶催化水解，生成琥珀酸和辅酶 A，此时不生成 ATP。



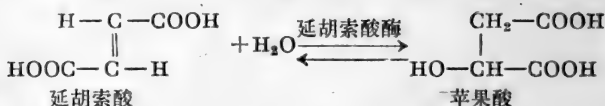
8. 琥珀酸脱氢生成延胡索酸

此反应由琥珀酸脱氢酶催化，该酶为一黄素蛋白，以 FAD 为辅基。



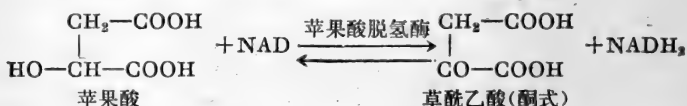
9. 延胡索酸加水生成苹果酸

此反应由延胡索酸酶催化。

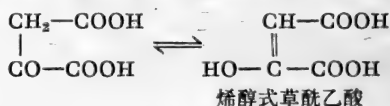


10. 苹果酸脱氢生成草酰乙酸

此反应由苹果酸脱氢酶(NAD 为辅酶)催化。



草酰乙酸(酮式)可自动转变为烯醇式草酰乙酸。



生成的草酰乙酸又可参加第一步反应, 与乙酰辅酶 A 缩合成柠檬酸, 而形成一个循环。

三羧酸循环的各步反应如图 6-4 所示。

丙酮酸从氧化脱羧开始, 以乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环, 最终被彻底氧化。丙酮酸的三个碳原子被氧化脱羧成了分子 CO_2 (丙酮酸氧化脱羧反应及三羧酸循环中反应⑤和⑥)。在丙酮酸氧化脱羧反应及三羧酸循环中反应④、⑥、⑧、⑩各脱下一对氢原子, 交给 $\text{NAD}(\text{NADP})$ 及 FAD (黄酶), 又经呼吸链交给氧, 总共可生成 5 分子水。加上三羧酸循环反应②放出 1 分子水, 总共产生 6 分子水。但三羧酸循环反应①、③、⑦、⑨共用去 4 分子水, 所以积余 2 分子水。

丙酮酸有氧分解中释放的 5 对氢原子中, 有 4 对氢转移给 $\text{NAD}(\text{NADP})$, 经呼吸链最终传递给分子氧过程中, 进行电子传递磷酸化, 可产生 12 分子 ATP。另 1 对氢(反应⑧)转移给 FAD (黄酶), 经电子传递磷酸化, 产生 2 分子 ATP。另外在反应⑦中

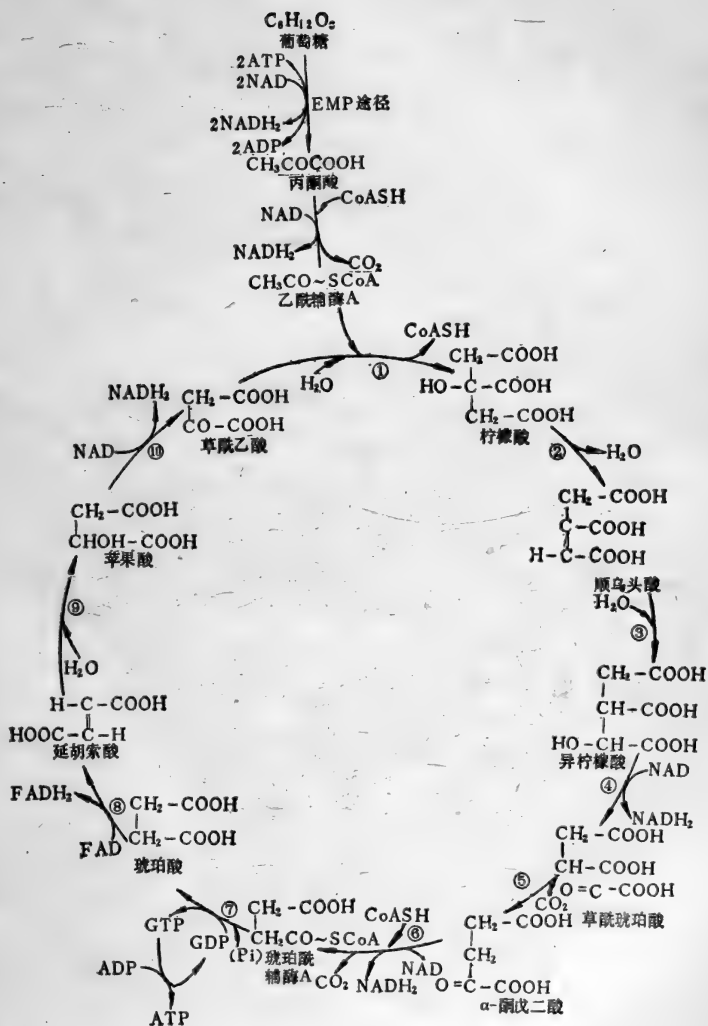
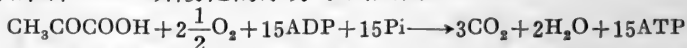
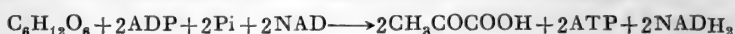


图 6-4 三羧酸循环(未标出逆反应)

通过底物磷酸化作用也产生 1 分子 ATP, 因此每分子丙酮酸彻底氧化时可获得 15 分子 ATP。则丙酮酸的有氧分解的总反应式可写成(未计 ADP 磷酸化的水分子出入):



如果葡萄糖在有氧条件下经 EMP 途径和三羧酸循环进行分解时, 1 分子葡萄糖在 EMP 途径中生成 2 分子丙酮酸, 即,



在 EMP 途径中产生的 2 分子 NADH_2 也经呼吸链氧化, 产生 2 分子水和 6 分子 ATP。

则其总反应式为(未计 ADP 磷酸化水分子出入):



由上式可见, 每分子葡萄糖经 EMP 途径与三羧酸循环彻底

表 6-3 1 克分子葡萄糖在有氧分解时所产生的 ATP 克分子数

反应阶段	反 应	ATP 的消耗与合成			
		消耗	合 成		净 得
			底物磷酸化	电子传递磷酸化	
EMP 途径	葡萄糖 → 6-磷酸葡萄糖	1			-1
	6-磷酸果糖 → 1,6-二磷酸果糖	1			-1
	3-磷酸甘油醛 → 1,3-二磷酸甘油酸			$2^* \times 3$	6
	1,3-二磷酸甘油酸 → 3-磷酸甘油酸		2×1		2
	2-磷酸烯醇式丙酮酸 → 烯醇式丙酮酸		2×1		2
丙酮酸氧化脱羧	丙酮酸 → 乙酰辅酶 A			2×3	6
三羧酸循环	异柠檬酸 → 草酰琥珀酸			2×3	6
	α -酮戊二酸 → 琥珀酰辅酶 A			2×3	6
	琥珀酰辅酶 A → 琥珀酸		2×1		2
	琥珀酸 → 延胡索酸			2×2	4
	苹果酸 → 草酰乙酸			2×3	6
总 计					38

* 在 EMP 途径中 1 分子葡萄糖裂解为 2 分子磷酸丙糖, 故由此以下反应产生的 ATP 克分子数均乘以 2。

氧化时，总共可产生 38 分子 ATP(表 6-3)。

据实验或计算可知 1 克分子葡萄糖完全氧化为二氧化碳和水时，共放出 686 千卡自由能。

则葡萄糖经 EMP 途径和 TGA 环进行有氧分解时，

$$\text{能量利用率} = \frac{38 \times 8}{686} \times 100\% = 44.3\%$$

可见糖在有氧分解中所释放的可供生物体利用的能量，大大超过了糖在无氧分解(酵解)中产生的能量。所生成的大量 ATP，是生物体生命活动的主要能量来源。

三羧酸循环在提供生物体所需的能量上是十分重要的。在物质上它提供的一系列中间产物也是生物体必不可少的。它提供了合成其它生物物质的原料。例如反应中放出的二氧化碳可参与嘌呤和嘧啶的合成；乙酰辅酶 A 是脂肪酸和脂肪合成的起始物质。三羧酸循环的中间产物，如 α -酮戊二酸可转化为谷氨酸，草酰乙酸可转化为天冬氨酸，这两种氨基酸都是合成蛋白质的原料，也可转化成其它氨基酸。反之，核酸、脂肪、蛋白质的分解代谢，最终也都可以进入三羧酸循环而被彻底氧化。由此可见，三羧酸循环是联系各类物质代谢的枢纽。

三羧酸循环的中间产物或由它作为原料进一步形成的产物，也给发酵生产提供了来源，如柠檬酸发酵、谷氨酸发酵等。

(三) 丙酮酸羧化支路

三羧酸循环中的十种中间产物，在每一次循环中并不消耗，而只是乙酰辅酶 A 被彻底氧化。因此，三羧酸循环倘若仅仅是为了执行氧化乙酰辅酶 A 的功能，那么这些中间产物只需要供催化作用的量就够了。然而，如上所述，这些中间产物随时都有移作他用(即为合成其它物质之用或作为发酵产物排出细胞外)的可能，所以就必须予以补充，以使循环能正常进行。

中间产物的补充，固然可以由其它物质，如谷氨酸、天冬氨酸而来(通过转氨作用生成相应的 α -酮戊二酸、草酰乙酸)，但

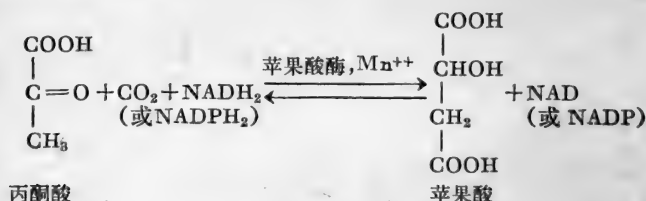
是根本的补充方式显然是要以糖质原料分解过程的中间产物作为来源。

丙酮酸羧化支路对于三羧酸循环中间产物的补充具有重要意义，丙酮酸可由糖酵解代谢供给。

丙酮酸羧化支路，即丙酮酸或磷酸烯醇式丙酮酸固定二氧化碳生成四碳二羧酸（苹果酸、草酰乙酸）的反应，又称二氧化碳固定反应。现在发现催化该反应的酶已不止一种，重要的有苹果酸酶、磷酸丙酮酸羧化酶（或称草酰乙酸激酶、磷酸烯醇式丙酮酸激酶）和丙酮酸羧化酶。

1. 丙酮酸的还原羧化作用

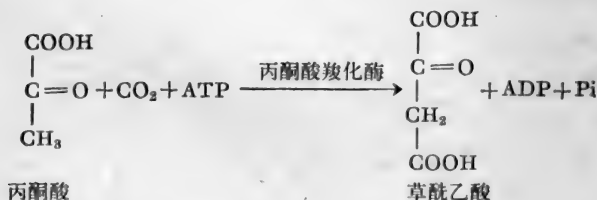
丙酮酸由苹果酸酶催化，NAD 或 NADP 为辅酶， Mn^{++} 为激活剂，还原并羧化生成苹果酸。



苹果酸可继续由苹果酸脱氢酶催化生成草酰乙酸。

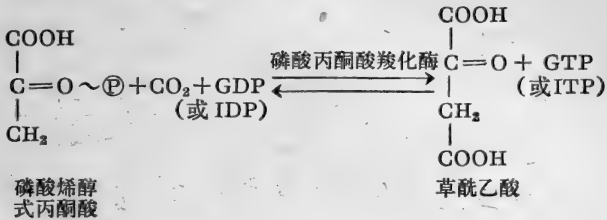
2. 丙酮酸羧化生成草酰乙酸

反应由丙酮酸羧化酶（生物素为其辅酶）催化，需 ATP 参加。

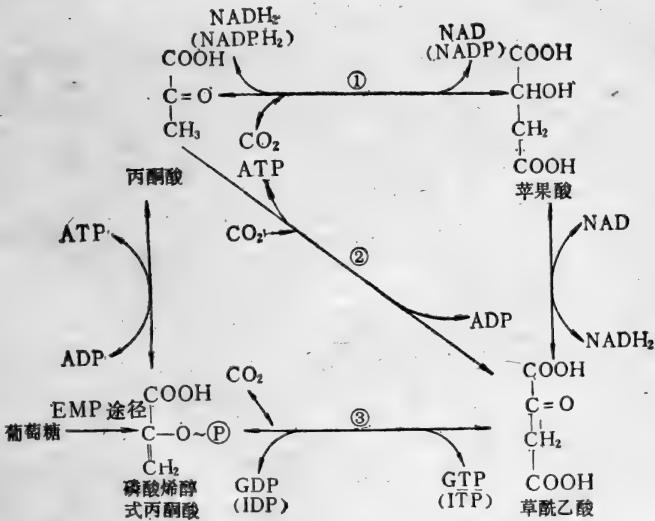


3. 磷酸烯醇式丙酮酸羧化生成草酰乙酸

反应由磷酸丙酮酸羧化酶催化，羧化反应中磷酸烯醇式丙酮酸的高能磷酸键转移给 GDP 或 IDP。



丙酮酸羧化支路可汇集成下图：



(四) 乙醛酸循环

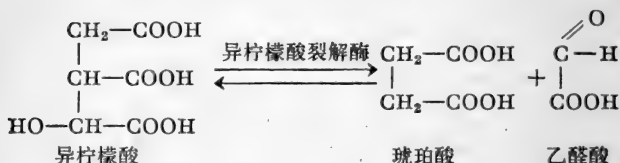
许多微生物，如谷氨酸棒杆菌、黄色短杆菌、酵母、黑曲霉、青霉等，在糖代谢时产生和乙酰辅酶 A，既可以通过三羧酸循环彻底氧化，又可以同时通过乙醛酸循环进行氧化。这类微生物还能直接利用乙酸作为碳源和能源。它们除具有三羧酸循环的酶系外，还具有异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶。当三羧酸循环进行

到异柠檬酸时，异柠檬酸被裂解为乙醛酸与琥珀酸；乙醛酸又可与另一分子乙酰辅酶 A 合成苹果酸而返回三羧酸循环。

这两个酶催化的反应如下：

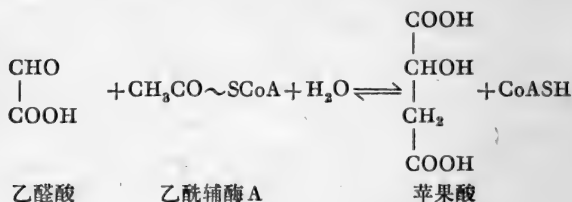
1. 异柠檬酸裂解酶

异柠檬酸在异柠檬酸裂解酶催化下，生成乙醛酸与琥珀酸。



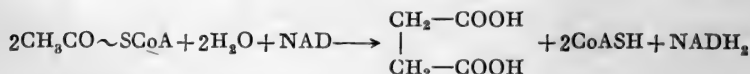
2. 苹果酸合成酶

乙醛酸与乙酰辅酶 A 在苹果酸合成酶催化下合成为苹果酸。

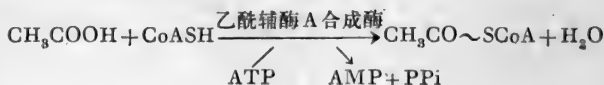


完整的乙醛酸循环如图 6-5 所示。

乙醛酸循环的总反应如下(反应从乙酰辅酶 A 开始)：



有些微生物能利用乙酸作为唯一碳源，这是由于它们具有乙酰辅酶 A 合成酶，使乙酸生成乙酰辅酶 A 而进入乙醛酸循环。



从乙酸开始的乙醛酸循环总反应为：

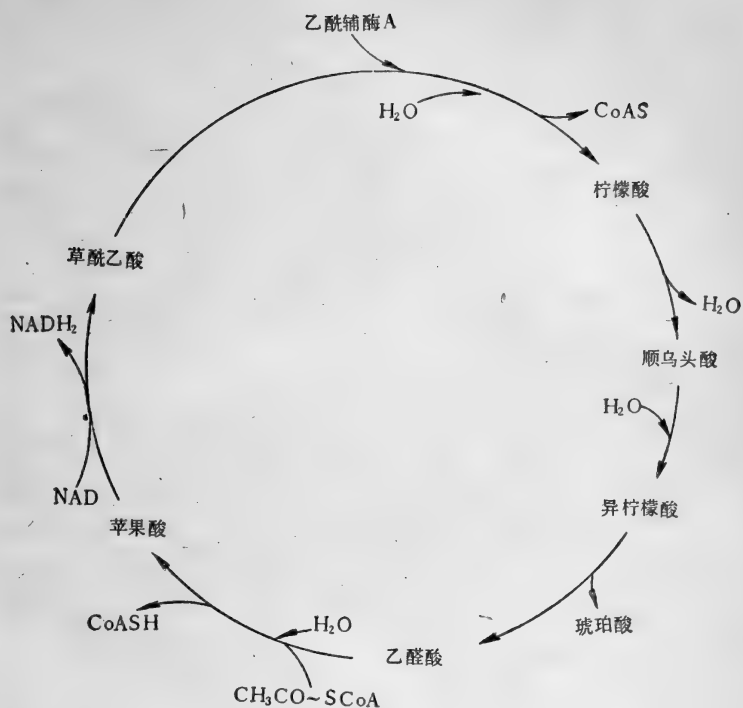
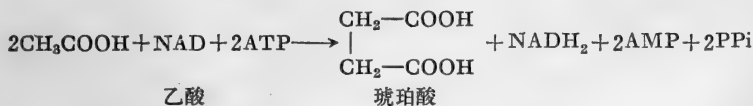


图 6-5 乙醛酸循环(未标出逆反应)



因此，乙醛酸循环的效果是 2 分子乙酸(或乙酰辅酶 A)转化成 1 分子琥珀酸。乙醛酸循环中生成的四碳二羧酸，如琥珀酸、苹果酸仍可返回三羧酸循环(图 6-6)，所以乙醛酸循环可以看作是三羧酸循环的支路。

将乙醛酸循环与三羧酸循环进行比较可以看出，三羧酸循环

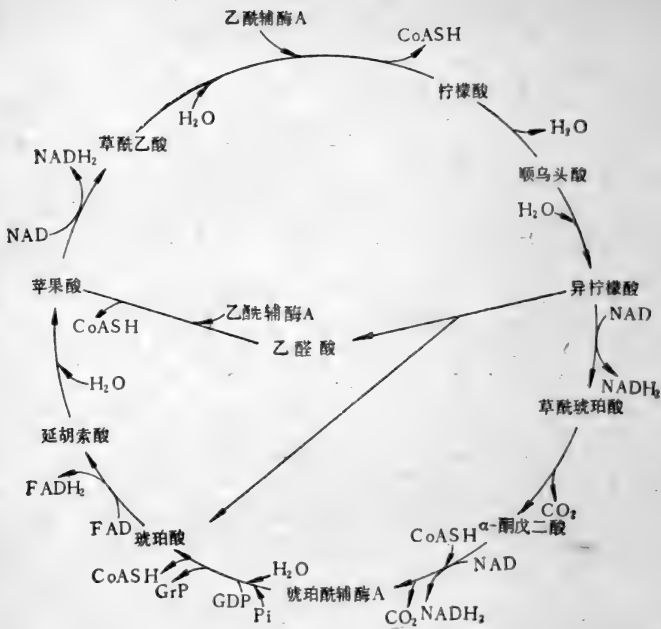


图 6-6 三羧酸循环与乙醛酸循环
(未标出逆反应)

的综合效果是乙酸（或乙酰辅酶 A）彻底氧化成二氧化碳和水；而乙醛酸循环的综合效果是乙酸（或乙酰辅酶 A）转变成四碳二羧酸，显然这些四碳二羧酸可以进入三羧酸循环，因此乙醛酸循环也是三羧酸循环的中间产物的补充方式之一。

乙醛酸循环在微生物代谢中具有重要地位，它是某些能利用乙酸作为唯一碳源和能源的微生物的生长途径。只要有极微量的四碳二羧酸作为起点，乙酸就可以不断地转变为四碳二羧酸和六碳三羧酸。可以设想，一部分乙酸通过三羧酸循环氧化供能。另一部分则用作原料通过乙醛酸循环生成四碳二羧酸，它们可以逆丙酮酸羧化支路和 EMP 途径生成葡萄糖，并继续合成多糖；也可以利用外加的氮源从有关的酮酸转变为氨基酸，合成蛋白质；

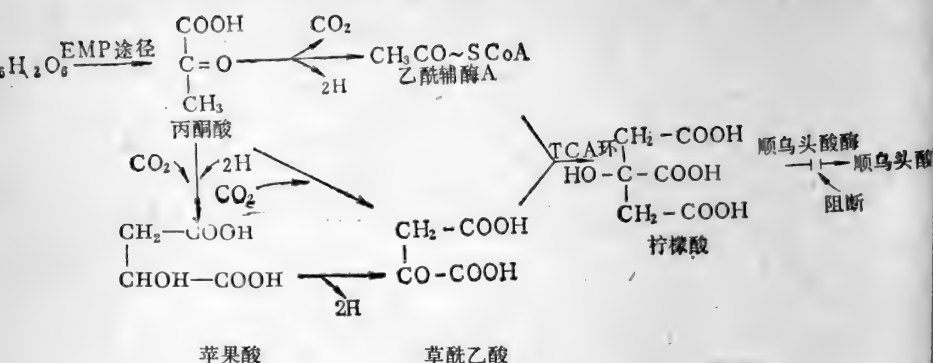
而乙酸通过乙酰辅酶 A 可以合成脂肪酸。这样便可以从乙酸出发合成细胞的主要构成分，满足生长的需要。

(五) 柠檬酸发酵

微生物能进行三羧酸循环已有了充分证据。在正常的三羧酸循环中，各种中间产物是不会被大量积累的。为使循环的中间产物或由它为原料进一步形成其它产物作为微生物的发酵产物而大量积累，则要解决两个基本问题：第一，用一种方法来阻止三羧酸循环某一步骤的进行，从而可大量积累反应阻断以前的某些中间产物。第二，由于三羧酸循环的被阻断(或是大大减弱)，必须具有不断补充被阻断反应以后的中间产物的机制。这样才能使所需的中间产物得以大量积累。据此，已经能用某些微生物在一定的条件下，发酵生产柠檬酸、 α -酮戊二酸、延胡索酸(反丁烯二酸)等。现以柠檬酸发酵为例加以说明。

柠檬酸发酵所用的主要微生物为黑曲霉 (*Asp. niger*)。实验证明，在黑曲霉中具有三羧酸循环和乙醛酸循环的酶系，因此柠檬酸可由乙酰辅酶 A 和草酰乙酸缩合而成。然而要使柠檬酸得以积累，则应设法阻止柠檬酸的进一步反应。方法之一是，根据催化柠檬酸进一步反应的顺乌头酸酶需要 Fe^{++} 激活，因此可使用无铁培养基或在菌体生长繁殖到一定阶段时，适量加入亚铁氰化钾(黄血盐)，使与 Fe^{++} 生成络合物，则顺乌头酸酶失活或活力大大降低，结果使柠檬酸积累。方法之二是，通过诱变手段使黑曲霉的变异菌株的顺乌头酸酶缺损或活力很低，这样就相当于亚铁氰化钾的抑制，于是使柠檬酸积累。

不论用上述哪一种方法来获得柠檬酸，都是阻遏了微生物正常进行三羧酸循环的结果，然而柠檬酸的积累必须不断地供应足够的乙酰辅酶 A 和草酰乙酸。其中乙酰辅酶 A 可由丙酮酸氧化脱羧供应，而草酰乙酸则通过丙酮酸羧化支路供应。于是柠檬酸发酵的可能途径可以归结如下：



黑曲霉能分泌淀粉酶，所以可用淀粉质原料直接发酵生产柠檬酸。

值得注意的是，三羧酸循环是微生物生长所需要的代谢途径，因此在柠檬酸发酵时应当注意满足微生物菌体生长的需要，在阻断柠檬酸进一步反应时，可采用使顺乌头酸酶活性大大降低而又不完全失活的办法，或者在菌体生长到一定阶段后，才阻断柠檬酸的进一步反应。

三、单磷酸己糖途径(HMP途径)

葡萄糖可以经由EMP途径和三羧酸循环进行代谢，在大多数情况下这些途径是糖类代谢的主要途径。微生物在利用乙酸、烃类、脂肪等作为唯一碳源时，由乙醛酸循环作为补充，也是经上述途径进行代谢的。然而还有一条普遍存在的葡萄糖降解途径，这条途径的特点是从6-磷酸葡糖出发经脱氢生成6-磷酸葡糖酸后就氧化脱羧分解成 CO_2 和磷酸戊糖，即在单磷酸己糖基础上开始降解，因此常称为单磷酸己糖途径(即HMP途径)。分解生成的磷酸戊糖经异构化及一系列转酮基和转醛基作用，可以重新组成磷酸己糖。因此这条途径又被称为磷酸戊糖循环或磷酸戊糖支路。

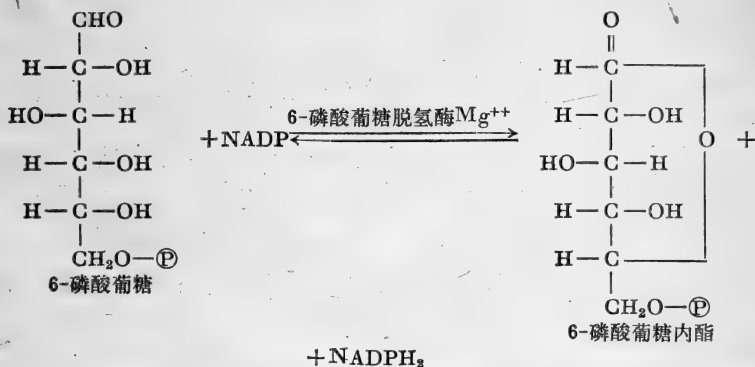
(一) HMP 途径的生物化学过程

葡萄糖首先经 EMP 途径的第一步反应进行磷酸化，生成 6-磷酸葡萄糖，然而进入 HMP 途径。反应在细胞质中进行。

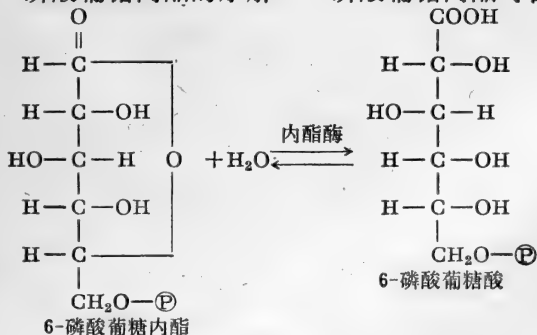
HMP 途径的反应比较复杂，通常可以分为两个阶段，第一阶段由磷酸己糖生成磷酸戊糖；第二阶段由磷酸戊糖重新组成磷酸己糖。

第一阶段：由 6-磷酸葡萄糖开始，经过脱氢、水解、氧化脱羧等反应生成 5-磷酸核酮糖和二氧化碳。

(1) 6-磷酸葡萄糖的脱氢 6-磷酸葡萄糖由 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化，脱氢生成 6-磷酸葡萄糖内酯。此酶的辅酶为 NADP，反应受 Mg^{++} 激活。

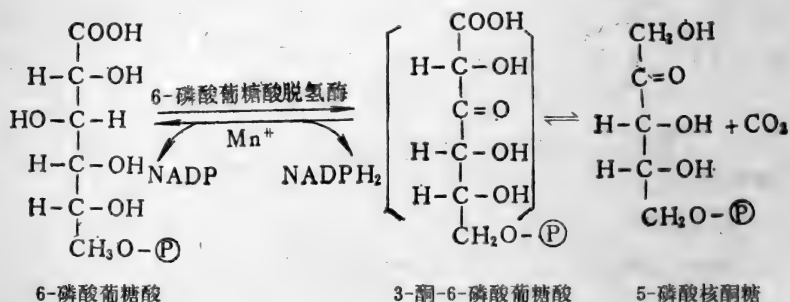


(2) 6-磷酸葡萄糖内酯的水解 6-磷酸葡萄糖内酯可自行水解成



6-磷酸葡萄糖酸，但实际上存在着内酯酶的催化作用。

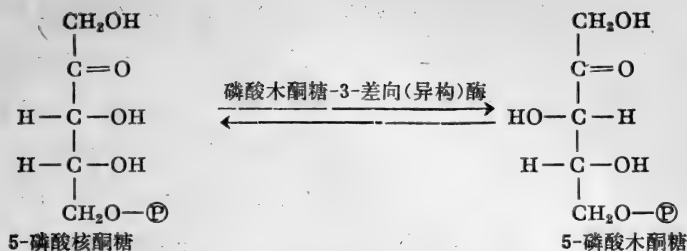
(3) 6-磷酸葡萄糖酸氧化脱羧生成 5-磷酸核酮糖 反应由 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化，此酶同时具有脱氢和脱羧能力，辅酶为 NADP，反应中生成 3-酮-6-磷酸葡萄糖酸为中间产物。反应为 Mn^{++} 所激活。



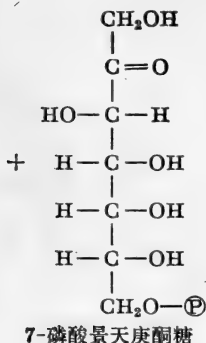
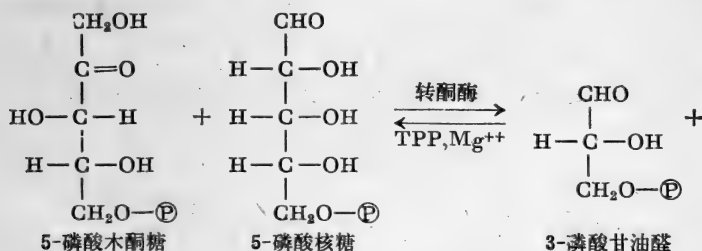
第二阶段：5-磷酸核酮糖反复通过异构化、转酮基、转醛基等反应，并逆 EMP 途径，又重新生成 6-磷酸葡萄糖。

(4) 磷酸戊糖的相互转化 5-磷酸核酮糖在两种不同的异构酶催化下，发生异构化作用，生成两种新的磷酸戊糖。即在磷酸核糖异构酶催化下生成 5-磷酸核糖；在磷酸木酮糖-3-差向(异构)酶(又称磷酸木酮糖表异构酶或磷酸木酮糖立体异构酶)催化下，生成 5-磷酸木酮糖。



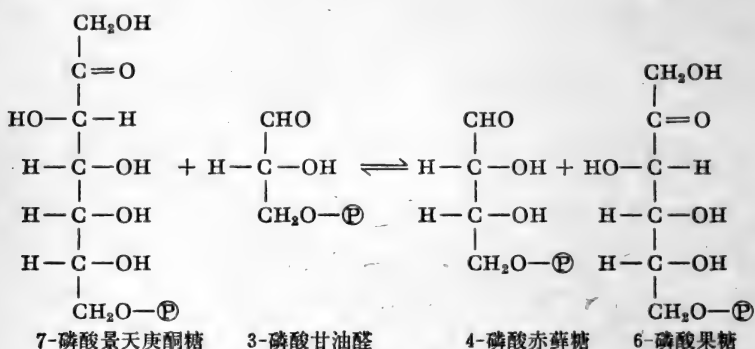


(5) 转酮酶反应 5-磷酸木酮糖在转酮酶（又称转二碳酮基酶）催化下，将一个二碳的 $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-$ 基转移给 5-磷酸核糖，生成 7-磷酸景天庚酮糖，本身则变成 3-磷酸甘油醛。转酮酶的辅酶是焦磷酸硫胺素(TPP)，反应受 Mg^{++} 激活。

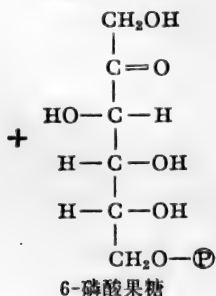
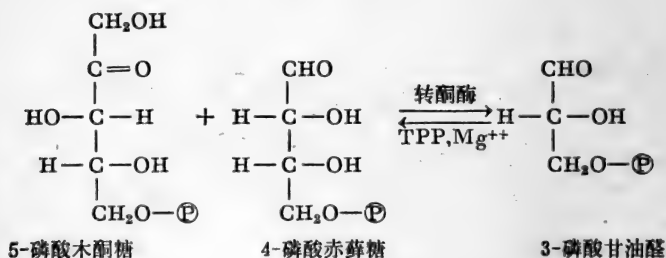


(6) 转醛酶反应 7-磷酸景天庚酮糖在转醛酶（又称转三碳酮基酶）催化下，将一个三碳的 $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-\text{CHOH}-$ 基转移

给 3-磷酸甘油醛，生成 6-磷酸果糖，本身则变成 4-磷酸赤藓糖。



(7) 转酮酶反应 前述反应(4)生成的5-磷酸木酮糖在转酮酶催化下，将一个二碳的 $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-$ 基转移给反应(6)生成的4-磷酸赤藓糖，生成6-磷酸果糖，其本身则转化成3-磷酸甘油醛。



综合反应(4)~(7)步,可见磷酸戊糖经过异构化及分子间的基团转移作用,重新生成磷酸己糖和磷酸丙糖,即由3分子磷酸戊糖[反应(5)、(7)]转变成2分子6-磷酸果糖[反应(6)、(7)]和1分子3-磷酸甘油醛[反应(7)],而3分子磷酸戊糖则可由3分子6-磷酸葡萄糖生成[反应(1)~(3)]。上述反应可归结为图6-7。

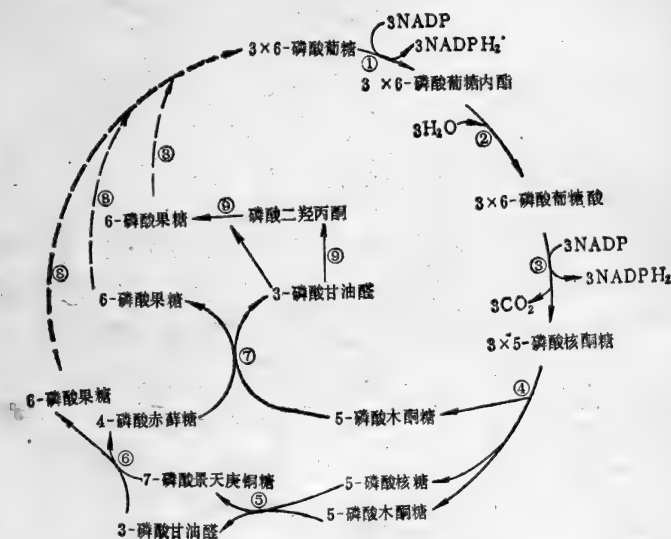


图 6-7 HMP 途径(磷酸戊糖循环)

(8) 反应(6)、(7)生成的6-磷酸果糖经磷酸己糖异构酶的催化,可转化成6-磷酸葡萄糖。

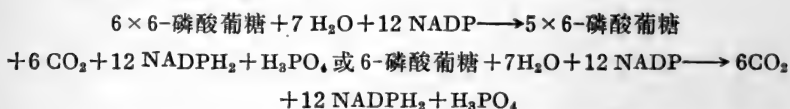
(9) 反应(7)生成的3-磷酸甘油醛在磷酸丙糖异构酶的催化下可以转化为磷酸二羟丙酮,此二种磷酸丙糖可以逆EMP途径生成6-磷酸葡萄糖。

综合HMP途径的反应过程可以看作有6分子6-磷酸葡萄糖同时参加反应,经过脱氢、氧化脱羧作用[反应(1)~(3)]生成6分子二氧化碳和6分子磷酸戊糖,脱下的氢则转移给NADP,生成12分子NADPH₂。6分子磷酸戊糖经异构化及分子间基团转移

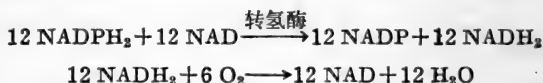
作用〔反应(4)~(7)〕, 生成 4 分子 6-磷酸果糖和 2 分子 3-磷酸甘油醛, 又通过反应(8)~(9), 最终又生成 5 分子 6-磷酸葡萄糖(图 6-8)。

由图 6-8 可以看出, 6 分子 6-磷酸葡萄糖经由 HMP 途径代谢的结果, 重又生成 5 分子 6-磷酸葡萄糖。可以认为只有 1 分子 6-磷酸葡萄糖被彻底分解, 生成 6 分子二氧化碳。同时产生 12 分子 NADPH_2 。

其总反应式可归结为:



在有氧条件下, NADPH_2 上的氢经转氢酶的作用转给 NAD , 然后经呼吸链, 最终传递给分子氧, 同时由电子传递磷酸化产生 ATP 。



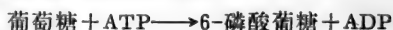
由电子传递磷酸化产生 36 ATP , 即:



则 HMP 途径的最终反应式可写成:



如反应从葡萄糖开始时, 因:



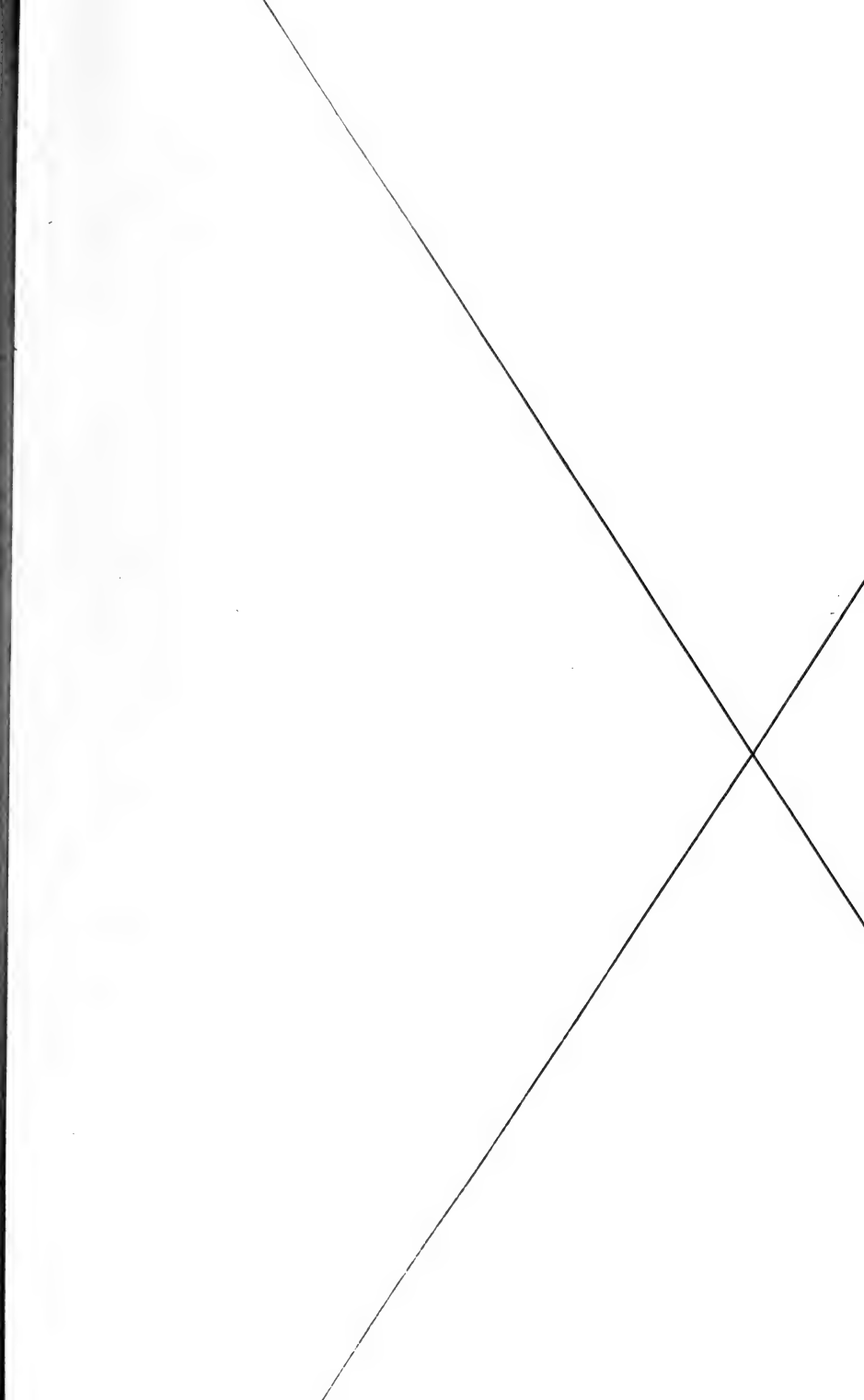
故上式可写成:



如不计 ADP 磷酸化的水分子出入, 则上式可写成:



由上式可见, 葡萄糖在有氧条件下也可经由 HMP 途径彻底氧化成二氧化碳和水, 并产生与葡萄糖经 EMP 途径和三羧酸循环彻底氧化时相当量的 ATP (35 ATP), 此能量可供生物体生命活动之用。



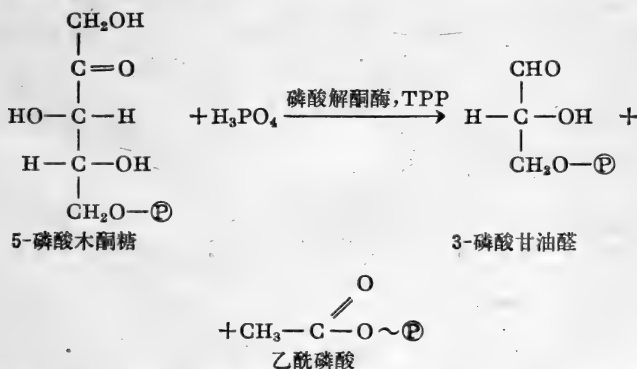


HMP 途径中产生的大量 NADPH_2 更重要的功能在于合成脂肪的代谢，在脂肪酸的合成过程中需要大量 NADPH_2 (详见第七章)。此外， NADPH_2 也可用来(或通过 NADH_2)还原其它有机物。因此，葡萄糖通过 HMP 途径可以进行有氧分解代谢，也可以进行无氧分解代谢。

HMP 途径的中间产物磷酸戊糖，特别是 5-磷酸核糖是合成核酸和合成含有核苷酸结构的辅酶(如 NAD 等)以及合成组氨酸的原料。此外，其它中间产物如 4-磷酸赤藓糖、7-磷酸景天庚酮糖，是合成芳香族氨基酸的前体。

磷酸戊糖在某些微生物中还能发生 2,3-裂解作用，生成二碳和三碳化合物。

例如 5-磷酸木酮糖的 2,3-裂解反应，反应由磷酸解酮酶催化，焦磷酸硫胺素为辅酶。



裂解反应产生的 3-磷酸甘油醛进入 EMP 途径，乙酰磷酸在磷酸转乙酰酶的催化下，生成乙酰辅酶 A，它可进入三羧酸循环。



HMP 途径可以看作是 EMP 途径的支路，HMP 途径从 EMP 途径中的 6-磷酸葡萄糖开始，最终又可回到 EMP 途径中(图6-11)。大多数微生物往往同时具有 EMP 途径和 HMP 途径的酶系(表

6-8), 所以 HMP 途径中生成的 6-磷酸果糖或 3-磷酸甘油醛并不一定转回生成 6-磷酸葡萄糖, 相反却可经历 EMP 途径进行代谢。

(二) 异型乳酸发酵

异型乳酸发酵是糖经 HMP 途径进行的发酵作用, 产物除乳酸外, 还有乙醇和二氧化碳。进行异型乳酸发酵的微生物有肠膜状明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、蕃茄乳杆菌 (*Lac. lycopersici*)、甘露醇乳杆菌 (*Lac. manitopoeum*) 以及真菌中的根霉等。

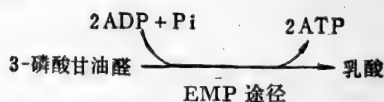
异型乳酸发酵的反应过程:

(1) 葡萄糖经 HMP 途径降解为 5-磷酸核酮糖, 并异构为 5-磷酸木酮糖。

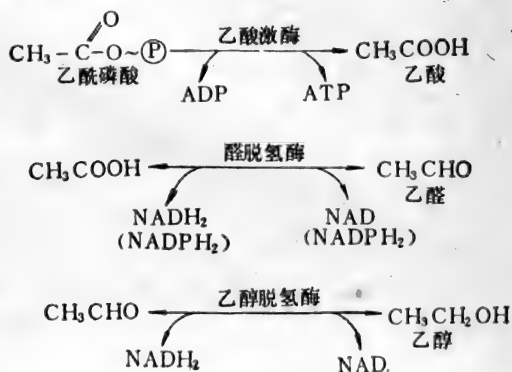
(2) 5-磷酸木酮糖进行 2,3-裂解反应, 生成 3-磷酸甘油醛和乙酰磷酸。

(3) 3-磷酸甘油醛经 EMP 途径生成乳酸; 乙酰磷酸还原生成乙醇, 还原所需的氢来自 HMP 途径中 6-磷酸葡萄糖的脱氢及 6-磷酸葡萄糖酸的氧化脱羧。

① 乳酸的生成



② 乙醇的生成



异型乳酸发酵可归结为图 6-9。

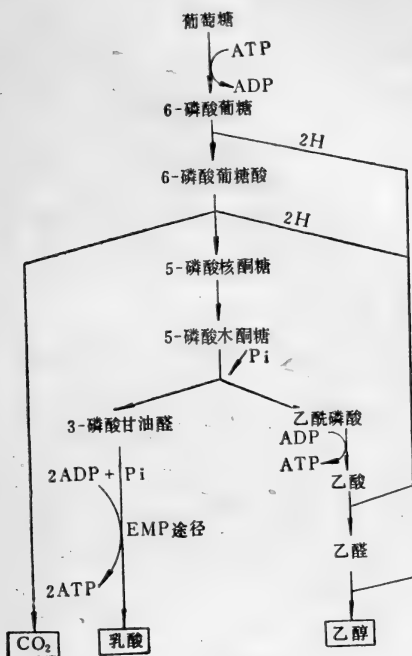
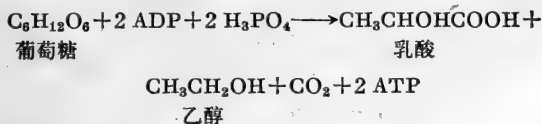


图 6-9 葡萄糖的异型乳酸发酵

发酵总反应式为：



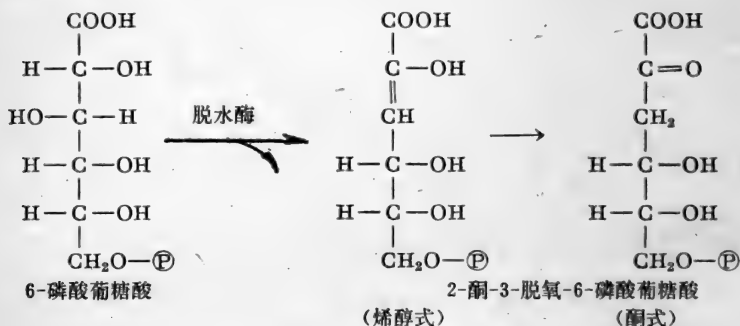
四、脱氧酮糖酸途径(ED 途径)

微生物除通过 EMP、TGA 环、HMP 等途径对葡萄糖进行降解外,某些微生物还能通过脱氧酮糖酸途径(又称 ED 途径)降解。这条途径的特点是形成脱氧酮糖酸并由此裂解为 2 个三碳化合

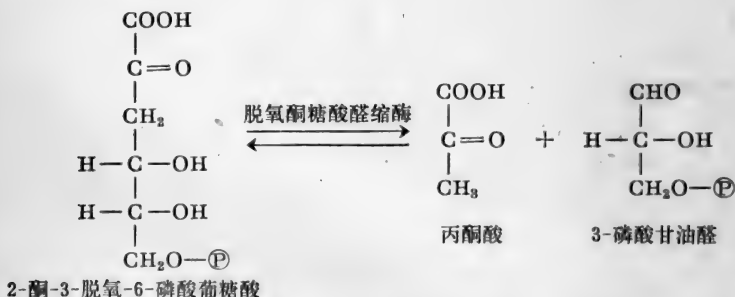
物，从而使葡萄糖降解。

(一) ED 途径的生物化学过程

(1) 葡萄糖首先经 HMP 途径的前三步生成 6-磷酸葡萄糖，它不再进行氧化脱羧，而是在脱水酶的催化下进行脱水反应，生成 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖，反应需 Fe^{++} 和谷胱甘肽，基本上不可逆。



(2) 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖在脱氧酮糖酸醛缩酶催化下发生 3,3-裂解，生成 3-磷酸甘油醛和丙酮酸，这是 ED 途径的特征性步骤。



该反应可逆，平衡偏向裂解方向。

反应中生成的 3-磷酸甘油醛可转入 EMP 途径生成丙酮酸，最终是 1 分子葡萄糖降解成为 2 分子丙酮酸。

(二) 细菌的酒精发酵

少数假单胞杆菌，如林氏假单胞菌 (*Pseudomonas lindneri*) 和嗜糖假单胞菌 (*Ps. saccharophila*) 等利用葡萄糖进行酒精发酵即是通过 ED 途径进行的(图 6-10)。在 ED 途径中，丙酮酸只有 1 分子来自 3-磷酸甘油醛，只能形成 2 分子 ATP，扣除葡萄糖磷酸化消耗的 1 分子 ATP，净得 1 分子 ATP。故其总反应式为：

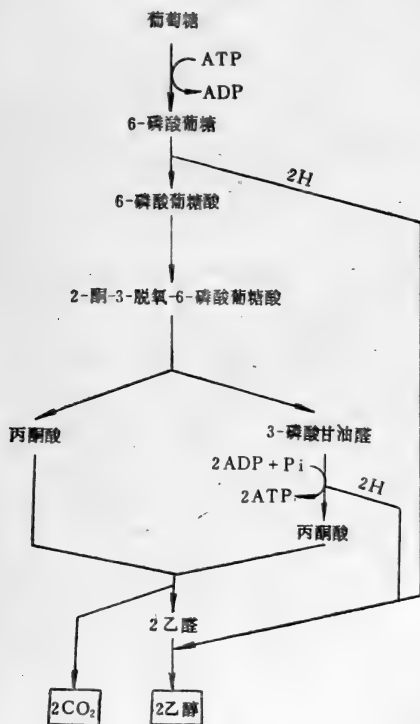


图 6-10 细菌的酒精发酵(通过 ED 途径)

五、葡萄糖降解途径的相互联系

葡萄糖的主要降解途径有 EMP 途径、三羧酸循环、乙醛酸循环和 HMP 途径等，其相互联系如图 6-11 所示。

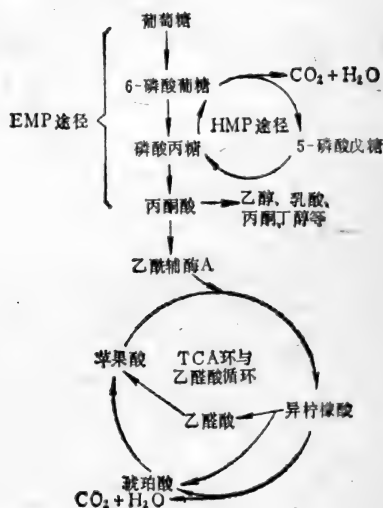


图 6-11 葡萄糖降解途径的相互联系

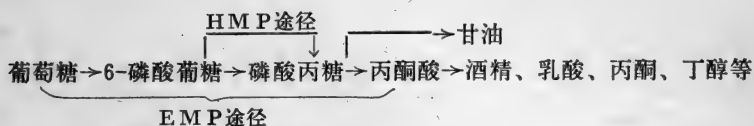
很多微生物具有上述四条代谢途径的全部酶系统，所以可以通过这四条途径进行代谢。从图 6-11 可以看出丙酮酸是四条途径的中心物质，葡萄糖在无氧或有氧的情况下都可以通过 EMP 或 HMP 途径生成丙酮酸；丙酮酸在无氧条件下可以生成各种不同的代谢产物，在有氧的条件下则通过三羧酸循环（以乙醛酸循环为补充）彻底氧化。

因此，根据葡萄糖在有氧或无氧条件下的降解代谢，可以将葡萄糖的分解代谢区分为葡萄糖的有氧降解和无氧降解。

(一) 葡萄糖的无氧降解

葡萄糖经 EMP 途径(或同时通过部分 HMP 途径)生成磷酸

丙糖，再转化成丙酮酸。由磷酸丙糖或丙酮酸生成各种代谢产物。



(二) 葡萄糖的有氧降解

不同微生物的有氧降解途径各不相同，通常有下列三种情况：

(1) HMP 途径 少数细菌是以 HMP 途径为唯一的有氧降解途径。

(2) EMP 途径、TGA 环、乙醛酸循环 以此种方式进行有氧降解的微生物不多。

(3) EMP 途径、HMP 途径、TGA 环和乙醛酸循环 大多数微生物都以此途径进行有氧降解。

由此可见，不论是有氧降解还是无氧降解，从葡萄糖生成丙酮酸，大多数微生物都是同时通过 EMP 及 HMP 途径进行的。至于 EMP 与 HMP 途径的比例，则因不同的微生物而异(表 6-4)。一般说来 HMP 途径的比例要比 EMP 途径小得多。

表 6-4 几种微生物的葡萄糖降解途径的比例

微 生 物	EMP(%)	HMP(%)	ED(%)
黄色短杆菌 (<i>Brevibacterium flavum</i>)	90	10	—
产蛋白假丝酵母(<i>Candida utilis</i>)	50~96	4~50	—
啤酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	94~96	4~6	—
米根霉(<i>Rhizopus oryzae</i>)	100	—	—
产黄青霉(<i>Penicillium chrysogenum</i>)	42	58	—
指状青霉(<i>Penicillium digitatum</i>)	77~83	17~23	—
灰色链丝菌(<i>Streptomyces griseus</i>)	90~97	3~10	—
粗糙脉孢菌(<i>Neurospora crassa</i>)	90	10	—
烟状卡尔曲霉(<i>Caldariomyces fumago</i>)	—	35	65
小麦网腥黑粉菌(<i>Tilletia caries spores</i>)	—	—	100

(三) 葡萄糖有氧降解和无氧降解的比较(见表 6-5)

表 6-5 葡萄糖有氧降解和无氧降解的比较

	有 氧 降 解		无 氧 降 解
降解途径	EMP、TCA	HMP	EMP
最终受氢体	O ₂	O ₂	代谢中间产物, 如乙醛、丙酮酸……
最终产物	CO ₂ +H ₂ O	CO ₂ +H ₂ O	酒精、乳酸……
产生ATP数目	38	35	2

第五节 其它已糖的降解

微生物除能降解利用葡萄糖外, 对于其它已糖, 如果糖、半乳糖、甘露糖等也能吸收利用进行降解。例如酵母菌除能利用葡萄糖进行酒精发酵外, 也能利用果糖、甘露糖进行酒精发酵。其它已糖在微生物体内的降解代谢, 一般先转化成葡萄糖或果糖的磷酸酯, 然后进入上节所述的各种代谢途径继续降解。

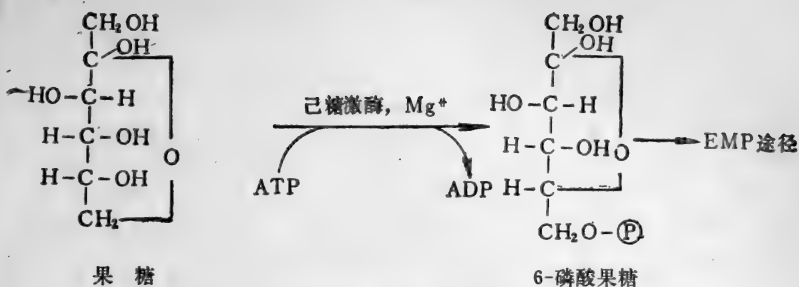
一、果糖的降解

果糖也是大多数异养微生物能吸收利用的一种已糖。在自然界分布广泛, 它以游离状态存在于植物的绿色部分、花的蜜腺、甜果实及蜂蜜内; 它也是蔗糖和果糖胶(如菊糖)的组成成分。

果糖的降解通常有下列两种情况:

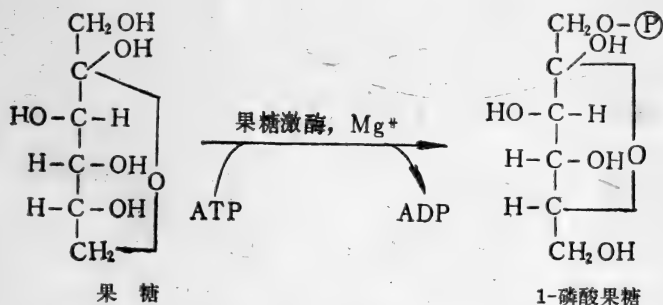
(一) 果糖经 6-磷酸果糖的降解

果糖由己糖激酶催化, 在 ATP 参与下, 生成 6-磷酸果糖, 进入 EMP 途径。

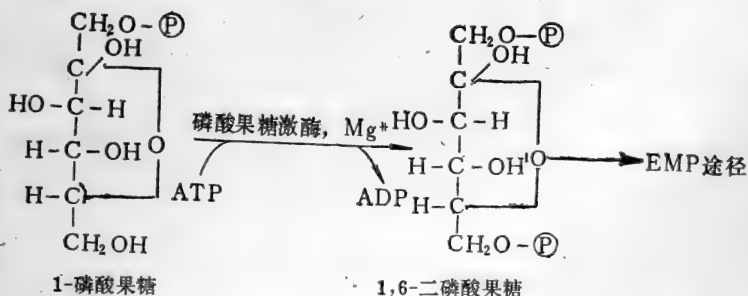


(二) 果糖经 1-磷酸果糖的降解

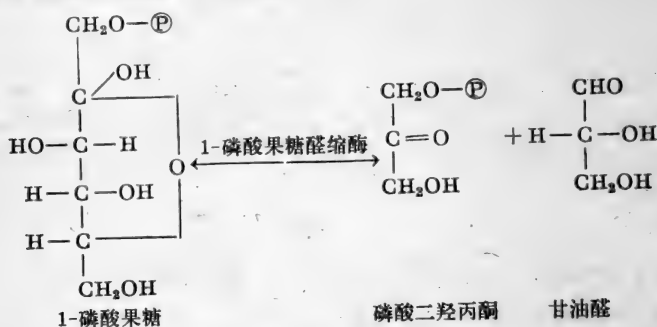
果糖由果糖激酶(或己酮糖激酶)催化, 在 ATP 参与下, 生成 1-磷酸果糖。



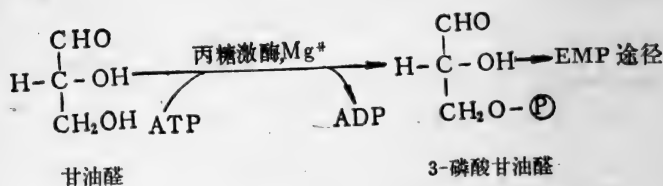
1-磷酸果糖由磷酸果糖激酶催化, 在 ATP 参与下, 生成 1,6-二磷酸果糖, 进入 EMP 途径。



1-磷酸果糖也可由1-磷酸果糖醛缩酶催化, 进行3,3-裂解生成甘油醛和磷酸二羟丙酮。



反应生成的磷酸二羟丙酮可进入 EMP 途径, 甘油醛由丙糖激酶催化, 在 ATP 参与下, 生成 3-磷酸甘油醛, 也进入 EMP 途径。



果糖的降解可归结为图 6-12(见 257 页)。

二、半乳糖的降解

半乳糖一般以结合态存在于双糖如乳糖、蜜二糖; 三糖如棉子糖; 多糖如琼脂、半纤维素中。

半乳糖的降解是通过一系列反应, 使其转化成 1-磷酸葡糖, 然后在磷酸葡糖变位酶的催化下, 可转化成 6-磷酸葡糖, 再进入葡萄糖的降解途径。

半乳糖转化为 1-磷酸葡糖的中心物质是尿苷二磷酸葡糖

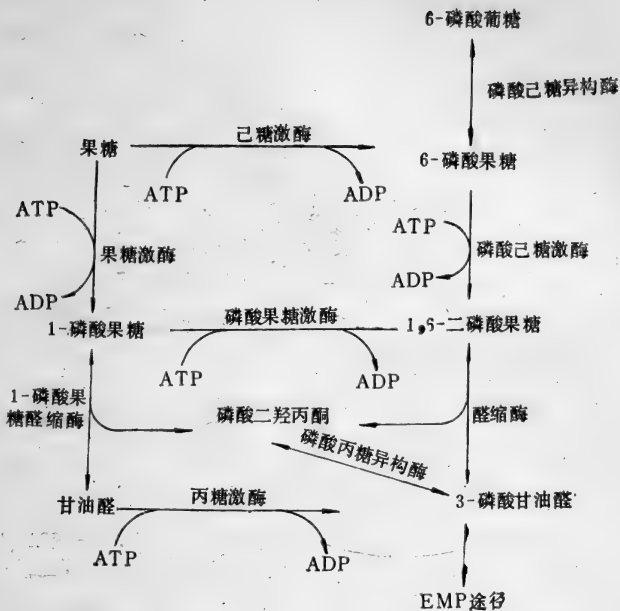
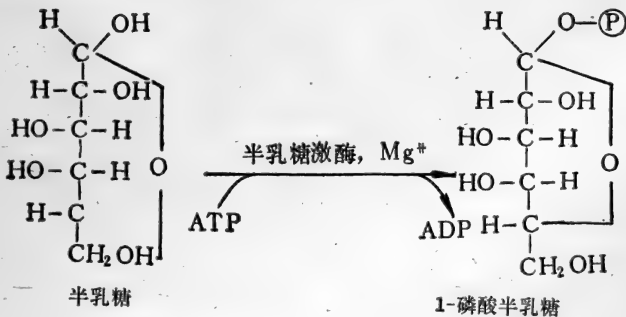


图 6-12 果糖的降解

(UDPG), 其转化过程如下:

(一) 1-磷酸半乳糖的生成

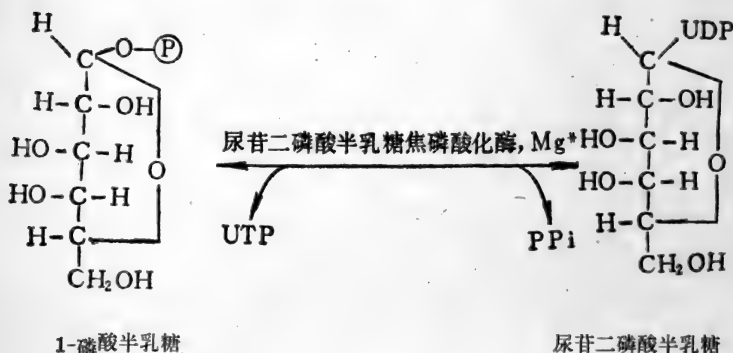
半乳糖由半乳糖激酶催化, 在 ATP 参与下, 生成 1-磷酸半乳糖。反应受 Mg^{++} 激活。



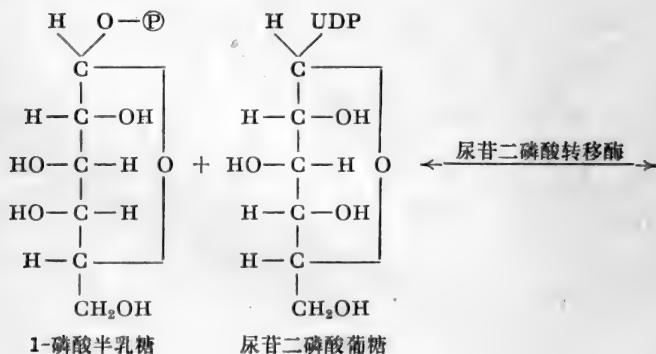
(二) 尿苷二磷酸半乳糖的生成

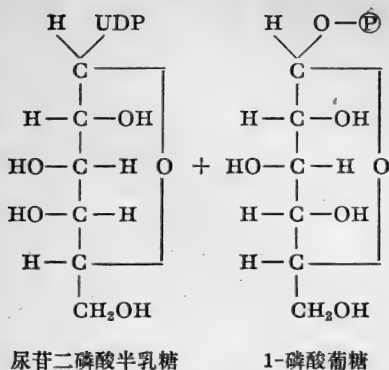
1-磷酸半乳糖转化成尿苷二磷酸半乳糖有两种情况。

(1) 1-磷酸半乳糖由尿苷二磷酸半乳糖焦磷酸化酶催化，在UTP参与下，生成尿苷二磷酸半乳糖。反应受 Mg^{++} 激活。



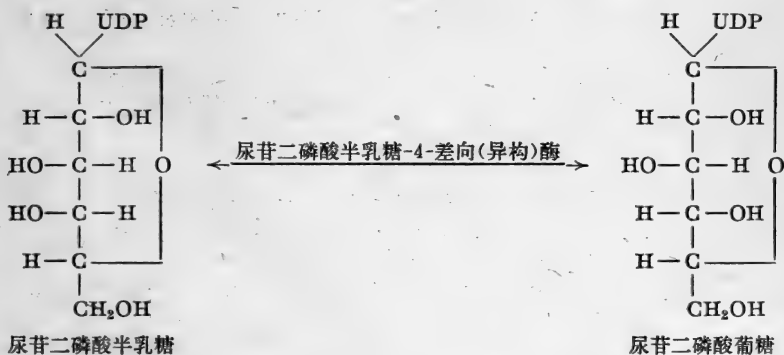
(2) 1-磷酸半乳糖在尿苷二磷酸转移酶（或称磷酸半乳糖转尿苷酸酶）催化下，与尿苷二磷酸葡萄糖反应，生成尿苷二磷酸半乳糖和1-磷酸葡萄糖。





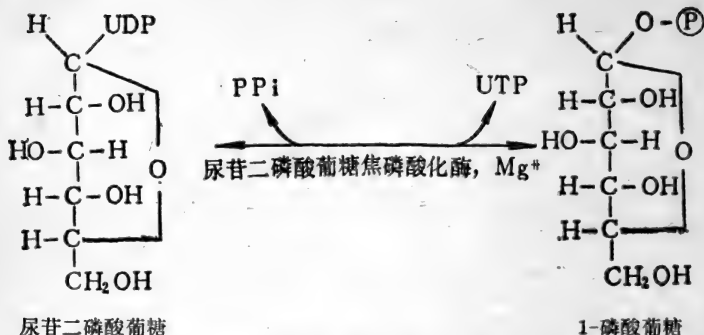
(三) 尿苷二磷酸葡萄糖的生成

尿苷二磷酸半乳糖在尿苷二磷酸半乳糖-4-差向(异构)酶催化下, 生成尿苷二磷酸葡萄糖。



(四) 1-磷酸葡萄糖的生成

尿苷二磷酸葡萄糖在尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶催化下, 转化成1-磷酸葡萄糖。



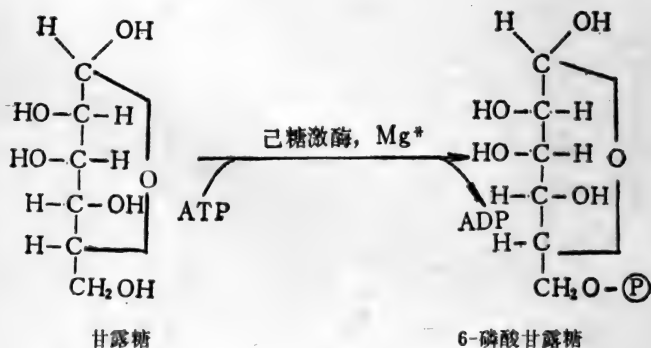
1-磷酸葡萄糖在磷酸葡萄糖变位酶催化下转化成 6-磷酸葡萄糖，进入葡萄糖降解途径。

三、甘露糖的降解

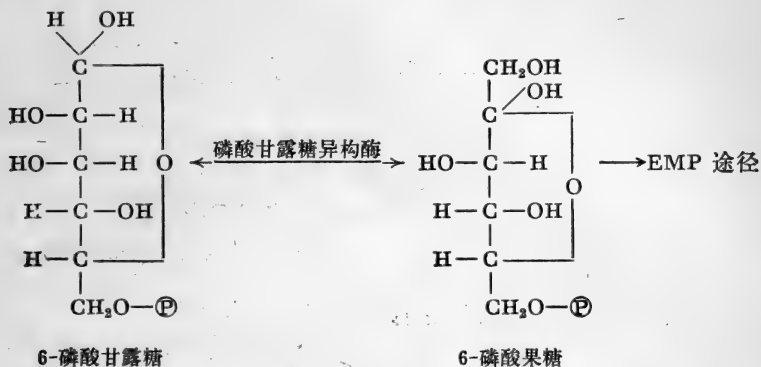
甘露糖一般以甘露糖胶的形式存在于半纤维素中，以酶法或酸法水解半纤维素时可得到甘露糖，例如亚硫酸纸浆废液中含有甘露糖。

甘露糖的降解一般先生成 6-磷酸甘露糖，然后异构化为 6-磷酸果糖，进入葡萄糖降解途径。

甘露糖由己糖激酶的催化，在 ATP 参与下，生成 6-磷酸甘露糖。反应受 Mg^{++} 激活。



6-磷酸甘露糖在磷酸甘露糖异构酶催化下，转化成 6-磷酸果糖，即进入 EMP 途径。



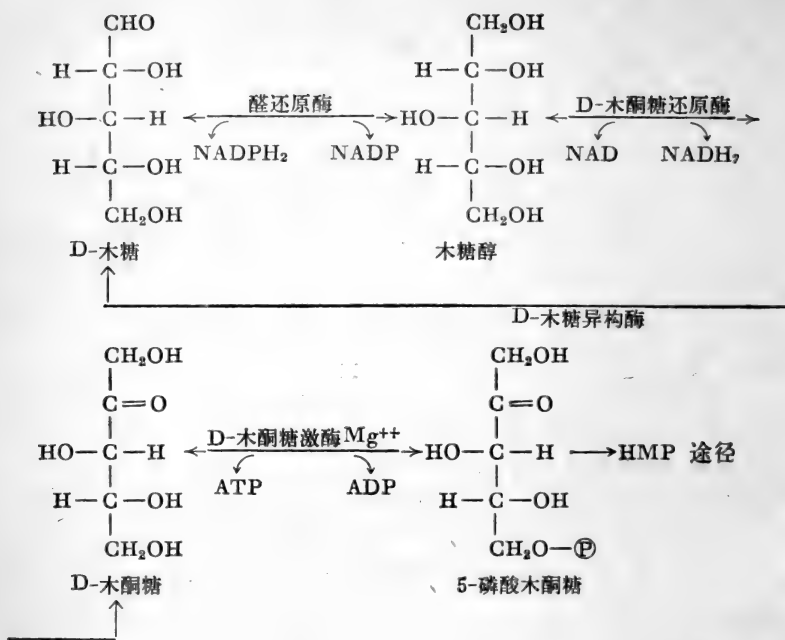
第六节 戊糖的降解

自然界中分布较广的戊糖有 D-核糖、L-阿拉伯糖、D-木糖。L-阿拉伯糖和 D-木糖通常以阿拉伯糖胶和木糖胶的形式存在于植物中，是粘质、树脂和半纤维素的组成成分。D-核糖及其衍生物 D-2-脱氧核糖则为核酸类物质的组成成分。戊糖能被某些微生物利用。例如亚硫酸纸浆废液中含有戊糖——L-阿拉伯糖和 D-木糖，常被综合利用来培养产蛋白假丝酵母 (*Candida utilis*)、热带假丝酵母 (*C. tropicalis*) 等，以供饲用。

戊糖的降解一般以磷酸戊糖的形式通过 HMP 途径进行，而后可进入 EMP 途径及三羧酸循环降解。

一、D-木糖的降解

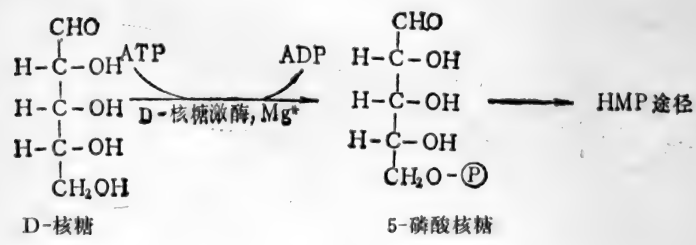
某些微生物降解 D-木糖的过程如下：



D-木糖通过氧化还原作用或异构化作用转化为 D-木酮糖，D-木酮糖通过磷酸化作用生成 5-磷酸木酮糖 (5-磷酸-D-木酮糖)，即可进入 HMP 途径。

二、D-核糖的降解

D-核糖由 D-核糖激酶催化，在 ATP 参与下，生成 5-磷酸核糖。



复 习 题

1. 糖类物质在生物体内起什么作用?
2. 微生物怎样消化淀粉?
3. 试述葡萄糖的酵解过程。
4. 酵母菌在正常情况发酵产物是什么? 其过程如何? 在什么情况下酵母菌可以产生甘油?
5. 什么叫三羧酸循环? 对生物有何重要意义?
6. 什么叫乙醛酸循环? 它与三羧酸循环有何联系?
7. 什么叫单磷酸己糖途径? 它与糖酵解、三羧酸循环有何区别和联系?
8. 哪些微生物发酵工业与糖代谢直接有关?

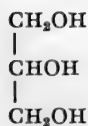
第七章 脂类代谢

第一节 脂类

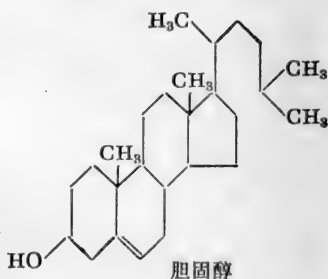
一、脂类的组成及其类别

脂类是自然界中一大类物质，与蛋白质、糖一起为构成原生的主要成分。通常脂类包括脂肪(真脂)、磷脂、糖脂甾醇(固醇)和蜡等。它们的元素组成除碳、氢、氧外，有的还含有磷和氮。化学结构特点是由长链脂肪酸(高级脂肪酸)与醇所形成的酯或类酯物。性质是不溶于水而溶于脂溶剂，如乙醚、氯仿、苯及丙酮等。

生物体内构成脂类的醇最通常的是甘油，但某些重要脂类分子的醇是胆固醇。甾醇为一类含环戊烷多氢菲核的高分子一元醇。在自然界中分布极广，有时自由存在。在微生物中甾醇含量不一，酵母菌中含有多量的甾醇类，但有些细菌几乎没有。



甘油



由三分子脂肪酸与甘油分子中的三个羟基形成的酯称甘油三酯或中性脂，亦称脂肪(真脂)。脂类中除了脂肪外的其他脂则称

为类脂。

磷脂也是一种甘油酯，但在它的组成中，除甘油和脂肪酸外，还含有磷酸及有机碱性含氮化合物。微生物体中重要的磷脂是卵磷脂。

糖脂为含糖的脂类。微生物体亦含有糖脂，经对革兰氏阴性菌中糖脂进行研究，知它们普遍含有双己糖基甘油二酯，有的含葡萄糖与半乳糖两种单糖，有的含二分子葡萄糖，并认为此糖脂可能参与多糖生物合成。

蜡是由高级一元醇与高级脂肪酸所形成的酯，通常呈固体状态。组成中含不饱和脂肪酸的量很少，所以性质比较稳定，它的生物化学性质不活泼。动植物体都利用蜡保护自己，但在细胞中很少存在，与我们关系不大。

由低级脂肪酸和低级醇(如乙醇)形成的酯，呈芳香气，是构成酿造产品芳香性的特征性物质，所以放在此章予以介绍。

二、脂类的存在形式与生理功能

(一) 脂类的存在形式

脂类广泛地存在于一切生物体内，以两种形式存在：

1. 体质脂形式

即作为原生质的组成而存在于细胞内，它们多半为类脂物质，在原生质中不是以脂肪滴的形式存在，而是与蛋白质疏松结合成为复杂的脂蛋白结构。在细胞中含量非常恒定。

2. 贮存脂形式

在高等动物体内，贮存脂一般都贮存于皮下结缔组织、大网膜、肠系膜等处。动物的脂肪组织可以含有 80% (以干重计，下同) 或更多的脂类。植物体内的脂肪主要是集中地贮存在果实和种子内(如花生含油 40.2~60.7%、芝麻含油 46.2~61.0%，大豆含油 10~25%)。在微生物体内则以脂滴形式贮存于细胞质中。某些微生物的脂类含量很高，并知其是无毒的，因此可用来

生产油脂。今将几种含脂类量较高的微生物列于表 7-1。

表 7-1 几种微生物的脂类含量(以干重%表示)

菌 名	脂 类 量	菌 名	脂 类 量
构巢曲霉	51.0	红 酵 母	61.0~71.0
索氏青霉	40.0	啤 酒 酵 母	14.0~17.0
淡紫青霉	56.0	异常汉逊酵母	16.9
卷枝青霉	65.0	阴沟气杆菌	12.0~20.0
		巨大芽孢杆菌	9.2~33.8

(二) 生理功能

脂类是一类重要物质。类脂和蛋白质是构成生物膜的主要成分，其中类脂量约占膜质量的 40% (以卵磷脂为主)。类脂的不溶性使膜具有包围和保护细胞的能力。又因为膜是类脂和蛋白质的复合物，因此对各种物质的扩散与运输具有重要的功能。现在已经知道，生物膜的存在与作用是与构成生命活动的许多基本问题，如能量转化、代谢调控、选择性渗透作用、免疫作用、激素和药物的作用、神经传导等都有密切关系。生物膜已成为当代分子生物学的主要研究领域之一。因之，类脂的重要功能由此可见。

脂肪可作为能源，它们在生物体内氧化时，能产生大量的能 (1 克脂肪产热 9.3 千卡)，产生的热量二倍于糖类或蛋白质。脂肪也能作为微生物的碳源。如灰绿青霉 (*Penicillium glaucum*) 和大毛霉 (*Mucor mucedo*) 可以在仅含脂类或脂肪酸类而不含其他碳源的培养基中生长。

脂肪酸是脂类的主要组成，它的链长度和饱和度会直接影响到组成物的理化性质，从而引起生理功能的变化。如磷脂中脂肪酸的组成会影响到膜的流动性，而影响膜的通透性。脂肪的性质

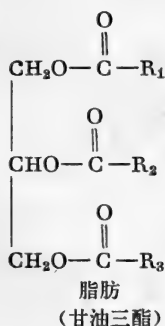
和粘稠度，可因为双键的引入脂肪酸而熔点下降。这种变更脂肪酸的不饱和度的功能，被认为是生物体用以调整细胞脂质的物理状态，来适应环境温度变化的措施。很早就知道，生长在寒冷地带的植物种子中，含油的不饱和度较高，这显然有利于植物的生存。

高级脂肪酸，如油酸和亚油酸可被不少放线菌和真菌作为能源和碳源而利用。低浓度的高级脂肪酸可以刺激多种细菌的生长，但浓度较高时，往往起毒害作用。高级脂肪酸不溶于水，因而常用可溶性的吐温(Tween,是高级脂肪酸的衍生物)代替以制备培养基。

第二节 脂肪的分解代谢

一、脂肪的组成与脂肪的乳化作用

(一) 脂肪的组成



脂肪是甘油与脂肪酸所构成的酯，为甘油三酯。式中 R_1, R_2, R_3 为各种脂肪酸的烃基，天然脂肪中所含的脂肪酸种类甚多，但碳原子数大都为偶数。含量最多并且普遍存在的高级脂肪酸有：硬脂酸、软脂酸、油酸，其次为亚油酸、亚麻酸及二十碳四烯酸，后三种不饱和脂肪酸是高等动物不可缺少的营养素，有“必

需脂肪酸”之称。

不饱和脂肪酸在细菌营养上亦具有相当的重要性。它们的功用尚未完全明了，现在已知不饱和脂肪酸可以构成菌体必需的脂类，表现在磷脂中的含量较在一般脂肪中为多。今将常见的脂肪酸及其主要来源列于表 7-2。

表 7-2 脂类中的重要脂肪酸

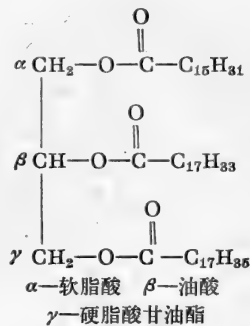
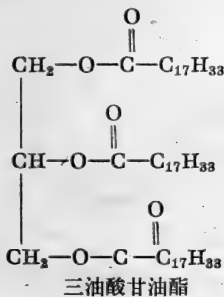
	名称及分子式	异名	来源
饱和 脂肪 酸	丁酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	酪酸	奶油
	己酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$		奶油
	辛酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$		奶油
	癸酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	十二碳酸 十四碳酸 十六碳酸 十八碳酸 二十碳酸 二十四碳酸	椰子油、奶油
	月桂酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$		鲸蜡、椰子油
	豆蔻酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$		豆蔻脂、椰子油
	软脂酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$		各种动植物油
	硬脂酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$		各种动植物油
	花生酸 $\text{CH}_3(\text{OH}_2)_{18}\text{COOH}$		各种动植物油
掬焦油酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	花生油、脑苷脂		
不饱 和脂 肪酸	油酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	十八碳烯酸	各种动植物油
	神经酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}-\text{COOH}$	二十四碳烯酸	烯脑苷脂
	亚油酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	十八碳二烯酸	亚麻仁油、棉子油
	亚麻酸 $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CHCH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$	十八碳三烯酸	亚麻仁油
	二十碳四烯酸 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$		卵磷脂、脑磷脂
环状 脂肪 酸	大枫子酸 $\begin{array}{l} \text{CH}=\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$		大枫子油

脂肪酸在体内除作为脂类组成外，尚能游离存在，特别是在微生物的脂类中，游离脂肪酸常占很高比例。如黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 的脂类酸值高达 71.2。

根据组成甘油酯中脂肪酸的情况可分成两种类型：

(1) 单纯甘油酯 即甘油酯中三个组成脂肪酸为一同种，例如三油酸甘油酯

(2) 混合甘油酯 即甘油酯中三个组成脂肪酸中的二个或三个相异，例如 α -软脂酸， β -油酸， γ -硬脂酸甘油酯



天然甘油酯绝大部分为混合甘油酯，因此脂肪是混合甘油酯的混合物。

(二) 乳化作用

脂肪不溶于水，但与水长时间振荡可形成乳状液。这种乳状液很不稳定，静置后很快分成两层，若加入第三种物质(如肥皂、蛋白质、磷脂、胶质等)则能增加乳状液的稳定性，此等物质称乳化剂。它们是一种表面活性物质，能降低两相(水/油)界面的表面张力(如肥皂、磷脂等)或增加水相的粘度(蛋白质、胶质等)，使乳状液稳定，此作用称乳化作用。故乳化作用是在不稳定的乳状液中，加入乳化剂而使之形成稳定的乳状液的作用。

乳化剂所以能起乳化作用，主要是分子中既具有亲水基又具有疏水基。例如肥皂是高级脂肪酸的钠盐或钾盐(RCOONa或

RCOOK), R基为疏水基, $-\text{COONa}$ 为亲水基, 因而当肥皂与脂肪的乳状液作用时, 在脂肪小滴上形成一个肥皂分子的薄膜, 分子的疏水一端朝向脂肪内, 亲水的一端则朝向水中(见图 7-1)。由于每个脂肪滴表面具有这样一个薄膜, 因而降低了油/水间的界面张力, 使乳状液中的各个小滴不直接相接触, 因而不能相互融合分层, 而使乳状液保持稳定。

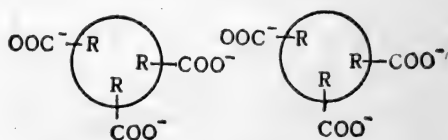


图 7-1 乳状液的乳化作用
 ○—脂肪滴 R—COO⁻—乳化剂

乳状液的形成, 具有极重要的生理意义, 它有利于脂肪的消化分解。

而油脂具有疏水性, 不利于乳化作用, 在发酵生产上常用作消泡剂。

二、脂 肪 酶

脂肪在进行分解代谢之前, 须经脂肪酶水解成脂肪酸及甘油, 然后循不同途径进行代谢。脂肪酶的正式名称是甘油酯水解酶, 广泛存在于胰脏、蓖麻子及各种微生物中。不同来源的脂肪酶对脂肪酸碳链的长短有选择性, 有的脂肪酶主要作用于短碳链(如 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{10}$)的脂肪酸甘油酯(此酶应用于乳品工业可增强产品的芳香性); 有的主要作用于长碳链(C_{14} 以上)的脂肪酸甘油酯。由于脂肪酶不太稳定, 较难纯化, 而且是在油水不匀系统中反应的, 因此研究也较为困难。

脂肪酶对基质的分解和合成都能起催化作用, 这性质在其它水解酶中很少有。多数脂肪酶同SH基有关, 当通气, 加过氧

化氢等使 SH 基氧化后,就抑制水解而进行合成反应。维生素 C、半胱氨酸、钙离子等对脂肪水解有促进作用,而油水混合系的乳化成度对酶反应有重要影响。

真菌中的脂肪酶在细胞内外存在,细胞内贮存的脂肪可被胞内的脂肪酶所水解,外源(外部供给的称外源)的脂肪则被胞外脂肪酶所水解。

不少微生物可用来生产脂肪酶,常用的菌种有根霉、黑曲霉、白地霉、青霉等。许多商品脂肪酶制剂都具有酯酶的活性,也能使低级脂肪酸的一价醇酯加水分解。不同来源的脂肪酶,其性质也不相同。今将由微生物制得的几种脂肪酶的性质列于表7-3。

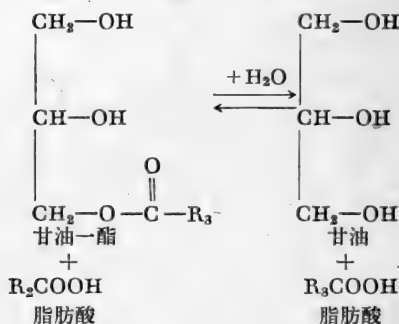
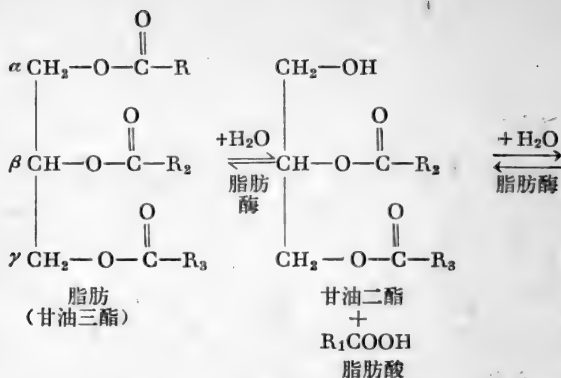
表 7-3 几种微生物脂肪酶性质的比较

来 源	最适 pH	最适温度 (°C)	pH 稳定范围(30°C)	热稳定性 (15,°C)	*酶活力		作用条件
					蛋白质毫克		
黑曲霉 (<i>Asp.niger</i>)	5.6	25	2.2~6.8	50	60		振荡
德氏根霉 (<i>Rh. delemar</i>)	5.6	35	3.0~8.0	45	22000		振荡
白地霉 (<i>Geotrichumcondidum</i>)	6.0	35	4.5~10.0	50	1000		乳化
环状青霉 (<i>Pen. cyclopium</i>)	7.0	30	6.5~9.0	40	12000		乳化

* 酶活力以每毫克蛋白质的脂肪酸单位 (Lu) 计。脂肪酶单位定义是在特定条件下,每分钟产生一微克分子羧酸所需的酶量。

三、脂肪的水解

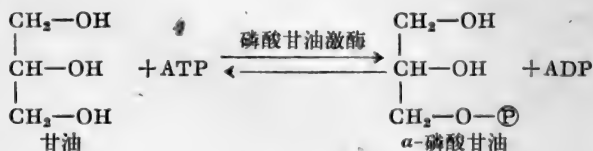
脂肪在脂肪酶的催化下,水解成甘油与脂肪酸,其反应如下:



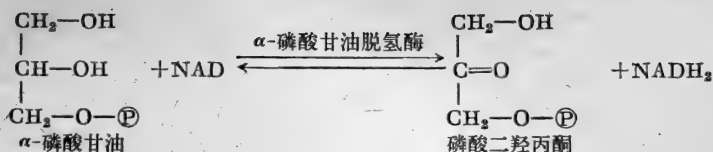
反应生成的脂肪酸与甘油分别进行降解。

四、甘油的降解

(1) 甘油在磷酸甘油激酶的催化下，进行磷酸化作用，生成 α -磷酸甘油。



(2) α -磷酸甘油在 β -磷酸甘油脱氢酶的催化下，生成磷酸二羟丙酮。



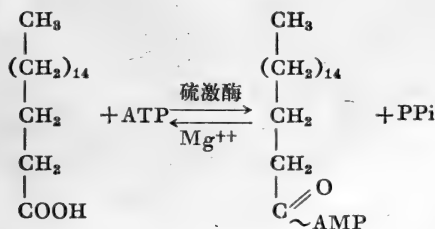
反应生成的磷酸二羟丙酮可以进入 EM 途径及 TGA 循环进一步氧化。也可以逆 EM 途径生成葡萄糖。

五、脂肪酸的降解—— β -氧化作用

生物体内由脂肪水解形成的脂肪酸及细胞内的游离脂肪酸降解时，是逐步进行 β -氧化，使碳原子两个、两个地从脂肪酸链上断下来，最后全部降解成乙酰辅酶 A (即活性乙酸)。此过程所需要的各种酶和辅酶线粒体都具有。辅酶 A 在脂肪酸氧化过程中起重要作用。今以硬脂酸为例，其反应的具体步骤如下：

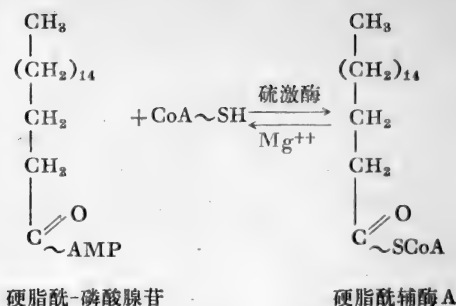
1. 脂肪酸的活化

脂肪酸在进行 β -氧化作用前，必须经过激活。激活反应是在脂酰硫激酶 (简称硫激酶，又名脂酰辅酶 A 合成酶) 的催化下分两步进行的。第一步由 ATP 中转移一磷酸腺苷 (AMP) 来激活脂肪酸的羧基，并同时释放出无机焦磷酸 (PPi)。第二步是被激活了的羧基和辅酶 A (CoA-SH) 的 SH 基起反应生成脂酰辅酶 A 和 AMP。



硬脂酸

硬脂酰-磷酸腺苷



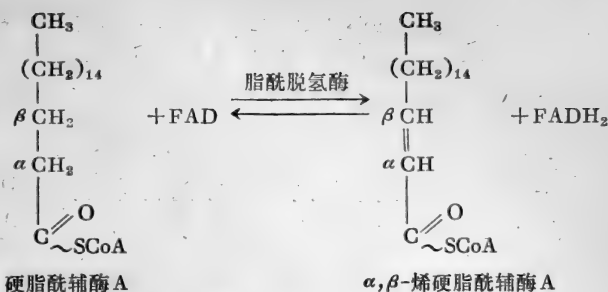
由于 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{S}-$ 中碳硫键是一种高能键。是物质代谢中一种具有特点的键，于是脂肪酸便成为激活状态而易于进入代谢途径。脂肪酸如硬脂酸、棕榈酸、丁酸等何者进入代谢是取决于硫激酶使与哪一个辅酶 A 分子的初步结合。目前已证实至少有四种硫激酶，可以分别激活碳链长短不同的脂肪酸，如：

- (1) 乙酰硫激酶以乙酸为底物。
- (2) 辛酰硫激酶以辛酸为底物，但作用范围为 $\text{C}_4 \sim \text{C}_{12}$ 酸。
- (3) 十二酰硫激酶以十二酸为底物，但作用范围为 $\text{C}_{12} \sim \text{C}_{18}$ 酸。
- (4) 以及可使具有 $\text{C}_5 \sim \text{C}_{22}$ 酸激活化的酶等。

2. 脂酰辅酶 A 的脱氢

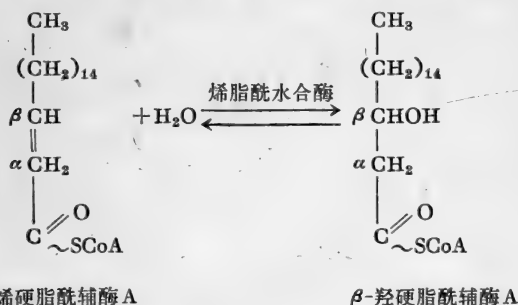
脂酰辅酶 A 在脂酰脱氢酶（脂酰辅酶 A 脱氢酶）的催化下，于 α, β 碳原子上脱氢氧化生成一个双键，称 α, β -烯脂酰辅酶 A。

脂酰脱氢酶象硫激酶一样，对具有碳链长短不同的底物的专一性各不相同，因此可分别催化各种脂酰辅酶 A 脱氢。它们需要 FAD 作辅基，是一种不需氧脱氢酶。



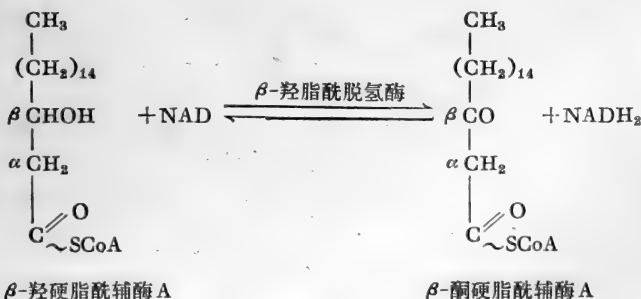
3. α, β -烯脂酰辅酶 A 的加水

α, β -烯脂酰辅酶 A 在烯脂酰水合酶的催化下，加上一分子水。水分子加于双键，氢原子加到 α -位上，羟基则加在 β -位上，这类似于 TGA 循环中延胡索酸水化生成苹果酸的过程。



4. β -羟脂酰辅酶 A 的脱氢

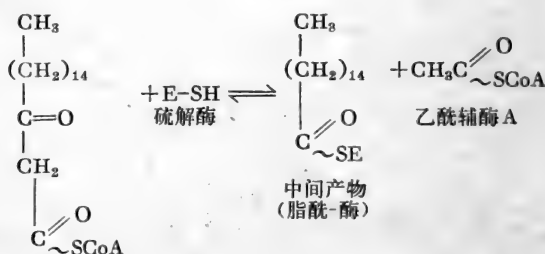
β -羟脂酰辅酶 A 在 β -羟脂酰脱氢酶的催化下，生成 β -酮脂酰辅酶 A。



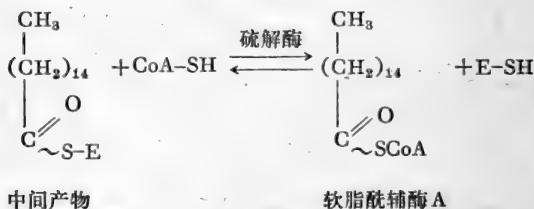
脂肪酸变为 β -酮酸，便于从脂肪酸碳链上切除两个碳原子。

5. β -酮脂酰辅酶 A 的硫解

β -酮脂酰辅酶 A 在 β -酮脂酰硫解酶（简称 硫解酶，它含有一-SH）催化下，同时需要有辅酶 A 存在，裂解生成一分子乙酰辅酶 A 和一个碳链较原来少两个碳原子的脂肪酸。反应分两步完成。



β -酮硬脂酰辅酶 A

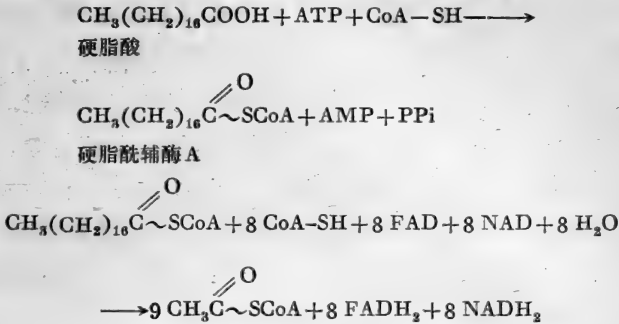


因此，此裂解是一种硫解作用，所产生的脂肪酸是一种活化型的脂酰辅酶 A，可再进入反应 2 继续进行 β -氧化。由于脂肪酸的降解是在 β -碳原子上进行氧化，故称为 β -氧化作用。

β -氧化作用的每一步反应都是可逆的，但反应的平衡大都偏向于分解方面。现将 β -氧化作用总结如图 7-2。

脂肪酸的碳链每经过一次 β -氧化作用，碳链就缩短了两个碳原子，生成一分子乙酰辅酶 A。如此重复反应 2、3、4、5，脂肪酸可以全部氧化成乙酰辅酶 A。

硬脂酸为 18 个碳原子的脂肪酸，需要经过 8 次 β -氧化作用，才能全部降解为乙酰辅酶 A，其反应总结如下：



反应产生的乙酰辅酶 A 可以进入 TGA 循环，彻底氧化成为 CO_2 与 H_2O 。

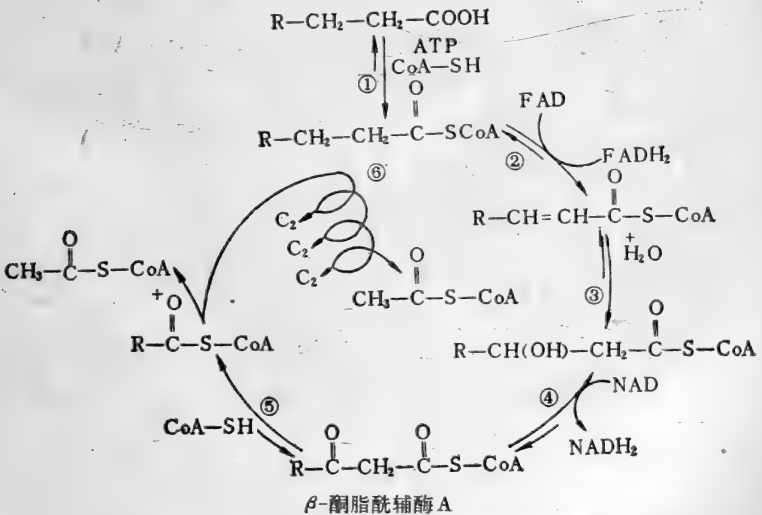


图 7-2 脂肪酸的 β -氧化循环图解

1-脂酰硫激酶 2-脂酰脱氢酶 3-烯脂酰水合酶 4- β -羟脂酰脱氢酶 5- β -酮脂酰硫解酶

对于有生理重要性的各种脂肪酸，包括从甲酸开始，然后是

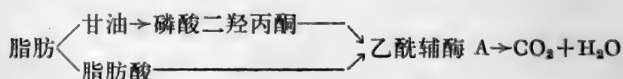
乙酸一直到具有多于 20 个碳原子的直链酸，被认为除了甲酸与丙酸而外，都可经 β -氧化作用而降解。关于奇数碳原子脂肪酸的代谢，如果从 C_9 脂肪酸开始，其步骤似乎相同 ($C_9 \rightarrow C_7 \rightarrow C_5 \rightarrow C_3$)，直至得到丙酰辅酶 A。现有的证据表明丙酰辅酶 A 必须摄取 CO_2 以形成偶数碳原子的琥珀酸，然后才可以被继续代谢。这种 CO_2 固定作用颇为复杂，目前对它也还未了解清楚。

脂肪酸的彻底氧化可产生大量能，一分子脂酰辅酶 A 每经一次 β -氧化作用，产生一分子乙酰辅酶 A，一分子 $FADH_2$ 及一分子 $NADH_2$

乙酰辅酶 A 经 TCA 循环氧化产生	12 个 ATP
$FADH_2$ 经呼吸链氧化时产生	2 个 ATP
$NADH_2$ 经呼吸链氧化时产生	3 个 ATP
<hr/>	
总共产生	17 个 ATP
开始激活脂肪酸时消耗	-1 个 ATP
<hr/>	
净得	16 个 ATP

以后每次重复 β -氧化便不再消耗 ATP，可净得 17 个 ATP，故 1 分子硬脂酸 ($C_{17}H_{35}COOH$) 被彻底氧化时可获得 $(16 + 17 \times 7 + 12)$ ATP，可见能量水平是很高的。

脂肪分解的途径可总结如下：



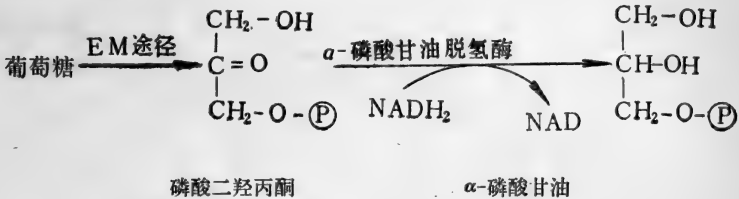
第三节 脂肪的合成代谢

微生物都是利用糖（或乙酸）作碳源来合成脂肪。糖经分解后分别合成 α -磷酸甘油与脂肪酸，然后两者再合成脂肪。

一、 α -磷酸甘油的合成

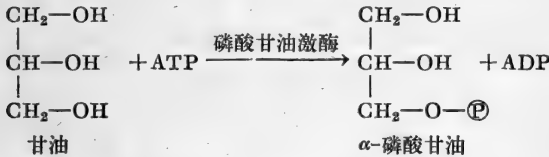
1. 由葡萄糖合成

葡萄糖经 EM 途径降解生成磷酸二羟丙酮，在 α -磷酸甘油脱氢酶的催化下，生成 α -磷酸甘油。



2. 由甘油合成

α -磷酸甘油还可以由甘油生成。



二、脂肪酸的合成

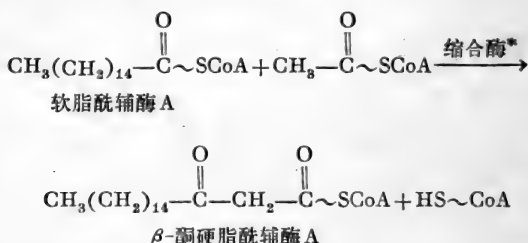
(一) 饱和脂肪酸的合成

生物体内的脂肪酸是由乙酰辅酶 A 所生成。它的合成途径有两条，一条是线粒体酶系合成途径；另一条是非线粒体酶系（细胞浆酶系，存在于细胞的可溶部分中）合成途径。分别讨论如下：

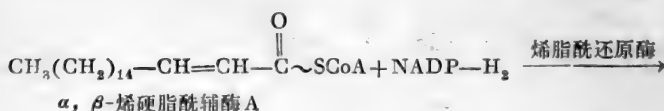
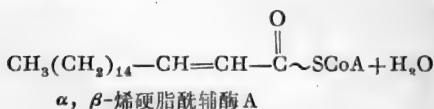
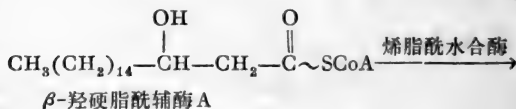
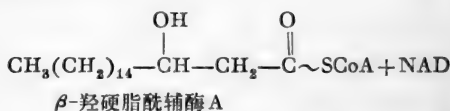
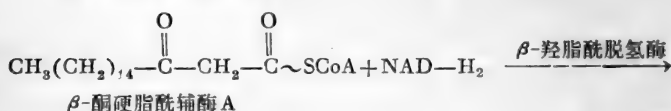
1. 线粒体酶系合成途径

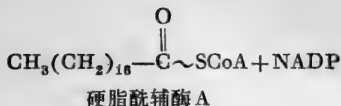
前面已经讨论过，脂肪酸的 β -氧化作用的每一步都是可逆的。在线粒体内含有催化 β -氧化作用的全部酶系统。因此，过去认为可以用乙酰辅酶 A，通过 β -氧化作用的逆反应（ β -还原缩合）而形成脂肪酸。但是通过实验证明，线粒体内 β -氧化酶系统

不能合成长链脂肪酸，而需有新的酶(已经肯定的为 α, β -烯脂酰 CoA 还原酶)及其它辅助因子(如磷酸吡哆醛或磷酸吡哆胺)的参与，才可能进行延长脂肪酸链的合成。因而线粒体酶系的合成途径不是新的长链脂肪酸的合成，而是脂肪酸碳链延长的合成，如软脂酸延长成硬脂酸。其途径如下：



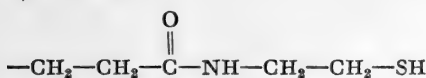
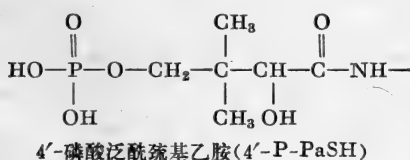
* 可能含有磷酸吡哆醛为辅基。





2. 非线粒体酶系合成途径(又名丙二酰辅酶 A 途径)

早在一九五〇年有人就发现肝细胞上清液可以由醋酸合成长链脂肪酸，并发现 ATP、CO₂、Mg⁺⁺ 及柠檬酸有促进作用，但当时未得到应有的重视。以后不同的学者又从酵母、细菌、昆虫、植物以及其它组织分离出相似的酶系统，说明此系统普遍地存在于各种细胞中。这个酶系统的合成作用发生于细胞质内的一种把所有的脂肪合成酶都装在一个单元里的“多酶”复合体中，称它为“脂肪酸合成酶”。这种复合体是红色颗粒，粒子重量超过二百万。此多酶复合体在理化性质上表现为单一体，而在功能上可以催化一系列的有秩序连续反应，而没有自由的中间产物存在。曾试图从复合酶中分离出各种酶，但都未成功，因为分离出的各种酶都是没有活性的，但当它们聚集成一个多酶复合体时，则可以按秩序地进行反应。在这复合体中起重要作用的酶称酰基载体蛋白(ACP Acyl Carrier Protein)。它的活性中心是 4-磷酸泛酰巯基乙胺，它的结构如下：

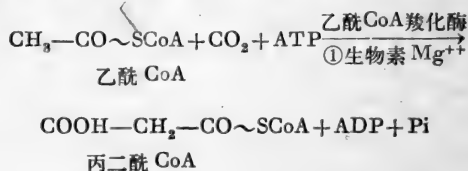


4'-磷酸泛酰巯基乙胺是辅酶 A 生物合成的前体。巯基是酰基载体蛋白上的活性基，它在接受乙酰基和丙二酰基时很象辅酶 A 中的 SH 基那样，能与脂肪酸的-COOH 基以硫酯键相连。在

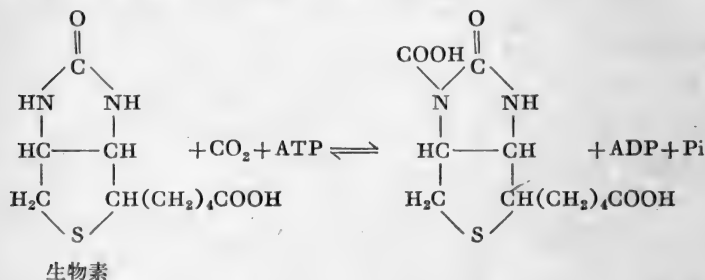
合成长链脂肪酸过程中都是以 AGP 的衍生物呈现。

脂肪酸合成的基本碳源是乙酰 CoA 和丙二酰 CoA。其合成途径如下：

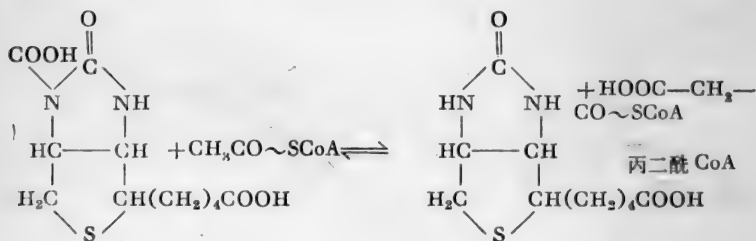
(1) 由乙酰 CoA 形成丙二酰 CoA。乙酰 CoA 在乙酰 CoA 羧化酶 (生物素为辅助因子) 的催化下, 固定 CO_2 而形成了丙二酰 CoA, CO_2 首先被加在生物素上, 然后才转移给乙酰 CoA,



具体过程如下: 在细胞内, 生物素以共价键将它的羧基与羧化酶相连接。羧化作用是分两步进行的, 首先在 ATP 的水解作用下驱使生物素产生反应, 接受 CO_2 。



然后与乙酰 CoA 进行羧化反应, 形成丙二酰 CoA。在这过程中生物素起传递羧基的作用。



在非线粒体酶系合成长链脂肪酸途径中，合成过程常停止在 C_{16} 及 C_{18} 酸阶段，其原因还不清楚，有人认为这与末端呼吸有关。

在脂肪酸合成过程中，乙酰 CoA 作为“引物”，与 $ACP-SH$ 形成乙酰- ACP ，参入脂肪酸的尾端，然后由丙二酰 CoA 产生的 C_2 单位不断地加至“引物”，使链成偶数增长。见图 7-4。

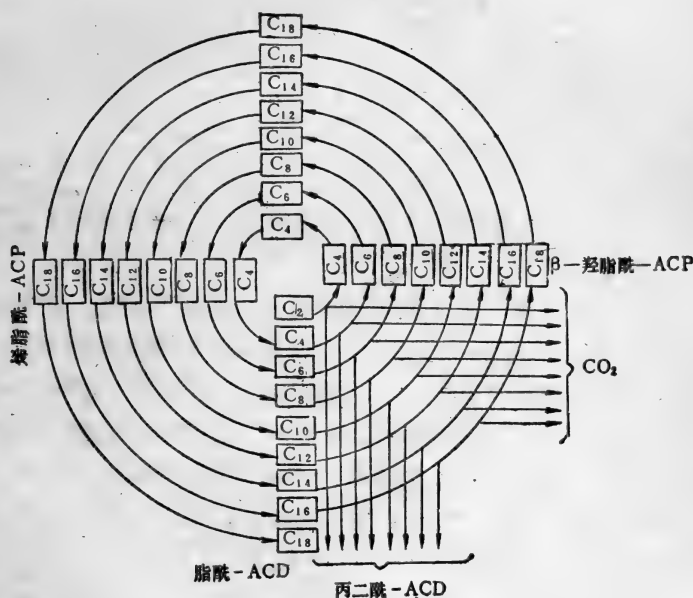


图 7-4 脂酰- ACP 的合合作用

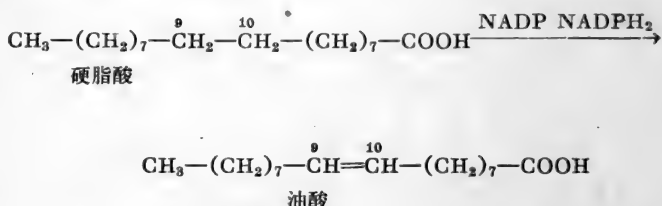
每循环一圈进入一分子丙二酰- ACP ，即使脂酰- ACP 链增长 2 个碳原子，并释放出一分子 CO_2 。

由丙二酰 CoA 为起点合成脂肪酸的途径已被许多研究工作所证实，但合成过程中的某些细节，至今仍有争议，还未作最后结论。

(二) 不饱和脂肪酸的合成

目前对不饱和脂肪酸的合成途径知道甚少，但经有关试验结果，认为低等生物合成不饱和脂肪酸的途径至少有两种：

(1) 是由硬脂酸和软脂酸的氧化性减饱和作用，分别形成油酸和棕榈油酸，是在需氧条件下进行的。此作用的典型特征是把双键引入离羧基第 9 和第 10 碳原子之间。例如酵母在有氧条件下能将硬脂酸氧化减饱和而形成油酸。



许多生物都能使饱和脂肪酸通过此途径形成相应的不饱和脂肪酸。

(2) 取道合成长链饱和脂肪酸的支路或其它途径。在缺氧条件下(如营厌氧生活的梭状芽孢杆菌)合成不饱和脂肪酸时，则利用短的或中等长度的不饱和脂肪酰 CoA 等中间物，如 β -羟脂酰 CoA，经脱水形成双键直接和另一个丙二酰缩合。双键并不象在合成饱和脂肪酸的过程中被还原，而是被保留下来，并随着加进更多的 C_2 单位，双键逐渐从羧基端移开。如由十碳脂酸中间物加上 3 个 C_2 单位，形成棕榈油酸，加上 4 个 C_2 单位，则形成异油酸。为了更确切地说明微生物体中 C_{16} 和 C_{18} 脂肪酸中双键所处的部位，羟脂酰 CoA 中间体脱水成为 β , γ (不是 α , β) 不饱和烯。其形成过程见图 7-5 (289 页)。

同样地，如由十二碳脂酸中间物的延长，加上 2 个 C_2 单位，则形成 9:10 烯十六碳脂酸；加上 3 个 C_2 单位则形成油酸。

许多实验证据表明，生物体中含一个不饱和键的脂肪酸广泛存在，它们是细胞的必要组成。

至于多双键的不饱和脂肪酸，如亚油酸 (十八碳二烯酸)、

亚麻酸（十八碳三烯酸）、二十碳四烯酸等，动物体则不能合成，但微生物体则能合成。尤其是酵母菌它的亚油酸含量很高，并用它来进行实验，表明多双键的不饱和脂肪酸的形成，也象硬脂酸减饱和和形成油酸那样是氧化性的，并证明含有三个双键的亚麻酸是进一步的减饱和和作用所形成的。

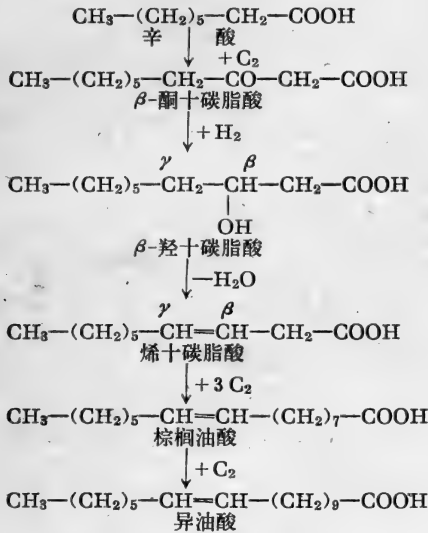
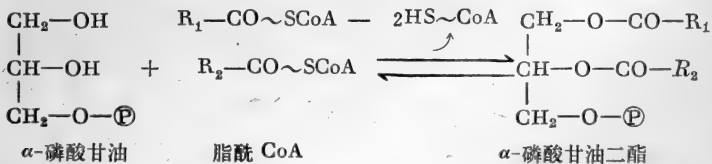


图 7-5 在缺氧条件下由辛酸形成烯酸的机制

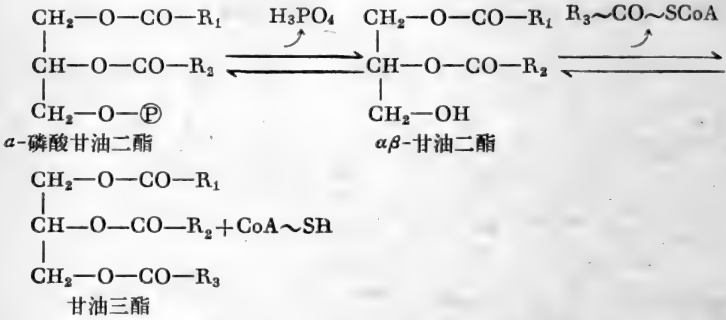
三、脂肪(甘油三酯)的合成

(1) 用于脂肪合成的 α -磷酸甘油，其来源通常是从 EM 途径得到的。在酶的作用下， α -磷酸甘油与二分子的脂酰 CoA 形成 α -磷酸甘油二酯（磷脂酸）。



此过程中酶对于脂酸链的长度并没有很大的特异性，但与 C_{16} 、 C_{18} 脂肪酸的反应特别迅速。

(2) α -磷酸甘油二酯借助于磷酸酶脱磷酸并与另一分子脂酰 CoA 连接成甘油三酯。



所形成的中性脂肪的性质取决于与甘油结合的脂肪酸。

在工业发酵中，培养基组成中的碳源很少用脂类物质，主要用淀粉或其水解产物。而在发酵或培养过程中，微生物菌体组成中的各种脂类都可以形成，因此糖代谢与脂肪生物合成之间有紧密的关系，如图 7-6 所示。

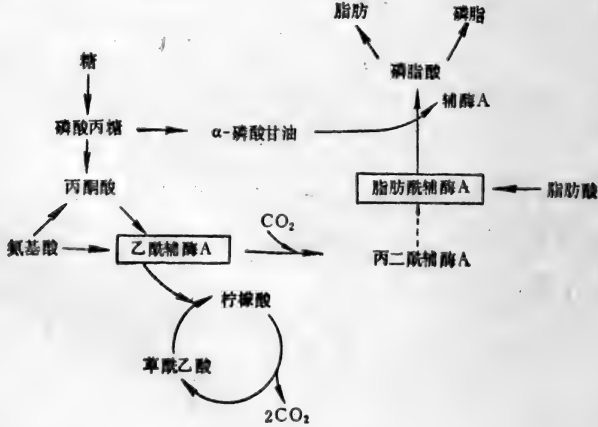


图 7-6 糖代谢与脂肪生物合成之间关系

微生物培养在碳源丰富、氮及磷含量很低的基质中，便可以获得高产量的脂肪。如有的酵母菌(红酵母 *Rhodotrula gracilia*)、霉菌(卷枝毛霉 *Mucor cricinelloides*)的脂肪含量可达干菌体的60%以上。而且它们的脂肪组成中，不饱和脂肪酸的含量甚高(见下表7-4)。因之认为有可能用微生物合成富含某些基本脂肪酸的脂肪，以助解决脂肪供应问题。

表 7-4 酵母、霉菌脂类的脂肪酸组成 (以%计)

脂 肪 酸	斯达氏 脂肪酵母	红 酵 母	构 巢 曲 霉	刺 青 霉 (<i>Pen. Splun-</i> <i>losum</i>)	对 照	
					棕 榈 油	猪 油
肉豆蔻酸 十四烷酸	—	1.5~2.0	0.3	—	1.6	1.3
棕 榈 酸	30	26~29.5	20.9	18.0	32.3	28.3
硬 脂 酸	3.5	1.0~4.5	15.0	11.9	5.5	11.9
棕 榈 炔 酸	6.0	1.5~3.0				
油 酸	55	48~53.5	40.3	43.3	52.4	47.5
亚 油 酸	3.5	8.0~12.5	17.0	21.1	8.2	6.0
亚 麻 油 酸	—	1.0~4.5	0.2	0.3	—	—

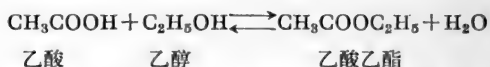
经对由酵母制取脂肪的研究得出，培养基中氮与磷的含量要十分低，才利于得到高产量的脂肪。对红酵母而言 N:C 为 1:66 合适。此外，脂肪合成需大量的氧，因此对菌株强烈通风时能使产量显著提高。经研究，依照理论数值 100 克糖能产生 40 克脂肪，但由于部分糖用于呼吸及构成细胞物质，因此真正的形成量则少于该值。以上这些原则也适用于细菌及霉菌的脂肪形成。

四、酯(低级脂肪酸酯)的合成

低级脂肪酸酯呈特有的芳香气味，是构成酿造产品的芳香性与风味的主要组成。如乙酸乙酯是多种酒的香气成分的主体；而已酸乙酯则为泸型(浓香型)白酒的主体香；丁酸酯则为乳品的芳香成分。

在常温下，酸与醇相接触能缓慢地形成酯，称酯化作用。

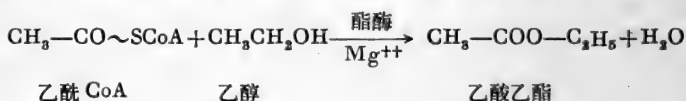
如：



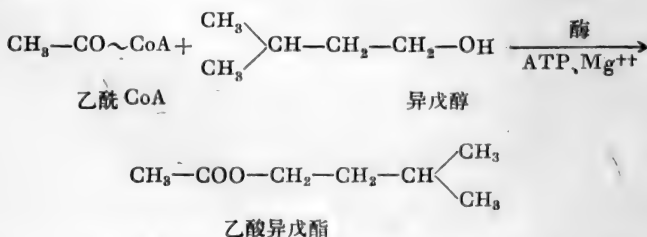
酒类生产，特别是名白酒的生产需经贮存，使酯化作用趋向完全，以提高产品质量。

另外，在酯酶的催化下也能形成酯。酵母、霉菌、细菌中都含有酯酶。但在代谢途径中对酯形成过程的报告很少。

啤酒酵母在厌氧发酵时，在细胞内的酯酶催化下，能由某些低级脂肪酸与醇合成相应的酯。从乙酸直至壬酸和异己酸都可以合成其乙酯，但随着脂肪酸碳链的增长，酯化就越困难。丙酸、异丁酸、异戊酸，也许还有甲酸都未能合成其乙酯。酵母合成乙酸乙酯的能力最强。低级脂肪酸亦与其他醇类，如丁醇、戊醇、异戊醇等形成相应的酯，这些醇来自氨基酸分解代谢。乙酸乙酯的合成途径现认为是由乙酰 CoA 与乙醇形成的，镁离子有促进作用。

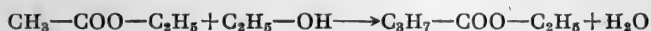


有报道用芽枝孢霉 9 号 (*Gladosporium cladosporioides* No9) 的无细胞提取物，可由乙酸及异戊醇合成乙酸异戊酯，但需加入辅助因子乙酰 CoA、CoA、ATP 及 Mg^{++} ，以促进酯的合成，认为其过程是：



至于己酸乙酯在酵母体内的形成方式，认为先使己酸酰基化

形成己酰 CoA，进而形成相应的酯。亦有人提出梭状芽孢杆菌于酒精培养液中能从乙酸乙酯与乙醇合成己酸乙酯，其总反应如下：



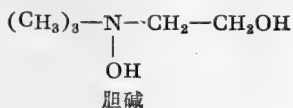
并认为如果以丙酸酯与乙醇为基质，则梭状芽孢杆菌的酯合成的主要产物则为戊酸酯。

酯酶亦称羧基酯酶，亦能催化酯的水解。已从啤酒酵母中制备出。分子量 130000 左右，为二聚体。酵母酯酶的性质是能水解甘油三丁酸酯及各种羧酸酯，但对 Ca^{++} 和 EDTA 缺乏敏感性。最适 pH 6.5~7.0，在 pH 4.4 时，对几种乙酸酯的水解率在 30% 左右，而对癸酸酯的水解平衡点则接近 60%，此酶在 pH 4.4 保温条件下，合成乙酸乙酯的能力甚强。经对不同啤酒酵母进行测定，酯酶活性因菌种而不同，并在啤酒发酵后期，酯含量与酯酶活性表示出一致性。

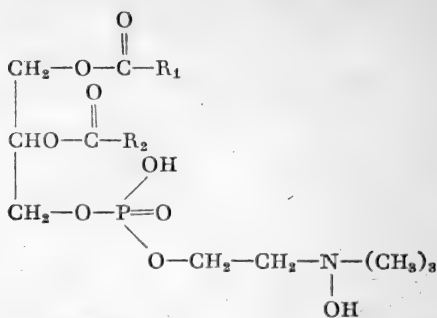
第四节 磷脂及其代谢

一、磷脂的结构与在生物膜中的位置

磷脂也是一种甘油酯，微生物细胞中的磷脂主要是卵磷脂。卵磷脂中的碱性含氮化合物为胆碱。胆碱的结构为：

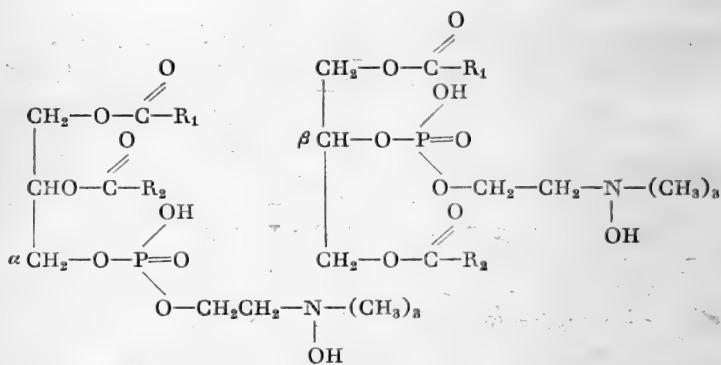


卵磷脂的结构为：



卵磷脂

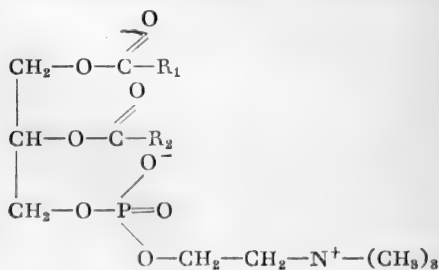
在磷脂中,由于磷酸与甘油上羟基连接位置的不同,而有 α 、 β 两种型式。如:



α -卵磷脂

β -卵磷脂

经研究天然的卵磷脂是 α 型的。以两性离子状态存在。



α -卵磷脂

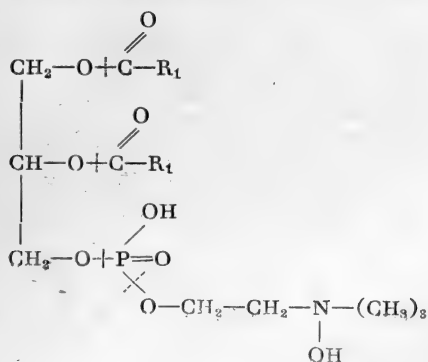
卵磷脂中的胆碱是一种强碱，易溶于水及酒精，而不易溶于乙醚。胆碱在新陈代谢中起很大的作用，如在甲基移换作用中作为甲基供给体。磷脂结构式中 R_1 、 R_2 代表高级脂肪酸的烃基，构成磷脂的脂肪酸有软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸以及十八碳三烯酸与二十碳四烯酸。

磷脂是生物细胞不可缺少的成分。它们通常代表细胞类脂的主要部分，尤其是卵磷脂它是生物膜脂质中的主要组成。磷脂的结构特点是既有非极性的，不带电荷的和脂溶性的碳氢链端；又有一个极性的，易溶于水的、带有正负电荷的氨基和磷酸基，所以它在水溶液内部就很容易形成非极性基向内、极性基向外的双分子层，以维持细胞内外水相和脂相的连续性。脂溶性物质的容易透入细胞膜，是与磷脂的这种性质有关的。现在知道各种生物膜多数是以类脂双分子层做骨架，蛋白质不同程度地插入或附着在这个双分子层的骨架两边，形成所谓“脂质球状蛋白质流动镶嵌模型(见第十二章图 12-34)。

二、磷脂的代谢

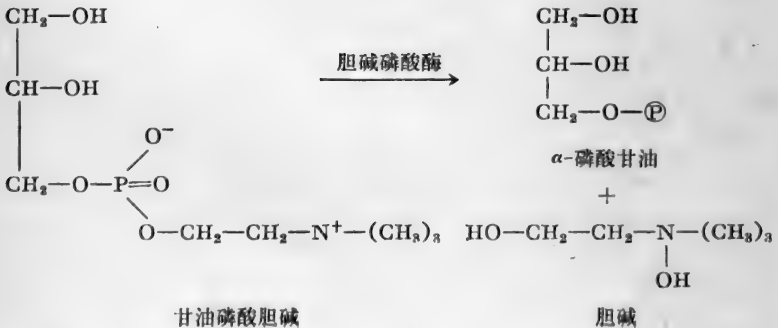
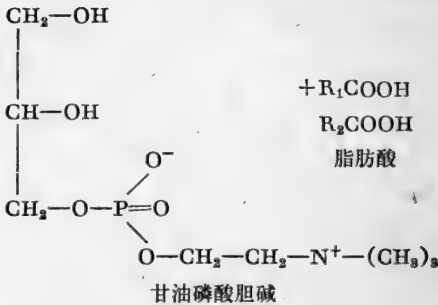
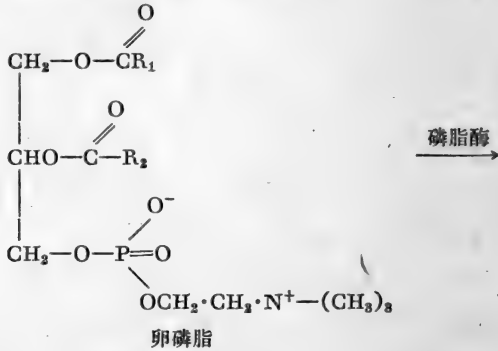
1. 卵磷脂的分解

关于磷脂分解的知识甚为缺乏。卵磷脂在磷脂酶的作用下，先水解成其组成成分高级脂肪酸、甘油、正磷酸和胆碱。

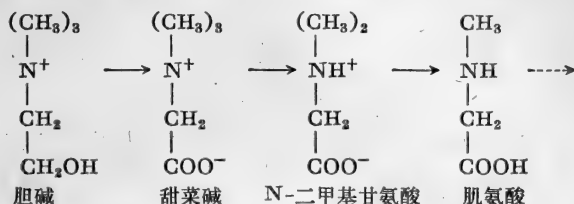


因之，卵磷脂被酶水解的部位如下(虚线表示分解部分)：

在一般情况下，卵磷脂的分解作用是在磷脂酶的催化下水解生成甘油磷酸胆碱二酯和二分子脂肪酸，然后在胆碱磷酸酶的催化下水解出胆碱及 α -磷酸甘油，其过程如下：

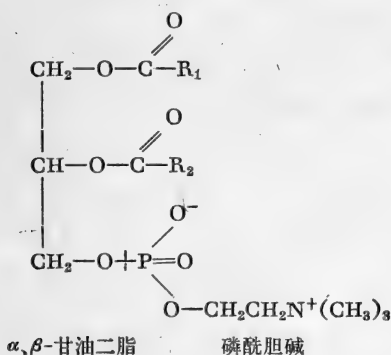


磷脂分解产生的脂肪酸和甘油的代谢，已由前述。分解出的磷酸则可供细胞形成各种磷酸化合物。至于胆碱的分解代谢可经氧化转甲基形成甜菜碱，再去甲基形成 N-二甲基甘氨酸，肌氨酸及甘氨酸的途径进行代谢。简单表示如下：



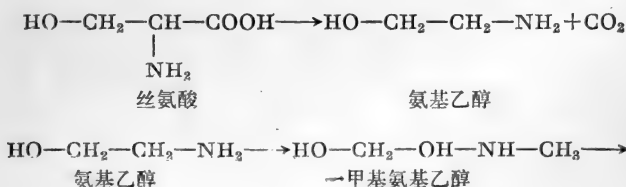
2. 卵磷脂的合成

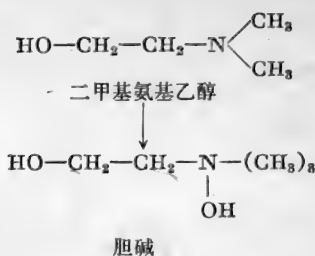
卵磷脂是由 α, β -甘油二酯和磷酸胆碱组成的。



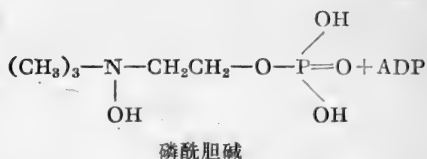
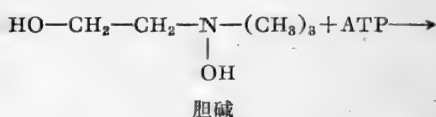
α, β -甘油二酯的合成途径见脂肪的合成。

胆碱的合成来自氨基乙醇(胆胺)的甲基化，氨基乙醇由丝氨酸脱羧生成：



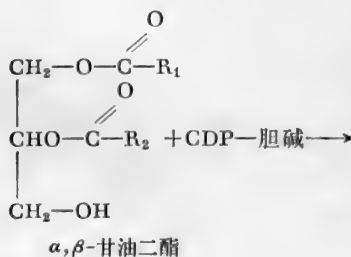


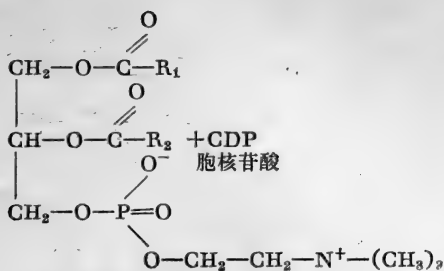
胆碱经胆碱磷酸激酶催化生成磷酰胆碱：



磷酰胆碱和 GTP 作用生成 GDP-胆碱和焦磷酸
 $\text{磷酰胆碱} + \text{GTP} \longrightarrow \text{GDP-胆碱} + \text{PPi}$

GDP-胆碱在磷酰胆碱甘油二酯转移酶的催化下，将磷酰胆碱转移到 α, β -甘油二酯上，生成卵磷脂。





卵磷脂

有些微生物自己不能合成胆碱，必须由外界供给才能生长。

复 习 题

1. 列举脂类的生理功用。
2. 何谓 β -氧化作用？脂肪酸的 β -氧化主要由哪几步化学反应组成？其最终产物为何物？
3. 计算丁酸在体内被氧化成为 CO_2 与 H_2O 时生成高能磷酸键的数目。
4. 硬脂酸 ($\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$) 与十八碳二烯酸 ($\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$, 9:10, 12:13) 在 β -氧化过程中有何差别？它们能否得到相同的产物？
5. 简述饱和脂肪酸的两种生物合成途径。
6. 简述卵磷脂在生物膜组成中的作用。
7. 简述卵磷脂的生物合成步骤。
8. 试从脂肪代谢过程来阐述辅酶 A 在脂肪代谢中的重要性。
9. 试从脂肪代谢及糖代谢过程来分析脂肪与糖相互转变的可能性。

第八章 烃类代谢

烃类又称碳氢化合物，其分子仅由碳和氢两种元素组成。

烃类广泛存在于石油、天然气和煤焦油中，是重要的工业原料和能源。

烃类可分为链烃和环烃两大类。在一定条件下，都可被微生物所利用。因此，在发酵工业中，可以把烃类作为发酵原料。

最近二十年来，在微生物对烃类的代谢方面，进行了大量的研究。随着同位素 O^{18} 的使用和从细胞中萃取酶的成功，使烃类代谢途径、氧化机制等问题，接二连三地得到了阐明。在以烃类为原料的发酵生产方面，已研究成功的有菌体蛋白、氨基酸、有机酸、核苷酸、维生素、酶、脂类、糖类等。但是，由于在发酵时，烃类难于溶解，对氧的要求量大，发热多，同时还存在一些毒性问题。因此，在应用上还受到限制。相信这些缺点，经过研究是能够克服的。

第一节 链烃的代谢

链烃有饱和烃和不饱和烃之分。饱和烃又有正烷烃、异构烷烃之分。它们的代谢途径不同，但却存在共同的特点。

一、基质的特异性

从无数的观察和研究中，人们发现，各种烃类都能被微生物所利用。同时，也发现烃类物质在生物化学方面的显著特点之一是其基质的特异性。

基质的特异性是指由于烃类的结构和性质的不同，所以当它

们用作基质时，有的易被微生物代谢，有的难被微生物代谢，有的只能被一种或几种微生物所利用，而有的却能为许多微生物所利用。例如，甲烷只能被甲烷极毛杆菌、甲烷假单孢菌等甲烷氧化菌所同化，而不能被其它微生物所同化。与甲烷的基质特异性相反， $C_2 \sim C_{16}$ 的链烃可以广泛地被作为基质使用。

日本饭塚等人观察了皱褶假丝酵母中正烷烃的基质特异性，结果发现，偶数碳原子的正烷烃易被氧化，而奇数碳原子的正烷烃较难被氧化。其中，尤其是正癸烷最易被氧化。

对基质特异性的研究进行得不少。但至今也很难得出全面的规律性的结论。一般来说链烃比环烃易氧化；甲烷只能被少数微生物氧化，而丙烷以上的链烃随碳原子数的增加就越易被氧化；正烷烃比异构烷烃易氧化；不饱和链烃比饱和链烃易氧化； $C_2 \sim C_{16}$ 的链烃可广泛地被作为基质使用，尤以 $C_8 \sim C_{16}$ 的链烃使用最多。

研究烃类的基质特异性问题，对于微生物的选育和发酵原料的选用均有普遍意义。它的全面的规律，有待今后进一步研究阐明。

二、正烷烃的代谢

正烷烃是石油中含量最高的成分。利用正烷烃的微生物又是利用烃类微生物中最多的。故正烷烃代谢是烃类代谢中研究得最多的一个方面。

由于烃类分子中没有氧，所以烃类氧化时耗氧较多。

正烷烃的氧化有三种方式。即：(1) 末端氧化；(2) 两末端氧化；(3) 次末端氧化（见图 8-1）。

（一）末端氧化

末端氧化是正烷烃代谢的主要形式。这种氧化是在微生物产生的酶的作用下，使正烷烃一个末端的甲基氧化成伯醇；然后，再氧化成醛和脂肪酸。所生成的脂肪酸经过 β -氧化，一次断下

两个碳原子，生成乙酰辅酶 A，进入三羧酸循环，进而生成各种代谢产物（见图 8-2）。

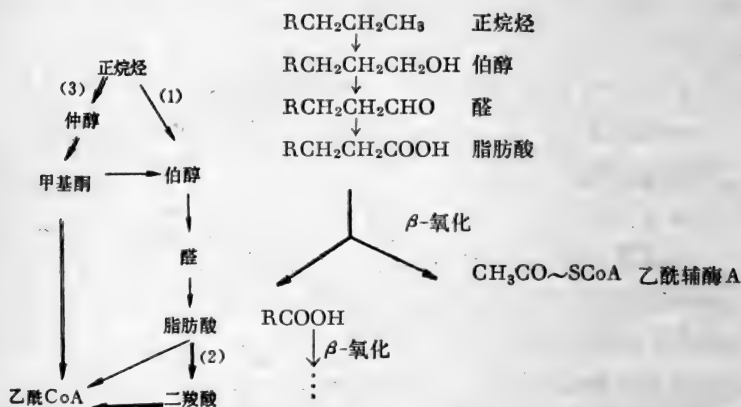


图 8-1 正烷烃代谢途径

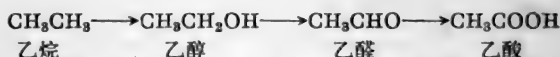
图 8-2 正烷烃的末端氧化途径

由于正烷烃的碳原子数目不同，可分为奇数链和偶数链两种情况。

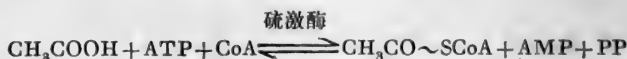
1. 偶数链的正烷烃

经过末端氧化后，生成偶数碳原子的脂肪酸。再经反复 β -氧化，最后全部生成乙酰 CoA。

其中，最简单的偶数链正烷烃为乙烷，乙烷经末端氧化可生成乙酸。



乙酸在 ATP 和 CoA 存在条件下，经硫激酶作用，生成乙酰辅酶 A。



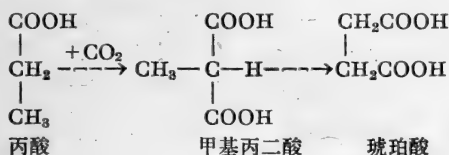
2. 奇数链的正烷烃

经末端氧化生成奇数碳原子的脂肪酸。再经反复 β -氧化，除了生成若干个乙酰 CoA 外，最后剩下一个丙酸。

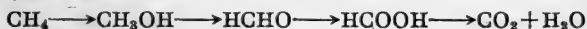
丙烷经末端氧化，也生成丙酸。



生成的丙酸可继续代谢，生成琥珀酸，进入三羧酸循环。进而生成各种代谢产物。



最简单的烃类甲烷，可被甲烷氧化菌同化，经甲醇、甲醛、甲酸，最后被氧化为 CO_2 和 H_2O 。

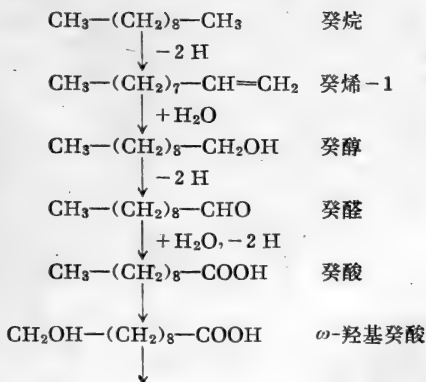


(二) 两末端氧化

一般认为正烷烃的两末端氧化是次要途径。

两末端氧化是正烷烃在末端氧化生成脂肪酸的基础上，另一端的甲基也被氧化而生成二羧酸(二元酸)的过程。

生成的二羧酸，通过 β -氧化，生成若干个乙酰辅酶 A，进入三羧酸循环。其中，偶数碳原子的正烷烃最后剩下琥珀酸，而奇数碳原子的正烷烃最后剩下丙二酸。图 8-3 是皱褶酵母氧化正癸烷的两末端氧化途径。



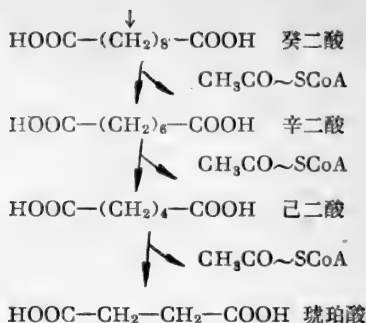
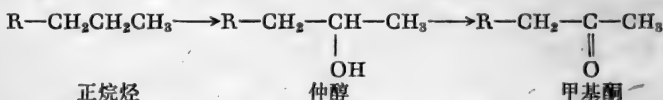


图 8-3 皱褶酵母氧化正癸烷的两末端氧化途径

(三) 次末端氧化

正烷烃的次末端氧化是正烷烃分子的第二个碳原子(次末端)的亚甲基氧化生成仲醇,再氧化生成甲基酮的过程。



生成的甲基酮可分解为二碳化合物和伯醇。二碳化合物转化为乙酰辅酶 A, 进入三羧酸循环, 伯醇则进入末端氧化途径。

正烷烃的次末端氧化只可发生在短链烷烃中, 在十一碳以上的正烷烃中未能看到。

现以正己烷为例, 来说明正烷烃次末端氧化的代谢途径。如图 8-4 所示。

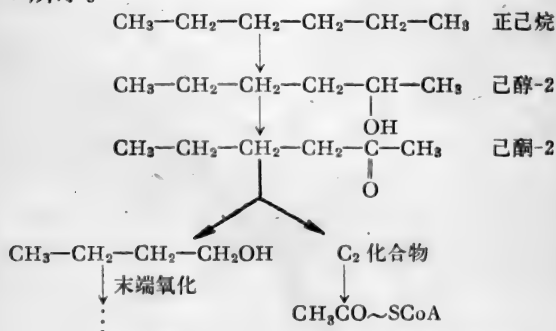


图 8-4 正己烷的次末端氧化途径

三、异构烷烃的代谢

异构烷烃的代谢与正烷烃一样，首先必须经过氧化。但是，微生物对异构烷烃的氧化能力比对正烷烃的氧化能力要差得多。

异构烷烃的氧化有两个特点：

(1) 微生物对异构烷烃的氧化，一般只作用于主链，侧链则很难氧化。

(2) 靠近侧链的一端较难氧化，而远离侧链的一端较易氧化。

现以假单孢菌对 2-甲基己烷的氧化为例，来说明异构烷烃的代谢途径。如图 8-5 所示。

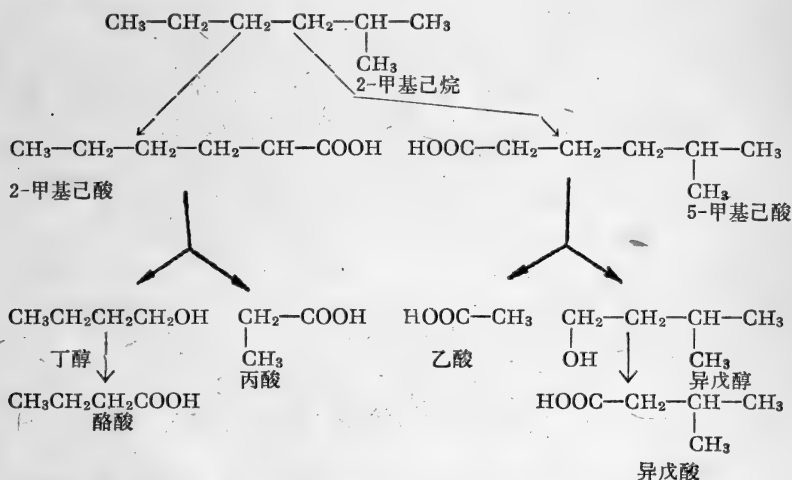


图 8-5 假单孢菌对 2-甲基己烷的氧化途径

四、不饱和链烃的代谢

对不饱和链烃的代谢研究大多集中在烯烃方面。烯烃的绝大部分均能被微生物分解利用。但对于其代谢途径却不如正烷烃那样清楚。

烯烃代谢的主要方式有：(1) 饱和端氧化；(2) 不饱和端氧

化；(3) 水合反应。

现以解脂假丝酵母对十六烯-1 的代谢途径为例，来说明不饱和和链烃的代谢途径。如图 8-6 所示。

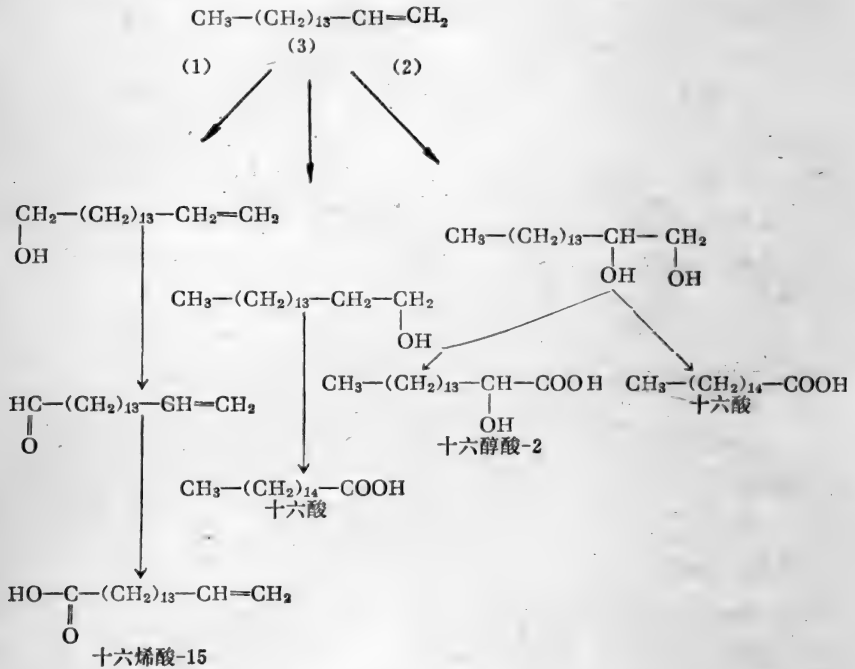
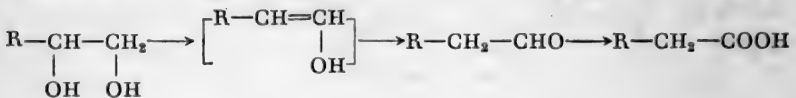


图 8-6 解脂假丝酵母对十六烯-1 的代谢途径

(1) 饱和端氧化烯烃的饱和端的甲基氧化，生成烯醇、烯醛和烯酸。

(2) 不饱和端氧化烯烃-1 的不饱和端的双键氧化生成二元醇。然后，二元醇有两种氧化方式。其一是生成醇酸；其二是生成醛和脂肪酸，过程如下：



(3) 水合反应烯烃-1 在烯烃加水酶的作用下, 双键加水生成伯醇, 再继续氧化, 生成醛和酸。

五、辅氧化作用

如前所述, 微生物对烃类的代谢具有基质特异性。然而, 某些微生物在其能够同化的烃类存在的条件下, 对它本来不能同化的烃类也能进行氧化。这就是辅氧化作用。

例如: 甲烷假单孢菌具有仅能以甲烷或甲醇为唯一碳源的极其严格的基质特异性, 其它物质一概不能同化。但是在有甲烷或甲醇存在的条件下, 却可以将正丙烷氧化为正丙醇、丙酮、丙酸, 将正丁烷氧化成正丁醇、2-丁酮、丁酸等。

还发现, 生长在正烷烃中的诺卡氏菌对环烃也有辅氧化作用。将珊瑚色诺卡氏菌培养在含有正十六烷的培养基中, 添加对-二甲苯, 则可生成对-甲基苯甲酸。这说明正烷烃的氧化酶系对环烃的侧链也能进行氧化。

对辅氧化作用的研究, 使烃类代谢的研究范围更加开阔了。通过采用辅氧化作用, 将有可能生产出更多更有价值的工业产品。

六、烃类的代谢机制

从以上所阐明的烃类代谢过程中, 我们可看到, 固然不同的微生物对不同的烃类有不同的代谢途径, 但是, 它们有一个共同点, 就是首先需要进行羟基化而生成醇(伯醇、仲醇、烯醇、二元醇等)。这就是烃类代谢的机制。现在知道主要有下列三种羟基化类型:

1. 借助单加氧酶的羟基化反应

实验证明, 在能够同化烃类的假单孢菌中, 存在着往基质导入原子氧的单加氧酶, 称为羟化酶。在还原型辅酶 I (NADH_2)、铁离子(Fe^{+++})和分子氧(O_2)存在的条件下, 可将烃氧化为醇。其机制如图 8-7 所示。

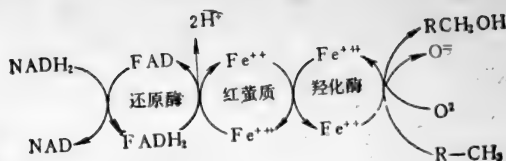
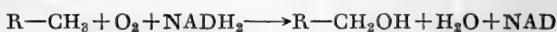


图 8-7 羟化酶对烃类的氧化机制

其总反应式为：



2. 借助脱氢酶和水合酶的羟基化反应

实验证明，在皱褶假丝酵母、铜绿色极毛杆菌、去硫弧菌等微生物中，有烃脱氢酶。在 NAD 存在条件下，能使烷烃脱氢生成烯烃-1，然后在水合酶的作用下，加水生成伯醇。兹把皱褶假丝酵母对正癸烷的代谢机制表示如图 8-8。

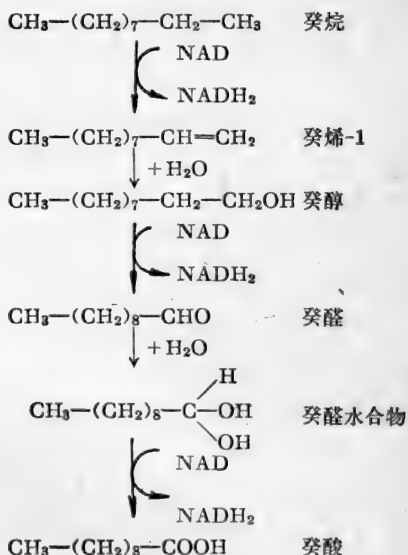
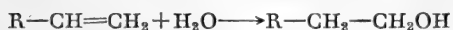
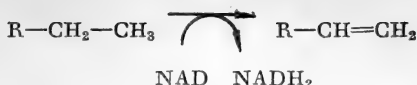


图 8-8 皱褶酵母对癸烷的代谢机制

其总反应式如下：



3. 借助生成过氧化物的羟基化反应

有人鉴定了革兰氏阴性菌氧化十六烷的产物，并用 O¹⁸ 证明了空气中的分子氧直接导入到烷烃中。因此，认为其代谢机制是先形成氢过氧化物，然后再加氢还原为醇。

第二节 环烃的代谢

环烃有脂环烃和芳香烃两大类。比起链烃来，脂环烃和芳香烃都较难被微生物氧化。

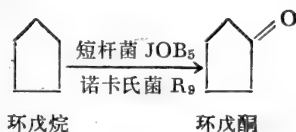
环烃作为发酵原料，可以生产谷氨酸、柠檬酸、反丁烯二酸等产物。但重要性比不上链烃。然而，由于前述的辅氧化作用的存在，可以借助微生物把脂环烃和芳香烃转化为用化学方法难以得到的各种各样的有用物质，在这方面却比链烃更有潜力。

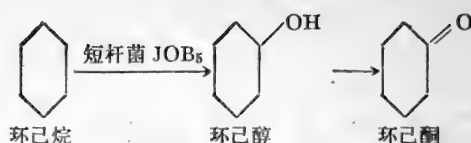
本节主要阐述环烃在微生物作用下，通过氧化及辅氧化作用的代谢途径。

一、脂环烃的代谢

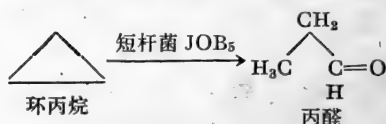
能够利用脂环烃的微生物极其稀少，而且活性弱，氧化能力差。同时脂环烃的代谢还有一个显著特点，就是脂环一般不能作为碳源为微生物所利用，而要通过辅氧化作用，生成环醇、环酮。

例如：

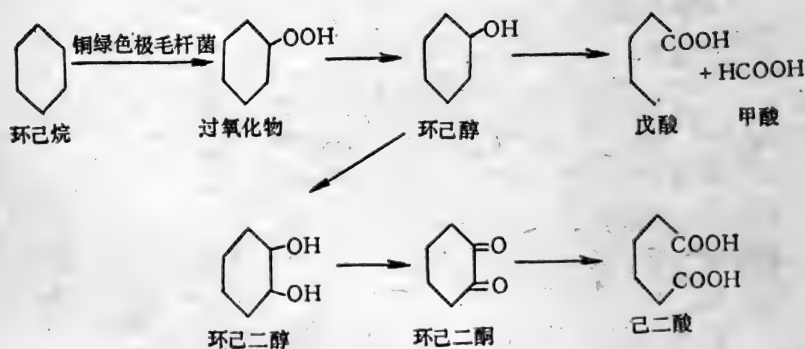




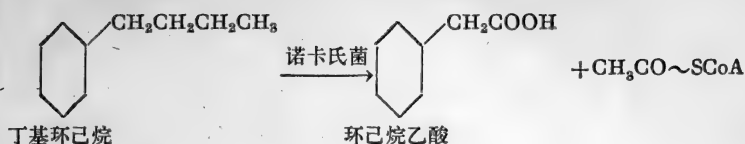
这里使用的短杆菌 JOB₅ 和诺卡氏菌 R₉ 是微生物中已被发现的氧化脂肪烃能力最强的菌株。其中，短杆菌 JOB₅ 能氧化许多种脂环烃。在氧化五碳以上的脂环烃时，任何情况下也未发现环的断开现象。仅在氧化环丙烷时，由于三碳环状物的碳与碳之间的夹角大，而不稳定，所以能使环断开而生成丙醛。



氧化六碳脂环烃的微生物稍多一些。有的还可使六碳环断开。如使用铜绿色极毛杆菌可把环己烷氧化生成戊酸、甲酸、己二酸等产物。其代谢途径如下：



有些微生物能够氧化脂环烃的侧链，氧化方式与正烷烃的末端氧化相同。例如，诺卡氏菌能氧化丁基环己烷的侧链而生成环己烷乙酸。



二、芳香烃的代谢

芳香烃的种类很多，用途非常广泛，微生物对芳香烃的作用也极为复杂。现将其归纳成四类进行阐述。

(一) 苯环的代谢

苯在芳香烃中也是难被微生物同化的物质之一。但由于它是芳香烃的基本骨架，故研究较早。

苯环能为诺卡氏菌、球形小球菌、产气气杆菌、红色分枝杆菌、铜绿色极毛杆菌等多种微生物所分解和利用。而且，其共同特点是首先氧化生成邻-苯二酚。

邻-苯二酚以后的途径有二条(见图 8-9)。

第一条途径是，经己二烯二酸、 β -酮己二酸而生成琥珀酸和乙酰辅酶 A，这是最为普遍的途径。第二条途径是，经过 2-羟基粘康酸半醛，最后生成乙酸和丙酮酸。这些生成物均可进入三羧酸循环，进而生成各种代谢产物。

(二) 萘环的代谢

萘是芳香烃中最容易被微生物代谢的。所以，对它的研究在芳香烃中进行得最多。

萘的代谢过程，首先是氧化生成 1,2-二羟基萘。以后的途径有三条，如图 8-10 所示。

其中，1,2-二羟基萘经水杨醛(邻-羟基苯甲醛)生成水杨酸的途径，是萘环代谢的主要途径。在此代谢过程中，由 1,2-二羟基萘生成邻-羟基苯丁烯酮酸的时候，萘环的断开需有铁离子(Fe^{++})和分子氧(O_2)存在。经过这一步后，代谢主要沿着生成水杨酸的方向进行。当 Fe^{++} 欠缺时，积累水杨酸；而当 Fe^{++} 过量

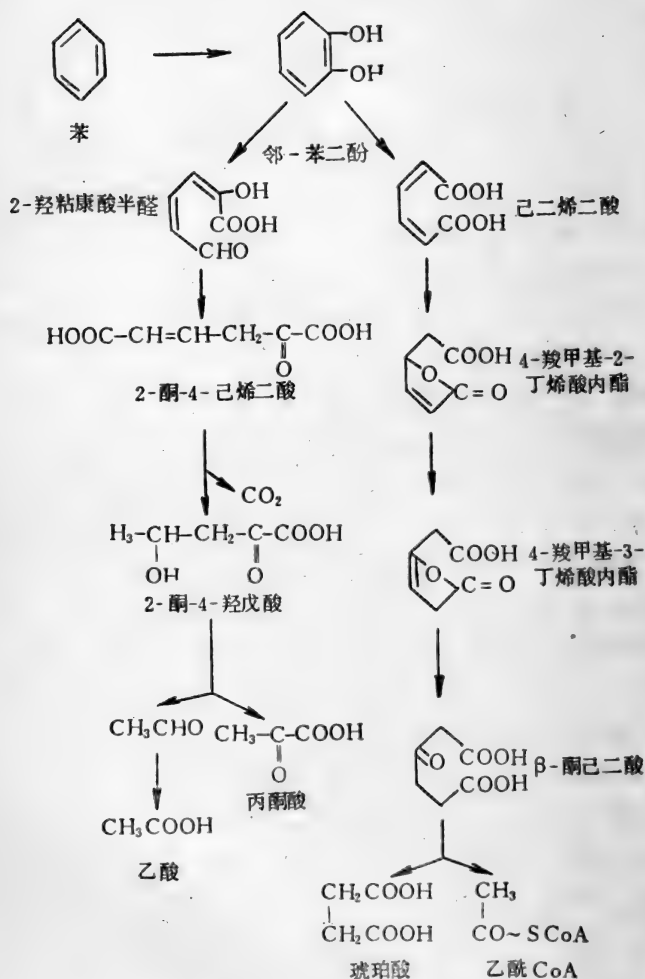


图 8-9 苯环的代谢途径

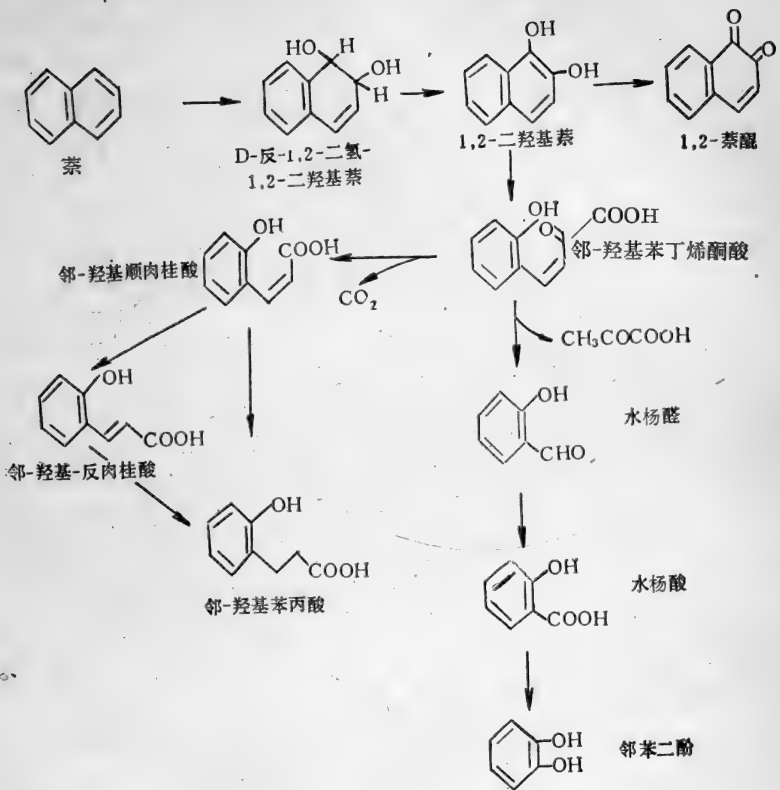


图 8-10 萘的代谢途径

存在时，则水杨酸继续代谢生成邻-苯二酚。若条件适宜，则邻-苯二酚继续按图 8-9 的途径进行代谢。

此外，邻-羟基苯丁烯酮酸也可经邻-羟基顺肉桂酸、邻-羟基反肉桂酸(邻-香豆酸)生成邻-羟基苯丙酸。

在以萘为基质的假单孢菌培养液中，还分离鉴定出 1,2-萘醌，但菌体不能将其继续氧化。

(三) 蒽和菲的代谢

由三个苯核拼合而成的稠环芳烃——蒽和菲，是比较容易被微生物同化的。但由于它们在自然界存在较少，所以对它们代谢的研究较少。

蒽和菲的代谢途径十分相似，代谢结果都可生成水杨酸（见图 8-11）。

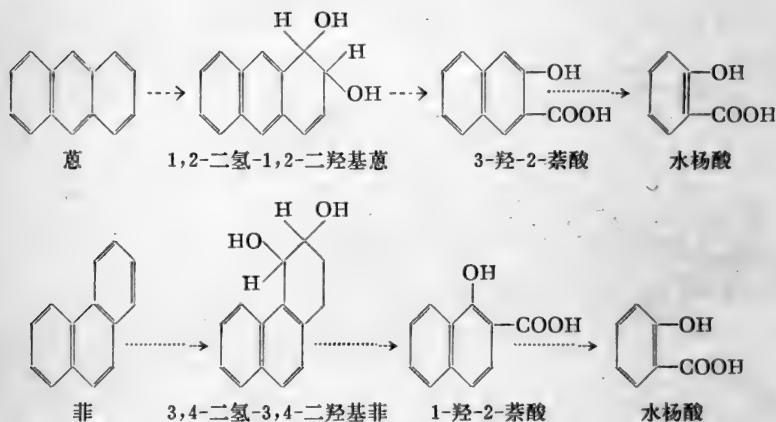


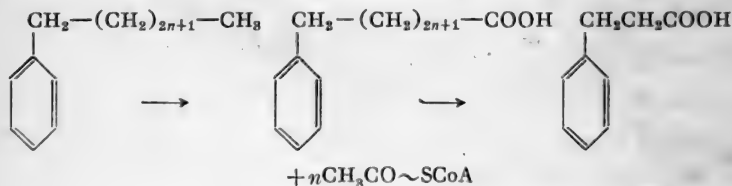
图 8-11 蒽和菲的代谢途径

(四) 有取代基的芳香烃的代谢

这类芳香烃的代谢比较复杂，类型很多，基质特异性强，不同微生物的作用方式也不同。现分三种类型加以阐述。

1. 奇数碳侧链的烷基苯的代谢

奇数碳侧链的烷基苯，在微生物作用下，首先从侧链开始氧化。侧链的烷基按正烷烃的末端氧化形式进行氧化，生成奇数碳侧链的苯甲酸。再经 β -氧化，生成 n 个乙酰 CoA 和苯丙酸。



苯丙烷氧化也生成苯丙酸。

生成的苯丙酸，有两种代谢方式（见图 8-12）：其一，苯丙酸继续氧化生成苯丙烯酸，甚至再氧化生成安息香酸（苯甲酸）。其二，苯丙酸的苯环氧化，生成间-羟基苯丙酸、2,3-二羟基苯丙酸。甚至苯环断开，生成琥珀酸、丙酮酸和乙醛。

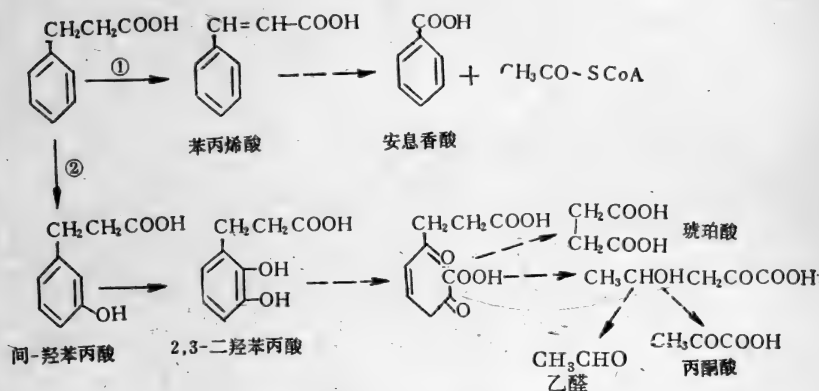


图 8-12 苯丙酸的代谢途径

最简单的烷基苯为甲苯。甲苯的代谢途径有三条：其一，甲苯的甲基氧化生成苯甲醇、苯甲酸，进而氧化为邻-苯二酚或原儿茶酸(3,4-二羟基苯甲酸)。其二，甲苯的苯核上先导入羟基，生成间-甲酚或对-甲酚，继而氧化为原儿茶酚(4-甲基-邻-苯二酚)，然后苯环断开，生成丙酮酸、丙醛和 CO_2 。其三，甲苯的苯核导入羟基，生成间-甲酚，再氧化生成3-甲基-邻-苯二酚，然后苯环断开，生成丙酮酸、乙酸和乙醛。如图 8-13 所示。

2. 偶数碳侧链的烷基苯的代谢

有偶数碳侧链的烷基苯，在微生物的作用下，侧链烷基首先经末端氧化，生成有偶数碳侧链的苯烷酸。再经 β -氧化，生成苯乙酸和 n 个乙酰辅酶A。

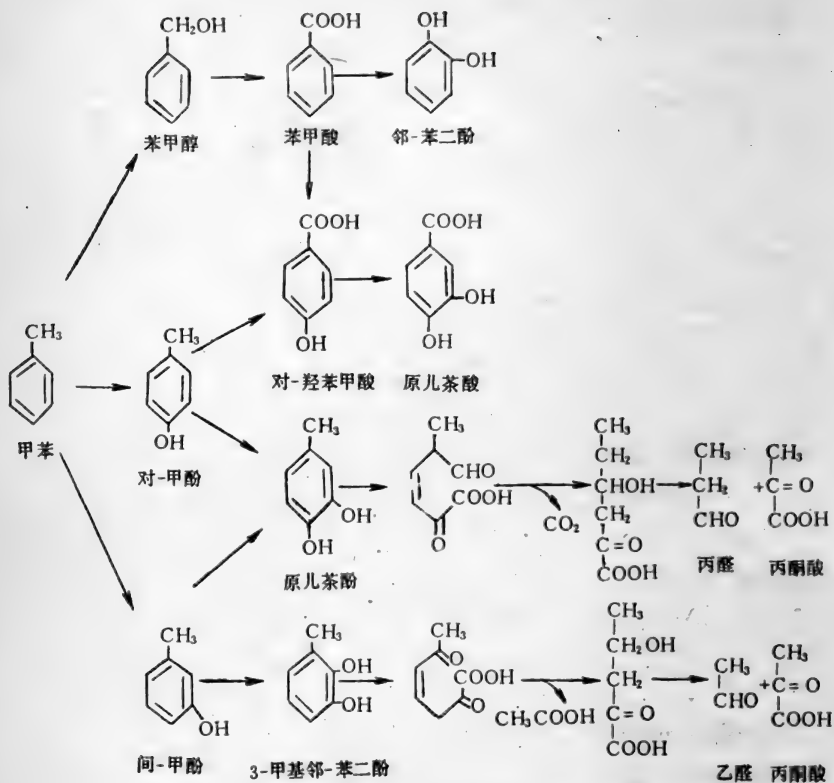
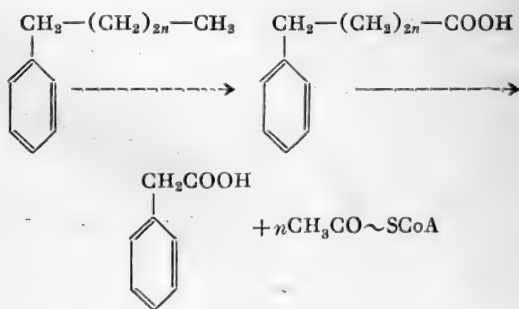


图 8-13 甲苯的代谢途径



乙苯氧化也生成苯乙酸。

生成的苯乙酸，有两条代谢途径：其一是经尿黑酸（2,5-二羟苯乙酸），然后开环，生成乙酰乙酸和延胡索酸。其二是经高儿茶酸（3,4-二羟苯乙酸），然后开环，生成乙酰乙酸和二氧化碳。如图 8-14 所示。

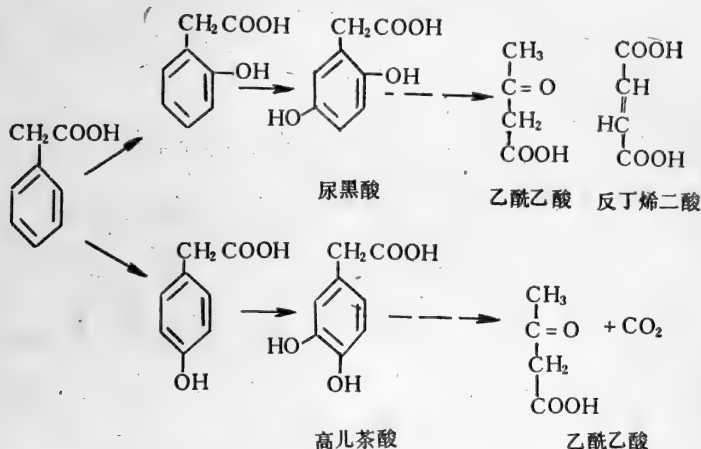
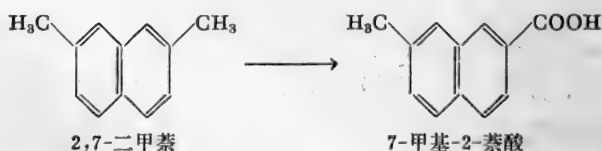
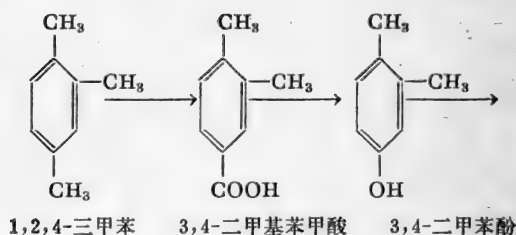
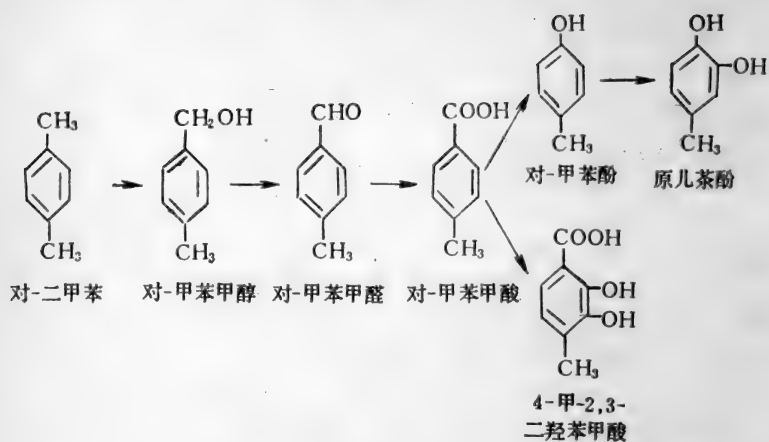


图 8-14 苯乙酸的代谢途径

3. 多甲基芳香烃的代谢

多甲基芳香烃难于被微生物氧化，因此研究较少。一般认为，多甲基芳香烃在微生物的作用下，通过辅氧化作用，其中一个甲基被氧化，而其余的甲基不被氧化。有的在苯核上也可以导入羟基。举例如下：



令人感兴趣的是，微生物对多甲基芳香烃的氧化，具有特别强的基质特异性。例如：诺卡氏菌能氧化对-二甲苯和邻-二甲苯，而不氧化间-二甲苯。又如：珊瑚色诺卡氏菌能氧化 2,7-二甲基萘、2,6-二甲基萘，却不能氧化 1,8-二甲基萘、1,5-二甲基萘。

第三节 石油发酵的生化特点

“石油发酵”是二十世纪五十年代末期开始研究，六十年代得到迅速发展的一门新兴的发酵工业。

“石油发酵”又称为“烃发酵”，是以各种烃类为主要原料，通过微生物的新陈代谢，而生成各种代谢产物的过程。通过石油发酵，能够利用烃类代替粮食，生产菌体蛋白、有机酸、氨基酸、核苷酸、维生素、酶、脂类等各种各样的产物。本节将着重从生物化学的角度，探讨石油发酵的共同特点。

一、石油微生物的菌体成分

凡是能够同化烃类物质的微生物，统称为烃微生物，又叫石油微生物。

石油微生物菌体的化学成分，随着基质的不同而有所变化。与以糖质原料培养的菌体进行比较时，我们发现它们的蛋白质、脂肪、核酸的含量范围几乎相同（见表 8-1）。从这个事实说明，用石油微生物菌体作饲料，甚至食用，从营养的角度来看是完全可行的。因此，石油蛋白的研究和生产普遍受到人们的重视。石油蛋白的特点是赖氨酸的含量丰富，这正是植物蛋白所欠缺的必

表 8-1 石油微生物的菌体成分

菌种	基 质	蛋白质 (%)	核 酸 (%)	脂 肪 (%)	糖 类 (%)	灰 分 (%)
细 菌	碳水化合物	40~80	13~15	1~30	10~30	1~4
细 菌	甲 烷	59.2		6		
细 菌	正 烷 烃	62~73	13~15	10~15	10	6~12
面包酵母	碳水化合物	40~50	5~8	1~2	32~40	6~10
酵 母	正 烷 烃	54	4~10	10	26	8~10

需氨基酸之一。但含硫氨基酸——蛋氨酸、半胱氨酸的含量少。

石油微生物菌体中，碳水化合物的含量比普通微生物的含量低。它一般不含维生素A和C，但含有大量的B族维生素。特别有趣的是，在甲烷同化菌中，含有较高量一般动植物几乎没有的维生素B₁₂（达10毫克/公斤以上）。其蛋氨酸的含量也比其它石油微生物高2~3倍。

石油微生物菌体的元素组成与其它生物体一样。主要含C、H、O、N四种元素，另外还含有S、P、K、Na、Ca、Mg、Fe、I等微量元素。

石油酵母干菌体的元素组成大约为：

C 47% H 6.5% O 31%
N 7.5% 灰分 8%

（以重量百分比表示）

石油细菌干菌体的元素组成大约为：

C 54% H 7.3% O 19%
N 12% 灰分 8.7%

（以重量百分比表示）

二、氧气的需要量

微生物进行好气培养或进行好气发酵时，必须供给氧气。而且微生物只能利用溶解于培养液中的氧气，氧气的溶解度又小，因此必须向培养液中供给大量的氧气。以烃作发酵原料时，由于烃分子中不含氧，故比用糖质原料时需要更多的氧气。

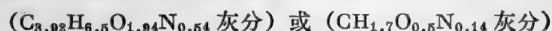
究竟石油发酵所需氧气量与糖质原料发酵的需氧量差别多大呢？这可从理论上进行计算。

在计算前作如下的假设：

（1）以碳水化合物和烃为原料所得到的酵母菌体的元素组成相同。即是：C47%，H6.5%，O31%，N7.5%，灰分8%（重量%）。

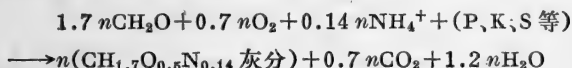
(2) 以碳水化合物为基质时，所得到的酵母菌体对基质的转化率是 50%，而烃类原料的菌体转化率是 90%（重量百分比）。

根据第一个假设，酵母菌体的实验式为：

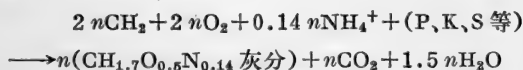


再根据第二个假设，写出反应式如下：

以碳水化合物为基质时：



以烃为基质时：



从以上反应式中可以看到，以碳水化合物为基质时，生产 n 克分子的菌体，需要 $0.7 n$ 克分子氧，而以烃为基质时，则需 $2 n$ 克分子的氧，后者约为前者的三倍。

在发酵生产代谢产物时，以烃为基质的需氧量也是以糖为基质的需氧量的三倍左右。现以谷氨酸发酵为例计算如下：

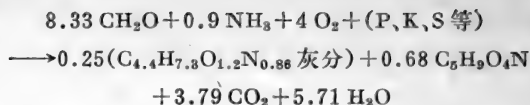
假设：(1) 谷氨酸生产菌的菌体元素组成为 C 53%，H 7.3%，O 19%，N 12%，灰分 8.7%，其实验式为 $(C_{4.4}H_{7.3}O_{1.2}N_{0.86} \text{ 灰分})$ 。(2) 基质的 80% 用于产生谷氨酸，20% 用于长菌体。(3) 以糖为基质时，菌体转化率为 50%，谷氨酸转化率为 50%。(4) 以烃为基质时，菌体转化率为 90%，谷氨酸转化率为 80%（都为重量百分比）。

根据 (2) 和 (3) 的假设，100 克糖可得菌体 10 克和产谷氨酸 40 克。那末，产 100 克谷氨酸和菌体 25 克，则需糖 250 克。

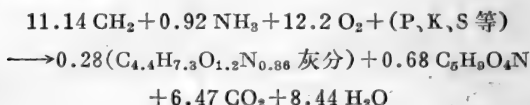
根据 (2) 和 (4) 的假设，100 克烃可得菌体 18 克和产谷氨酸 64 克。那末，产 100 克谷氨酸和 28 克菌体，则需烃 156 克。

列出并平衡其反应方程式如下：

以糖为基质时：



以烃为基质时：



因此，生产 100 克谷氨酸，以糖为基质时，需 4 克分子氧，以烃为基质时，需 12.2 克分子氧，后者为前者的三倍左右。

另外，我们从反应式看到，不论是得到菌体还是得到代谢产物，需氧量均为产物转化率的函数。增加产物转化率，就等于相对地减少了氧的需要量。

要注意的是，以上计算的需氧量为生产一定量产物时的需氧量。切不可与实际上往发酵罐中吹进的氧气总量混为一谈。

三、生物合成热

微生物在生长和发酵过程中所放出的热量，称为生物合成热。

生物合成热在发酵工业方面是很重要的问题之一。它与发酵的好坏成败有密切的关系。尤其是石油发酵，由于发热量特别大，故在发酵设备的设计和工艺操作过程中更需特别注意。

那么，究竟生物合成热有多少呢？现分别以酵母的生长和谷氨酸发酵为例计算如下：

在酵母菌体的生产中，已知干酵母、糖和烃的燃烧热分别为 3.63 千卡/公斤、3.74 千卡/公斤和 11.43 千卡/公斤。

又假设：以糖为基质时，酵母转化率为 50%，以烃为基质时，酵母转化率为 90%（均为重量百分比）。

那么，以糖为基质时，生产 100 公斤酵母，需糖 200 公斤，其生物合成热为：

$$3.74 \text{ 千卡/公斤} \times 200 \text{ 公斤} - 3.63 \text{ 千卡/公斤} \times 100 \text{ 公斤} \\ = 748 \text{ 千卡} - 363 \text{ 千卡} = 385 \text{ 千卡}$$

以烃为基质时，生产 100 公斤酵母，需烃 111 公斤，其生物合成热为：

$$11.43 \text{ 千卡/公斤} \times 111 \text{ 公斤} - 3.63 \text{ 千卡/公斤} \times 100 \text{ 公斤} \\ = 1257 \text{ 千卡} - 363 \text{ 千卡} = 894 \text{ 千卡}$$

从上述计算结果可以看到，同时得到 100 公斤菌体，用烃为基质时放出的热量为以糖为基质时放出热量的 2.3 倍。

在谷氨酸发酵中，已知谷氨酸的燃烧热为 3.70 千卡/公斤。

- 假设：(1) 基质的 20% 用于长菌体，80% 用于发酵谷氨酸。
 (2) 以糖为基质时，菌体转化率为 50%，谷氨酸转化率为 50%。
 (3) 以烃为基质时，菌体转化率为 90%，谷氨酸转化率为 80%
 (均为重量百分比)。

根据(1)和(2)的假设，100 公斤糖可产生 10 公斤菌体和 40 公斤谷氨酸。欲得 100 公斤谷氨酸，则需糖 250 公斤，同时得到 25 公斤菌体。

那末，生产 100 公斤谷氨酸的生物合成热为：

$$3.74 \text{ 千卡/公斤} \times 250 \text{ 公斤} - 3.63 \text{ 千卡/公斤} \times 25 \text{ 公斤} - 3.7 \\ \text{千卡/公斤} \times 100 \text{ 公斤} \\ = 935 \text{ 千卡} - 91 \text{ 千卡} - 370 \text{ 千卡} = 514 \text{ 千卡}$$

根据(1)和(3)的假设，100 公斤烃可生产 18 公斤菌体和 64 公斤谷氨酸。欲得 100 公斤谷氨酸，则需烃 156 公斤，同时得到 28 公斤菌体。

那末，生产 100 公斤谷氨酸的生物合成热为：

$$11.43 \text{ 千卡/公斤} \times 156 \text{ 公斤} - 3.63 \text{ 千卡/公斤} \times 28 \text{ 公斤} - \\ 3.7 \text{ 千卡/公斤} \times 100 \text{ 公斤} \\ = 1783 \text{ 千卡} - 102 \text{ 千卡} - 370 \text{ 千卡} = 1311 \text{ 千卡}$$

从中我们看到，同是生产 100 公斤谷氨酸，用糖为基质时，放出热量 514 千卡，而用烃为基质时，放出热量 1311 千卡。后

者为前者的 2.55 倍。

另外，我们看到，生物合成热和氧气需要量一样，是产物转化率的函数。所以，为了减少发热量，需从提高产物的转化率方面考虑。

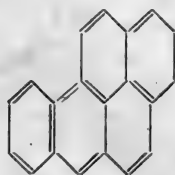
四、毒性问题

六十年代来，石油发酵已引起了人们的重视。国外石油蛋白已完成了试产和毒性试验阶段，有的已建成了年产几千吨乃至几万吨的工厂准备投产。用烃类为原料发酵生产谷氨酸、柠檬酸、 α -酮戊二酸、反丁烯二酸等的转化率已经达到或超过了糖质原料发酵的水平。然而，至今均还未能大规模正式投产。其原因，除了上述的需氧量和发热量特别大，给工艺和设备带来特殊困难外，还有基质的供给、产物的分离与提纯等工艺与设备方面的难题有待进一步研究解决。尤其是作为食品和饲料方面使用的产物，存在着令人关切的毒性问题。

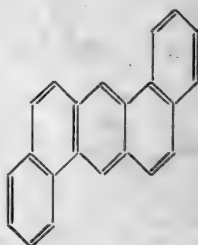
在石油发酵的产物中，有可能存在某些毒性物质。据分析，这些毒性物质主要是从原料中带进的。另外，在微生物的菌体细胞及代谢产物中，也可能存在某些有毒性的物质。

已知十碳以下的脂肪烃和芳香烃对于人和动物都是有毒的。而十碳以上的正石蜡被认为是几乎无毒的烃类。

有些芳香烃，即使是微量，也容易致癌，称之为“致癌烃”。其含量必须严格控制。例如：3,4-苯并芘、1,2,5,6-二苯并蒽等。



3,4-苯并芘



1,2,5,6-二苯并蒽

在辅助原料的添加方面，也必须注意，不要混进有毒的重金属离子和其它有毒物质。

此外，对菌种必须严格地进行选择，对菌体细胞及代谢产物是否有毒性，必须经过长时间的严密的全面的分析试验和世代影响试验。

复 习 题

1. 举例说明正烷烃代谢的末端氧化途径。
2. 何谓辅氧化作用？有何应用价值？举例说明。
3. 研究石油发酵有何意义？存在哪些主要问题有待研究解决？

第九章 氨基酸代谢

第一节 概 述

蛋白质是细胞的首要结构物质，又是酶的基本组成成分。生物体的一切生命现象，无不与蛋白质的活动密切相关。蛋白质的新陈代谢是生物体生长、发育、繁殖和一切生命活动的基础。

体内的蛋白质总是在不断地自我更新，不断地进行分解与合成。生物机体必须从环境中摄取合成蛋白质的原料合成氨基酸，再合成自身的蛋白质，体内的蛋白质也不断地分解成氨基酸，再分解成末产物。所以氨基酸代谢是蛋白质代谢的基础。

蛋白质分子中最主要的元素是碳和氮。机体合成蛋白质时，除了必须碳源外，还必须有合适的氮源。各种微生物合成蛋白质所需的氮源不相同。有些自养微生物如固氮菌能利用空气中的游离 N_2 ，有些自养微生物和异养微生物能利用无机氮，如硝酸盐、铵盐；另一些异养微生物只能利用有机氮，如蛋白质的分解产物，胍、肽及氨基酸。

体内的氨基酸也始终处于动态平衡中，即不断从细胞蛋白质分解而来，又可从食物或微生物的培养基中摄取或经细胞合成。氨基酸又可以分解成酮基酸及氨。糖及脂肪的分解产物也可不断合成氨基酸(见图 9-1)。

在微生物和高等植物细胞中和动物细胞一样，经常存在一个很小的游离氨基酸“库”，这些氨基酸主要用于蛋白质的合成和构成无数重要的其他含氮物质，而较少用于降解。细胞中经常可以同时供应 20 种氨基酸以合成蛋白质。

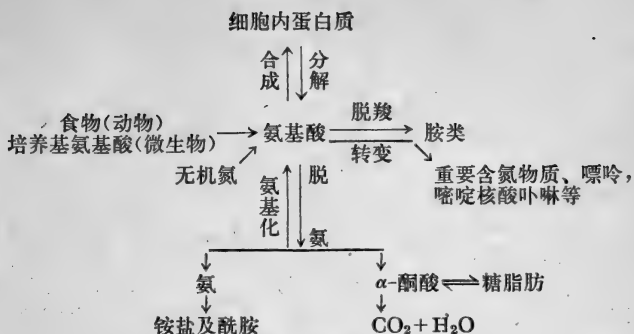


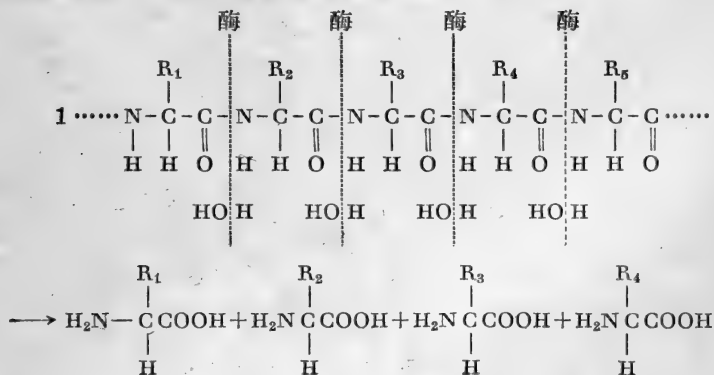
图 9-1 氨基酸的动态平衡

第二节 蛋白质的水解与蛋白质水解酶类

蛋白质是由 20 多种不同的氨基酸相互连接而组成的巨大分子。其分子量大约在 10,000 至数百万,构造极其复杂。蛋白质不能直接进入细胞内部,必须分解成氨基酸后,才能被细胞或微生物菌体利用。

一、蛋白质的水解

蛋白质的水解是在酶的催化下,通过加水分解,使蛋白质中的肽键断裂,最后生成氨基酸的生物化学过程。



蛋白质的水解是放能反应。平衡偏向生成氨基酸的方面。反应所产生的能量不能直接被机体利用，而以热的形式放出。

大分子的蛋白质必须经蛋白质水解酶类的共同作用，才能经过肽、多肽，最后分解为氨基酸。

动物可利用蛋白质作为食物，食物中的蛋白质须经水解成小分子的氨基酸，才能消除特异性，进入细胞，再合成机体本身所特有的蛋白质。

微生物的营养类型与动物不同，一般不能直接利用蛋白质作为营养，但微生物细胞内的蛋白质在代谢时都需要先行水解才能被利用。有些细菌能分解天然蛋白质如：短芽孢杆菌、马铃薯芽孢杆菌、弯组织梭菌，它们能产生胶原蛋白酶，可分解动物的腱、皮肤和结缔组织的胶原蛋白。真菌水解天然蛋白质的能力强，如青霉菌能分解牛奶蛋白质，很多真菌都能水解结晶卵蛋白。细菌中能水解蛋白质的还有变形杆菌、甲型肉毒芽孢杆菌等。放线菌也有分解蛋白质的能力。

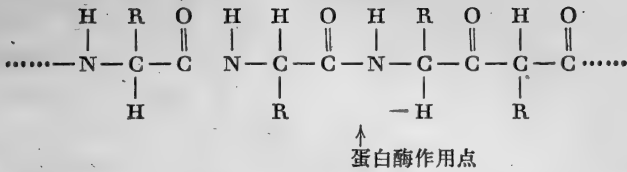
二、蛋白质水解酶类

蛋白质水解酶是水解蛋白质肽键的一类酶的总称。按照水解多肽的方式，可分为内肽酶和端肽酶两类，内肽酶能切开大分子多肽的内部肽键，生成分子量较小的肽、肽等产物。这种酶称为蛋白酶。端肽酶可分为羧基肽酶和氨基肽酶二种，它们分别从多肽的游离羧基端及游离氨基端水解蛋白质释出氨基酸。

(一) 蛋白酶类(内肽酶)

1. 作用方式

蛋白酶是水解蛋白质内部的肽键形成各种短肽的酶，故又称内肽酶。蛋白酶作用最显著的特点是水解肽链中间的肽键，蛋白酶的作用有一定的专一性。不同来源的蛋白酶只能水解蛋白质分子中一定氨基酸所形成的肽键。也就是说对肽键两侧的氨基酸所具有的基团各有不同的要求。细菌、酵母和霉菌含有很多种蛋白酶，



这些酶大都没有充分提纯，酶的作用点及专一性要求尚不清楚。而动物消化腺分泌的蛋白酶的作用机制已搞清楚了。举例如下：

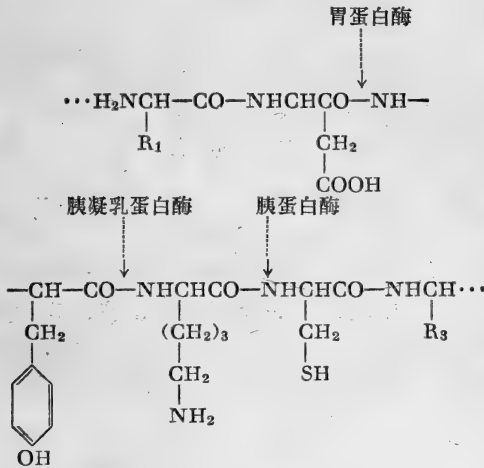


图 9-2 各种蛋白酶的作用点

2. 胞内蛋白酶与胞外蛋白酶

蛋白酶由于分布不同分为(细)胞内蛋白酶和(细)胞外蛋白酶。胞内蛋白酶与细胞内经常发生的蛋白质或酶蛋白分解代谢有关，但它们的性质和作用方式目前仍不清楚。胞外蛋白酶存在于动物及微生物。

微生物合成胞外蛋白酶的能力不一样，因而分解培养基中蛋白质的能力也不同。如枯草杆菌产生明胶酶和酪蛋白酶，能水解培养基中明胶和酪蛋白。而大肠杆菌就没有这两种酶。因此在细菌分类鉴定上，常用以测定这两种酶活性的有无作为一项分类依

据。

微生物合成胞外蛋白酶时必须要有可利用的氨基酸和能源。如将枯草杆菌(具有水解蛋白的能力)接种到无机盐和纯蛋白质作为碳源和氮源的培养基上,细菌并不能生长。因为它不能产生蛋白酶,也就不能利用培养基中的蛋白质。若在培养基中加入少量蛋白胨(多肽混合物)则细菌先利用蛋白胨中的短肽或氨基酸,大量生长繁殖并产生蛋白酶,再分解培养基中的蛋白质。有些微生物如真菌及放线菌只在 Mg^{++} 存在时才能形成蛋白酶。

3. 蛋白酶在工业上的应用

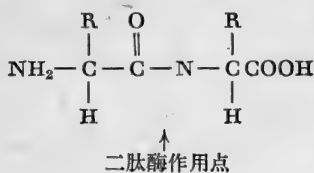
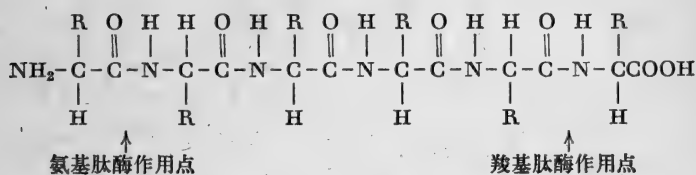
微生物的胞外蛋白酶在工业上应用较多。根据反应的最适 pH,大体可分为酸性(最适 pH 为 3)、中性(最适 pH 为 7 左右)及碱性(最适 pH 为 9.5~10.5)蛋白酶三种。酸性蛋白酶的生产菌是黑曲霉,国内生产菌种有黑曲 3350。中性蛋白酶主要生产菌是枯草杆菌,米曲霉,栖土曲霉。国内生产菌种有栖土曲霉 3942,枯草杆菌 1398,放线菌 166 等。碱性蛋白酶主要生产菌是枯草杆菌、栖土曲霉、米曲霉等。国内生产菌用枯草杆菌 2709、209、289 等三种。

工业上已广泛利用微生物的蛋白酶。例如枯草杆菌和栖土曲霉产生的蛋白酶,已用于天然蚕丝的脱胶。酱油等调味品的酿造是通过微生物蛋白酶及肽酶的作用。使原料中蛋白质水解成氨基酸、多肽及其他含氮碱以提高其鲜味;制革工业中利用蛋白酶水解脱毛,表皮同真皮层联结处的蛋白质,使皮革脱毛;照相胶卷回收也可利用蛋白酶分解感光胶卷上的明胶,使银盐脱落而不损胶卷基片。蛋白酶可增加洗涤剂的功效,增强去污能力,延长织物寿命。在外科医疗上还可用于消除坏死组织、促进伤口愈合。

(二) 肽酶(端肽酶)

肽酶是把肽从一端水解,放出一个氨基酸的酶,故又称端肽酶。肽酶包括羧肽酶、氨肽酶、二肽酶三种。这类酶是水解多肽及二肽的。肽酶也具专一性。羧肽酶是从多肽的游离羧基端开始

水解，逐个切下氨基酸分子。氨肽酶是从多肽的游离氨基端开始水解，逐个切下氨基酸分子。二肽酶是水解二肽为单个氨基酸的酶。

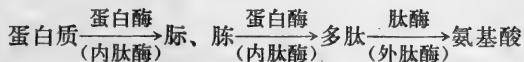


肽酶对氧不稳定，需要有半胱氨酸等还原性物质才能维持活性。

有些微生物只有肽酶，没有蛋白酶，如乳杆菌和大肠杆菌，它们不能水解蛋白质，但可以利用蛋白胨等多肽物质作为碳源，氮源和能源。大部分肽酶需要 Mn^{++} 、 Mg^{++} 、 Co^{++} 、 Fe^{++} 或 Zn^{++} 做为辅助因素。

(三) 蛋白酶和肽酶对蛋白质的水解作用

蛋白酶和肽酶水解蛋白质的过程为



总结以上所述蛋白质水解是经过蛋白酶和肽酶的催化作用。蛋白质水解为蛋白胨、胨、多肽，再继续水解为氨基酸。这就成为可以被吸收的物质。蛋白酶和肽酶的联合催化作用是水解蛋白质、蛋白胨及其他肽类使成为氨基酸的必要条件。水解生成的氨基酸可供微生物代谢活动的需要。在陈旧培养基上，死亡的微生物常呈自溶现象，引起自溶现象的酶也是蛋白酶。这类蛋白酶在

细胞中的作用可能是分解代谢过程中产生的变性蛋白质。当微生物生长在营养物质缺乏的培养基上时，分解代谢超过合成代谢。这类蛋白酶和肽酶就作用于自体的蛋白质而出现自溶现象。

第三节 氨基酸分解代谢的共同途径

蛋白质经水解后生成的氨基酸或微生物从培养基中直接吸收的氨基酸都可以通过共同的途径进行分解代谢。

在 α -氨基酸的分子结构中，除R基团因氨基酸种类不同而有差异外，其余部分则是一切 α -氨基酸（脯氨酸是唯一例外）所共有的，这正是 α -氨基酸的分解代谢都具有共同途径的基础。

α -氨基酸与糖类、脂类的显著区别是它含有 α -NH₂，因此氨基酸分解代谢中必须去掉 α -NH₂基，然后才能进入各类物质代谢的共同通路——三羧酸循环。所以氨基酸分解代谢的主要部分是氨基的脱落，即包括：一、脱氨基作用（一）氧化性脱氨基反应（二）非氧化性脱氨基反应；二、转氨基作用；三、联合脱氨基作用。通过脱氨基作用或转氨基作用，氨基酸被分解成氨和 α -酮基酸； α -酮基酸可经过不同的途径进入三羧酸循环彻底氧化或转变成糖和脂肪。氨可进一步进行代谢。

另外，氨基酸尚有脱羧基作用。氨基酸的酰胺也可以水解产生氨。

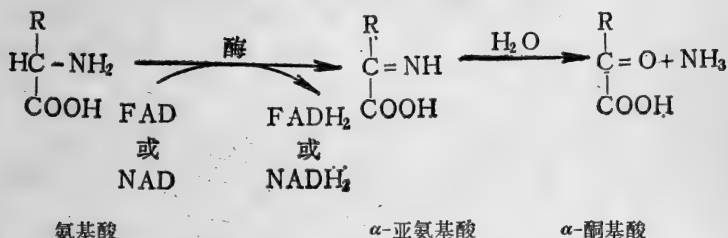
一、脱氨基作用

氨基酸失去氨基的作用称为脱氨基作用（又称脱氨作用）。一般脱氨基作用是氨基酸分解代谢的第一个步骤。氨基酸的脱氨基作用因不同微生物和不同条件而异。一般包括氧化性脱氨基反应和非氧化性脱氨基反应，氧化性脱氨基反应普遍存在于动、植物及需氧的微生物中。非氧化性脱氨基反应多在厌氧，或兼性厌氧微生物中发现。各种微生物具有不同的脱氨方式，说明它们适应

不同环境而具有不同的代谢类型。某些脱氨方式可用于微生物鉴定。

(一) 氧化性脱氨基反应

氨基酸在酶的催化下，经脱氢的方式被氧化成亚氨基酸。所生成的亚氨基酸在水溶液中极不稳定，随即自发水解成酮基酸和 NH_3 (氨)。这种氧化性脱氨基反应只能在有氧下进行，对于绝对厌氧的微生物如梭状菌就不能进行。其反应如下：

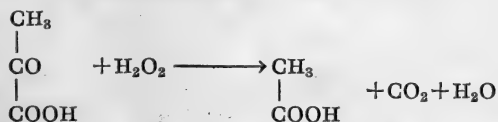


催化氧化性脱氨基反应的酶有二类：一类是氨基酸氧化酶，另一类是氨基酸脱氢酶。

(1) 氨基酸氧化酶是一种黄素蛋白，以 FAD 或 FMN 为辅基，它使氨基酸脱下的氢与分子氧结合成 H_2O_2 。



当有过氧化氢酶存在时， H_2O_2 被分解为 H_2O 和 O_2 。当无过氧化氢酶时， H_2O_2 能氧化丙酮酸生成乙酸：

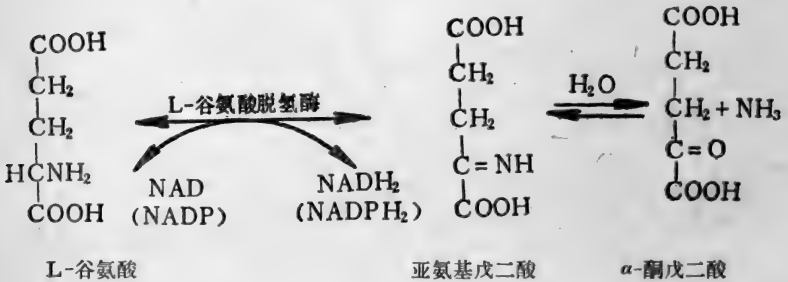


这类酶包括 L-氨基酸氧化酶，D-氨基酸氧化酶和专一性很高的甘氨酸氧化酶等。L-氨基酸氧化酶能催化 L-氨基酸氧化脱氨基。它们的辅基是 FAD 或 FMN 。这类酶分布很广但活性不高。D-氨基酸氧化酶的辅基是 FAD 。

这种氧化脱氨基方式不适用于丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、天

门冬氨酸、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸，它们分别通过脱水脱氨基及氨基酸脱氢酶完成脱氨作用。

(2) 氨基酸脱氢酶属于不需氧脱氢酶。其中活性最强，分布最广，在动、植物、微生物中普遍存在的是 L-谷氨酸脱氢酶，它的辅酶是 NAD 或 NADP。它能催化 L-谷氨酸脱氢脱氨基，生成 α -酮戊二酸，反应如下：



脱氢后生成的 NADPH_2 ，既可经递电子链将 2 H 递交 O_2 生成 H_2O 产生 3 个 ATP (见生物氧化章)；又可参加需要 NADPH_2 的合成反应。

L-谷氨酸脱氢酶在氨基酸氧化脱氨基中占有重要位置，L-谷氨酸脱氢酶和 L-谷氨酸转氨酶 (见转氨基作用) 联合协作即成为体内最主要的联合脱氨基作用。

L-谷氨酸脱氢酶催化的反应是可逆的。当有 α -酮基酸及氨存在时即可经还原性氨基化合成谷氨酸。

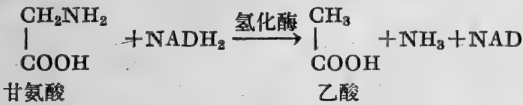
(二) 非氧化性脱氨基反应

除氧化性脱氨基反应外，在微生物体内还进行非氧化性脱氨基反应。例如：还原性脱氨基、脱水性脱氨基、分解脱氨基以及氧化还原偶联脱氨基等反应。

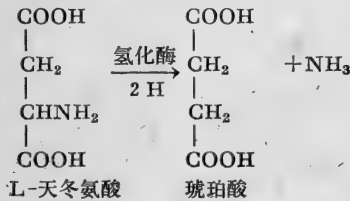
1. 还原性脱氨基反应

还原性脱氨基反应在厌氧条件下进行。此类反应主要发生在

厌氧微生物如梭状芽孢杆菌及一些兼性厌氧微生物中。在氢化酶的催化下，使氨基酸加氢脱氨。如甘氨酸还原性脱氨基生成乙酸（大肠杆菌、荧光杆菌）：

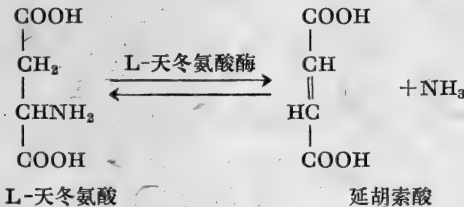


又如天冬氨酸经氢化酶作用还原生成琥珀酸。



2. 分解脱氨基反应

氨基酸直接脱去氨基，生成不饱和酸和氨的反应，即为分解脱氨基反应。如在大肠杆菌内有 L-天冬氨酸酶，能催化 L-天冬氨酸分解脱氨生成延胡索酸和氨。



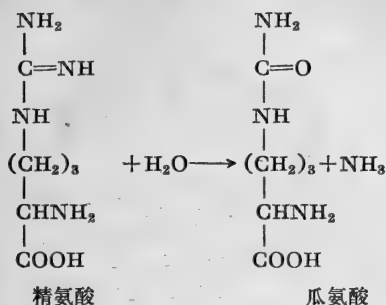
在细菌和酵母中都存在这种脱氨反应。

此反应为可逆反应，也是合成氨基酸途径之一。

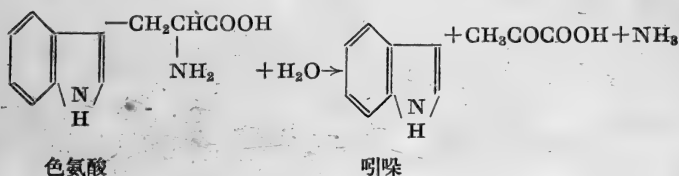
3. 脱水脱氨基反应

L-丝氨酸，L-苏氨酸等含-OH 的氨基酸被氨基酸脱水酶催化生成亚氨基酸，然后再脱去氨基，生成 α -酮基酸及 NH_3 。反应如下：

精氨酸水解脱氨基后生成瓜氨酸：

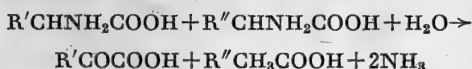


色氨酸水解脱氨基后生成吲哚，丙酮酸及 NH_3 ：



6. 氧化还原偶联脱氨基反应(Stickland)

这是一种特殊的脱氨基方法，需要有两种氨基酸参与反应：一种氨基酸进行氧化性脱氨基，脱下的氢去还原另一种氨基酸使后者发生还原脱氨基，二者偶联进行氧化还原脱氨基。这种脱氨基方式，仅在某些梭菌中发生，酵母也有此反应。其通式可写成：

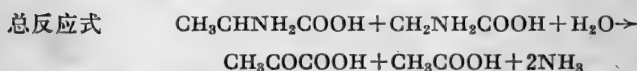
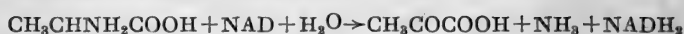


但并非在任意两种氨基酸之间都可以进行此反应，只有供氢体氨基酸与受氢体氨基酸组成对偶时才能进行。有些氨基酸只能作为供氢体，而另一些氨基酸却只能是受氢体。例如：

供 氢 体	受 氢 体
L-丙氨酸	甘氨酸
L-亮氨酸	L-脯氨酸
L-缬氨酸	L-羟脯氨酸

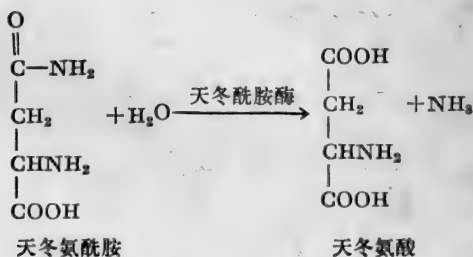
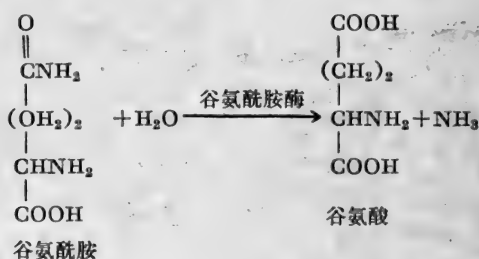
L-苯丙氨酸	L-鸟氨酸
L-半胱氨酸	L-精氨酸
L-丝氨酸	L-色氨酸
L-组氨酸	
L-天冬氨酸	
L-谷氨酸	

丙氨酸与甘氨酸之间的反应：



(三) 氨基酸酰胺的脱氨基作用

动物、植物、微生物体内广泛存在的谷氨酰胺和天冬氨酰胺可经谷氨酰胺酶和天冬氨酰胺酶作用，分别脱氨生成谷氨酸和天冬氨酸。谷氨酰胺酶和天冬氨酰胺酶广泛存在于微生物和动、植物组织中，有相当高的专一性。



谷氨酰胺和天冬氨酰胺是微生物体内氨贮存的形式，当细胞需要 NH_3 以合成氨基酸或核酸时，则由谷氨酰胺酶或天冬氨酰胺酶分解酰胺放出 NH_3 供合成之需。

L-天冬氨酰胺酶是一种重要的抗癌药物，由于它能分解某些肿瘤细胞繁殖所必需的天冬氨酰胺，从而抑制了这些肿瘤细胞的繁殖，但对正常细胞则无损害，因此有抗癌作用。

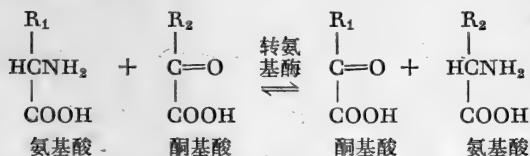
L-天冬氨酰胺酶是由大肠杆菌发酵生产的，它对白血病，急性淋巴肿瘤疗效较好，已在临床得到应用。

二、转氨基作用

(一) 概念

转氨基作用是氨基酸脱去氨基的一种重要方式，由转氨基反应完成。转氨基反应是一个 α -氨基酸的氨基通过转氨基酶的催化将氨基转移到一个 α -酮基酸的酮基位置上，生成与原来的 α -酮基酸相应的 α -氨基酸；原来的 α -氨基酸转变成相应的 α -酮基酸。这反应与脱氨基作用的明显差别在于并没有自由 NH_3 生成。转氨基反应又称氨基移换反应。

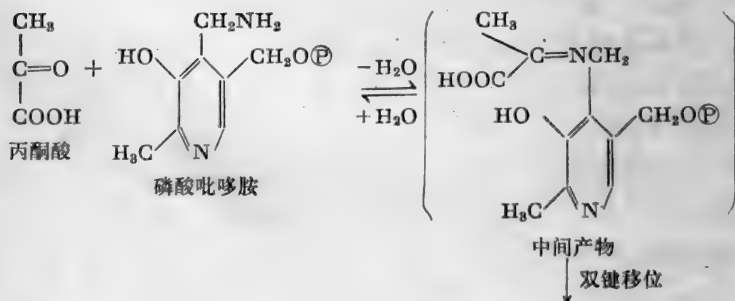
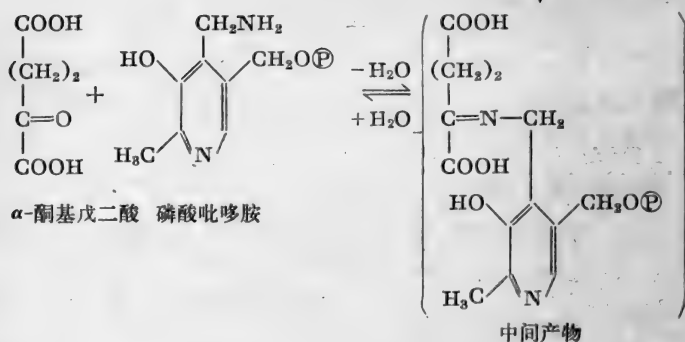
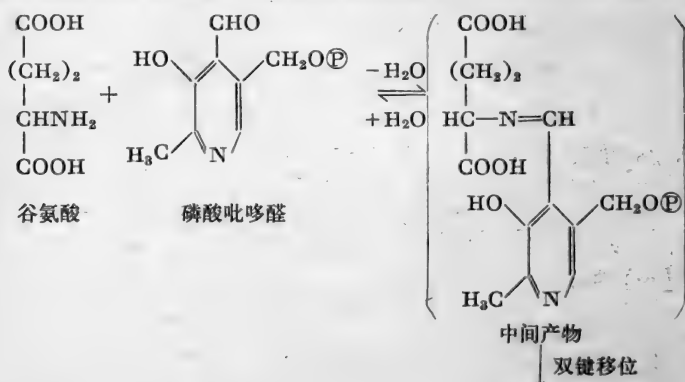
转氨基反应的通式是：

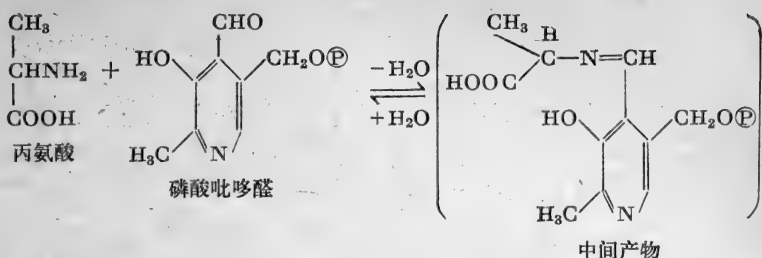


转氨基酶（简称转氨酶）普遍存在于动、植物及微生物细胞中，酶活性较强，专一性高，种类很多。其中活性最大，分布很广的是谷氨酸、丙酮酸转氨酶及谷氨酸、草酰乙酸转氨酶，它们可以分别将谷氨酸上的氨基转移到丙酮酸及草酰乙酸上形成丙氨酸及天冬氨酸。所以转氨基反应既是脱氨基的一种方式又是合成新氨基酸的一种方式。

(二) 转氨机制

转氨酶的辅酶是磷酸吡哆醛或磷酸吡哆胺(维生素 B₆ 的磷酸酯)。转氨酶所催化的反应是可逆反应。转氨酶催化转氨基反应是以辅酶作为氨基(-NH₂)的传递体。现以谷氨酸、丙酮酸转氨酶为例。说明其反应机制。其反应过程如下:





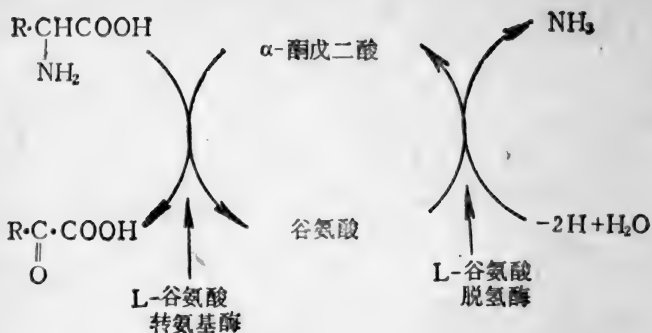
(三) 生理意义

转氨基作用普遍存在于动、植物、微生物，通过转氨基反应，氨基酸可以脱去氨基，酮基酸可以获得氨基。

根据同位素 N¹⁵ 试验结果，除赖氨酸和苏氨酸不参加转氨基反应外，其他氨基酸都可以在不同程度上参加转氨基反应以脱去氨基；但以谷氨酸 α-酮戊二酸的转氨体系最重要。大部分氨基酸都可以与 α-酮基戊二酸起转氨基反应形成 L-谷氨酸；再通过 L-谷氨酸脱氢酶脱氨基，这样转氨基反应就帮助了其他氨基酸脱氨基(见联合脱氨基)。另外通过谷氨酸-α-酮基酸转氨酶体系，其他氨基酸可以通过谷氨酸再变成新的氨基酸，这对氨基酸的合成有重要意义。(见氨基酸合成。)

三、联合脱氨基作用

联合脱氨基作用是一种间接脱氨基作用。由转氨酶与 L-谷氨酸脱氢酶联合作用进行脱氨基。其过程是 α-氨基酸先与 α-酮戊二酸起转氨基作用，形成谷氨酸，再经谷氨酸脱氢酶的作用进行氧化性脱氨基。由于 L-氨基酸氧化酶活性弱而转氨酶、L-谷氨酸脱氢酶活性强，因此推想细胞内大部分氨基酸可能通过间接脱氨基方式脱去氨基。事实证明细胞中 L-氨基酸的脱氨基作用很慢，当加入少量 α-酮基戊二酸，则脱氨作用明显增加。联合脱氨基作用也是微生物大部分氨基酸脱去氨基的重要方式。脱氨机制如下：

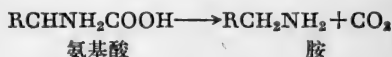


四、氨基酸的脱羧基作用

(一) 概念

氨基酸降解的另一途径是脱羧作用。

氨基酸的脱羧作用是氨基酸经脱羧酶类催化，脱去羧基，生成相应的胺和 CO_2 的反应。通式如下：

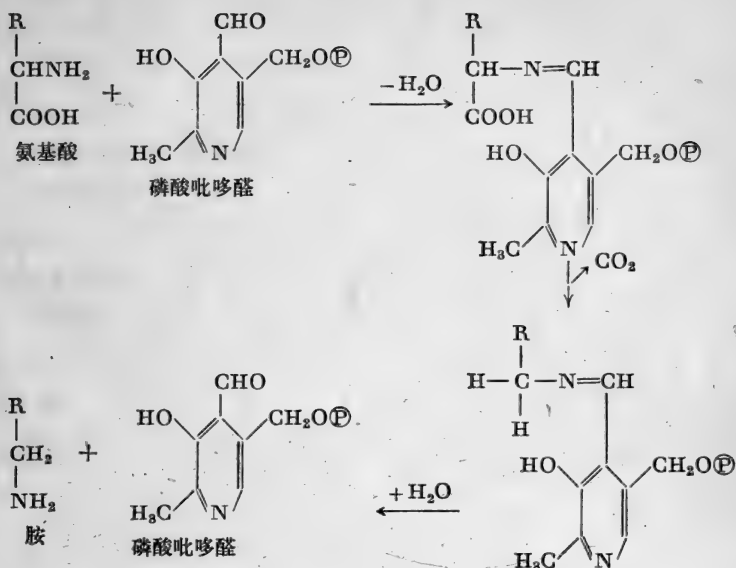


脱羧酶存在于动物、植物、微生物中。

脱羧酶的专一性很高，一般都以磷酸吡哆醛作为辅酶。

(二) 脱羧机制

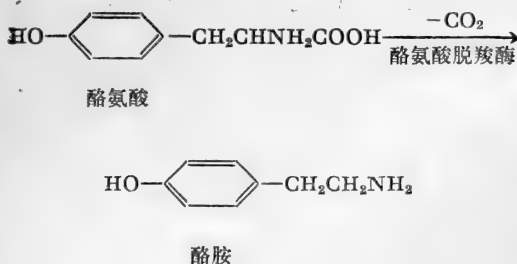
氨基酸脱羧时氨基酸先与辅酶结合，再脱去羧基，反应机制如下：

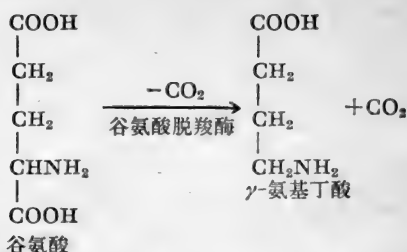


(三) 微生物的氨基酸脱羧基反应

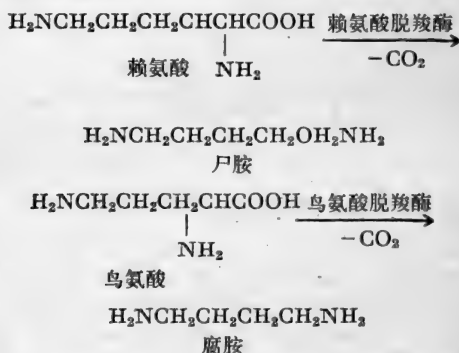
微生物的氨基酸脱羧反应较多，可形成多种胺，但氨基酸的脱羧基反应并不是氨基酸代谢的主要方式。一般脱羧酶都是诱导酶，即要有相应的氨基酸存在时，才能形成相应的脱羧酶。不同微生物所含脱羧酶的种类也是不同的。这种特性可以帮助鉴别肠系菌各属细菌。

含有一个氨基的一元氨基酸脱羧后产生一元胺。例如：





含有二个氨基的二元氨基酸脱羧后生成二元胺(二胺)。此类胺对人有毒性。当肉类蛋白质腐败,经细菌脱羧酶的作用即产生尸胺、腐氨后,对人有毒性,即不能食用。这种反应在腐败梭菌、米曲霉生理活动中都存在。



一元胺、二元胺有臭味,为碱性。在发酵后期菌体自溶,氨基酸进一步降解、脱羧后生成胺,使pH上升,并有臭味产生。在酶制剂生产过程中,即有此种现象发生。

在某些微生物中(如大肠杆菌)的脱羧酶含量往往随培养基的pH而变化。在含有氨基酸而偏酸性的培养基中,脱羧酶含量往往增加。由于脱羧产生碱性的胺,可以调整培养基的pH值,有利于微生物的生长。同样情况在含氨基酸而又偏碱性的培养基中,脱氨酶的活性往往升高,脱氨后产生的 α -酮酸可以调整培养基的pH值。这是微生物进行代谢自我调节方式之一。

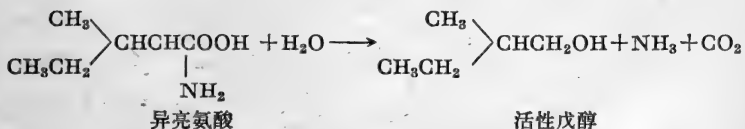
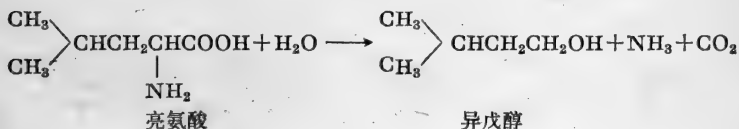
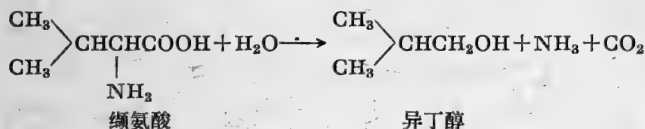
由于氨基酸脱羧酶的专一性很强,故可用来测定氨基酸的含

量。在谷氨酸发酵生产中，利用大肠杆菌脱羧酶的作用，于样品中加入谷氨酸脱羧酶，由瓦氏呼吸计测出所释放 CO_2 的量，即可算出谷氨酸的含量。

(四) 氨基酸的脱氨基、脱羧基反应

在有些微生物如细菌或酵母细胞中，能进行加水分解，同时进行脱氨基与脱羧基，生成少一碳原子的第一醇、 NH_3 和 CO_2 。

当缬氨酸进行加水分解，同时进行脱氨基和脱羧基时则生成异丁醇。当亮氨酸和异亮氨酸进行同样的脱氨基和脱羧基反应则生成异戊醇及活性戊醇。这就是酒精发酵时(包括各种酒类发酵)生成杂醇油的机制。杂醇油是指某些高级醇(如正丙醇、异丁醇、异戊醇、活性戊醇等)的混合物。

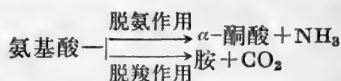


酒类酿造中生成微量高级醇芳香成分。这些高级醇芳香成分，大多来自支链氨基酸的加水脱氨又脱羧反应的产物。

酒类都含有微量高级醇芳香成分。一般白酒含量较啤酒高。每升白酒中含量可达 1000 毫克以上，以异戊醇为主；每升啤酒中约含 100 毫克，其中以异戊醇和活性戊醇为主。

第四节 氨基酸分解产物的代谢途径

氨基酸经过脱氨基作用。脱去氨基生成 α -酮酸和 NH_3 ，或经过脱羧作用生成胺和 CO_2 ，这些分解产物可进一步参加代谢。



一、 α -酮基酸的代谢

氨基酸脱氨基后所产生的 α -酮酸进一步代谢。可有下列三种代谢途径：合成新氨基酸；氧化成二氧化碳和水；转变成糖和脂肪。

(一) 合成新氨基酸

α -酮酸可经还原氨基化作用或转氨基作用形成新的氨基酸（见氨基酸的生物合成）。

(二) 氧化成 CO_2 及水

氨基酸脱氨后形成的酮基酸，以几种不同的途径进入三羧酸循环，最后氧化成 CO_2 和 H_2O 。大部分氨基酸可通过形成丙酮酸转变成乙酰 CoA，再参加三羧酸环（如丙、半胱、甘、丝、苏等氨基酸）；有些直接形成乙酰 CoA 再参加三羧酸循环（如异亮、亮、色等氨基酸）；有些氨基酸可转变为三羧酸循环的中间产物如 α -酮戊二酸，琥珀酰 CoA 和草酰乙酸等然后参加三羧酸环（如谷氨酸转变成 α -酮戊二酸，天冬氨酸转变成草酰乙酸）。现将氨基酸生成的酮基酸进入三羧酸循环的途径表示如图 9-3。

在植物及酵母中，一部分酮基酸还可先脱羧变成醛，经氧化成脂肪酸，最后分解成 CO_2 和水。

(三) 转变成糖及脂肪

大多数氨基酸脱氨后生成的 α -酮酸，能通过生成丙酮酸，再

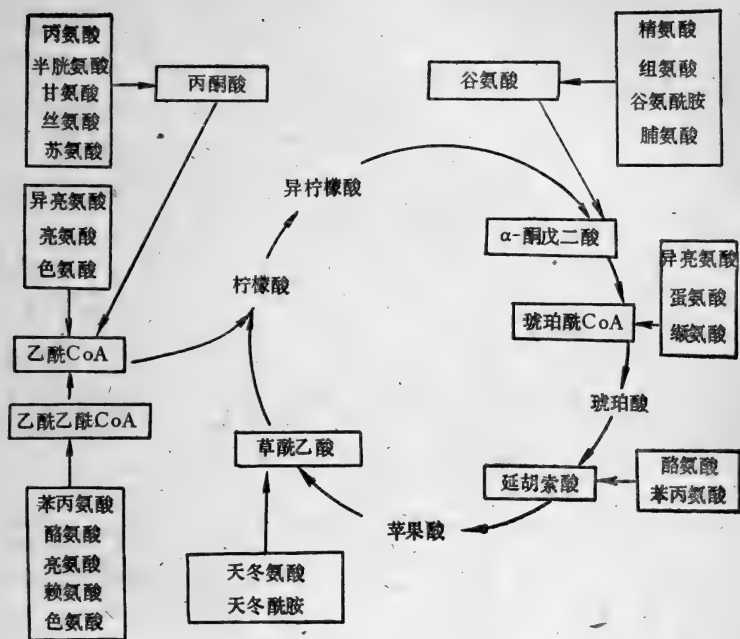


图 9-3 氨基酸的碳链进入三羧酸循环的途径

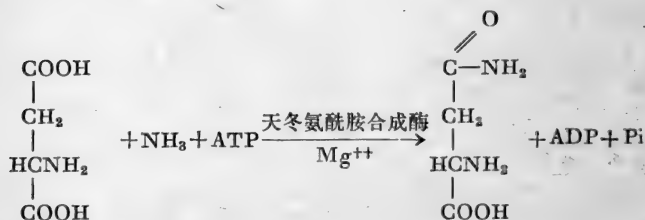
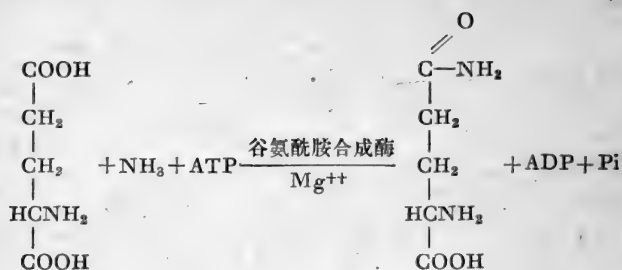
经糖元异生的过程合成糖。少数氨基酸生成的 α -酮酸能氧化成乙酰 CoA 然后合成脂肪。

二、氨的代谢

游离的氨对生物体是有毒害的，所以在正常情况下，在体内游离氨并不积累。游离氨形成后立即进行代谢，其方式主要有以下几种：

(一) 酰胺形式贮存

氨在谷氨酰胺合成酶或天冬氨酰胺合成酶的作用下可转移到谷氨酸、天冬氨酸上形成酰胺，储以备用。

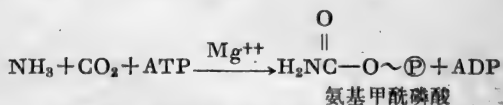


储在酰胺基上的氨基可用于合成新的氨基酸或其他含氮化合物如嘌呤、嘧啶、核苷酸等。酰胺也可以直接参与蛋白质的合成。

(二) 合成新氨基酸(见氨基酸的合成)

(三) 合成氨基甲酰磷酸

氨基甲酰磷酸是合成嘧啶、瓜氨酸、精氨酸和尿素的重要代谢物。它是由氨基酸脱下的 NH_3 与 CO_2 (可由 TGA 环供应) 在 ATP 参与下, 按下列反应生成:



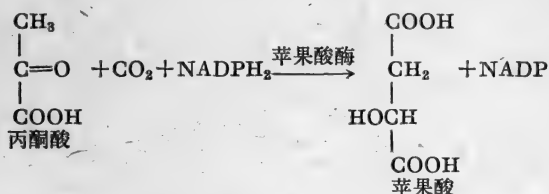
这反应在多数微生物中是由氨基甲酰磷酸激酶催化。由于生成氨基甲酰磷酸具有高能键, 因而是微生物能量代谢的重要高能化合物之一。氨基甲酰磷酸的合成是无机氮合成有机含氮物的重要反应。因此是同化氮的重要途径之一。对于植物及微生物来说是保留氮的重要方式。

(四) 形成尿素

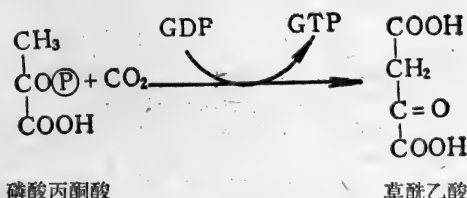
尿素是动、植物、微生物蛋白质代谢的一种产物；在哺乳动物中尿素形成后即排出体外，在动物尿素形成是一种重要的解毒方式。植物及微生物特别是真菌也能形成尿素，但其作用为贮备 NH_3 ，以供合成之需。尿素合成机制(见精氨酸合成)当体内需要 NH_3 时，尿素可经尿素酶的作用分解生成 NH_3 和 CO_2 。

三、 CO_2 的去路

氨基酸脱羧后形成的 CO_2 大部可以直接排出细胞外，小部分可被固定而成为细胞内的组成成分。例如丙酮酸可以在苹果酸酶的催化作用下固定 CO_2 ，并还原成苹果酸：



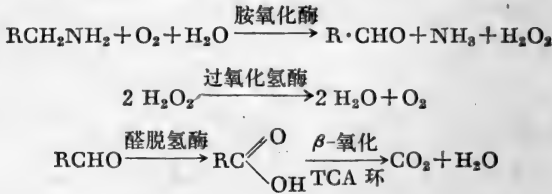
磷酸丙酮酸在草酰乙酸合成酶催化下固定 CO_2 生成草酰乙酸。



四碳化合物苹果酸及草酰乙酸的生成，对于促进三羧酸环的顺利进行，彻底氧化各种酮基酸起重要作用。对于形成各种通过三羧酸环产生的发酵产物如柠檬酸、谷氨酸、延胡索酸等有促进作用。

四、胺的去路

氨基酸脱羧生成胺，在胺氧化酶的作用下，氧化成醛；醛经醛脱氢酶催化，加水脱氢，生成有机酸，再经 β -氧化生成乙酰CoA，乙酰CoA进入三羧酸环，彻底氧化生成 CO_2 和水；



总结以上所述，氨基酸的分解途径可以下图表示：

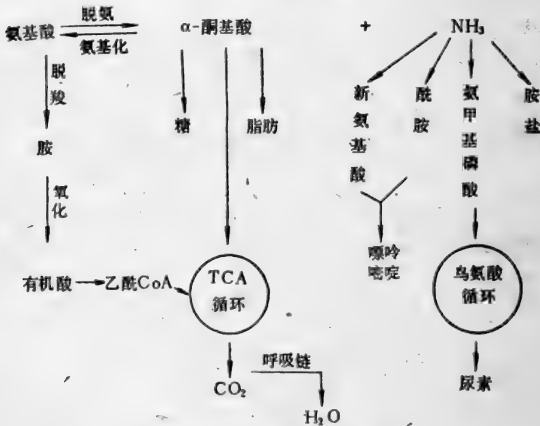


图 9-4 氨基酸的分解途径

第五节 氨基酸的生物合成

氨基酸是合成蛋白质的原料。自然界生物合成蛋白质必须首先合成氨基酸。氨基酸的主要生化特性不在于它能分解提供能量，而在于氨基酸是合成蛋白质的原料。所以作为氨基酸代谢的

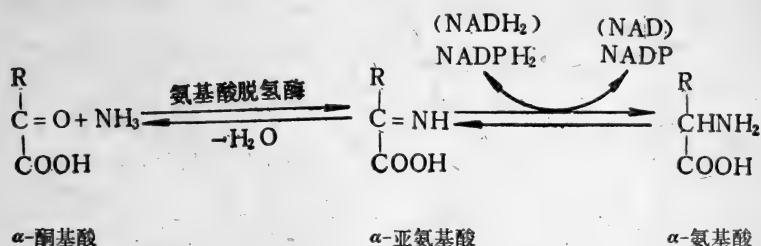
重要部分，应是氨基酸的合成。氨基酸生物合成的主要途径是：氨基化作用；转氨基作用；氨基酸的相互转化；氨基酸合成的其它途径。

一、氨基化作用

(一) 还原性氨基化反应

还原性氨基化反应是酮基酸氨基化作用中主要的反应，也是固定氮的主要反应。

α -酮基酸经还原性氨基化反应，生成氨基酸。反应机制是由 α -酮基酸与 NH_3 直接作用生成亚氨基酸，亚氨基酸被还原；即生成相应的 α -氨基酸。催化还原性氨基化反应的酶是氨基酸脱氢酶。氨基酸脱氢酶种类很多，其中以谷氨酸脱氢酶为最重要。



这些反应是氨基酸氧化性脱氨基反应的逆过程。还原性氨基化反应合成氨基酸所需原料有 α -酮基酸及氨。

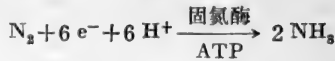
α -酮基酸来自糖降解产物丙酮酸及三羧酸环中间代谢产物如 α -酮戊二酸、草酰乙酸。这些酮基酸经氨基化作用生成丙氨酸、谷氨酸及天冬氨酸。

氨是合成氨基酸的直接氮源，其他含氮物如 NO_3^- 等，先转变成 NH_3 再合成氨基酸。

动植物从蛋白质、核酸等含氮化合物分解代谢中取得氨。

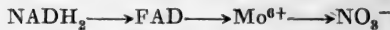
自养微生物如固氮菌和某些藻类(蓝藻)，通过固氮酶先将氮固定，转变成氨。豆科作物的根瘤菌也能固定空气中的氮。生物

固氮机理尚未完全阐明。总反应为：

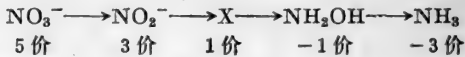


固氮酶是由含铁的铁蛋白(分子量为 50,000)和另一种含铁、钼的铁钼蛋白(分子量为 100,000)所组成。反应需要还原型电子供体、能量物质(ATP)和电子受体参加,还需要二价的金属离子(Mg^{++} 、 Mn^{++} 等)。电子供体来自糖类代谢,ATP来自光合磷酸化、氧化磷酸化系统,电子受体 N_2 、 NO_3^- 等。

植物和微生物(大肠杆菌、霉菌等)能利用 NO_3^- 还原成 NH_3 。此酶称硝酸盐还原酶,它是一种含钼的金属黄素蛋白,以 NADH_2 为供氢体。其中的电子转移途径是：



从 NO_3^- 转变成 NH_3 的途径尚不完全清楚。从结构中表明,共有 8 个电子的变化,所以目前有人认为同化硝酸盐还原分为四个阶段即：



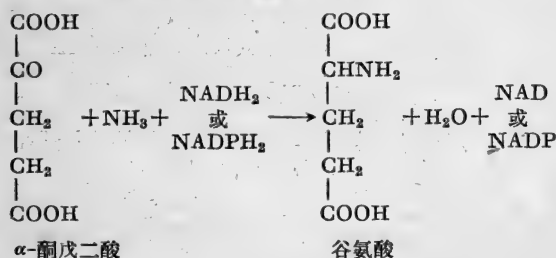
还原亚硝酸盐的酶也属于 FAD 的含铁与铜的金属蛋白质,以 NADH_2 或 NADPH_2 为供氢体。亚硝酸盐还原后的产物 X(可能是 HNO 次亚硝酸)或类似的化合物。从 X(或次亚硝酸)还原成羟胺的机制和有关的酶,目前不清楚。由羟胺转变成氨的反应是由羟胺还原酶催化的。这酶是含有 FAD 及锰的金属黄素蛋白。

NH_3 及 α -酮基酸的供应是还原性氨基化反应的必要条件而氨基酸脱氢酶的存在特别是谷氨酸脱氢酶是使还原性氨基化反应发生的决定因素。还原性氨基化反应合成氨基酸举例如下：

1. 谷氨酸的生物合成

α -酮戊二酸通过还原性氨基化反应生成谷氨酸是由谷氨酸脱氢酶的催化,这是谷氨酸氧化脱氨基反应的逆反应。此酶专一

性很强，只能作用于 L-谷氨酸。反应一般趋向于 α -酮戊二酸。当 α -酮戊二酸及 NADPH_2 供应充分时则趋向于合成谷氨酸。谷氨酸生物合成的反应是三羧酸循环和氨基酸代谢之间的一个重要连接环节，是糖和氨基酸代谢的桥梁。



还原所需的氢原子由还原辅酶 (NADH_2 或 NADPH_2) 供给。这个反应的平衡常数接近于 1。

在多数有机体中，这个反应的非常重要性在于它是使无机氮固定到有机酸分子上去形成氨基酸的最重要反应。谷氨酸形成后又可以通过转氨反应合成其他氨基酸。

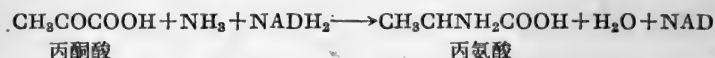
谷氨酸脱氢酶是一种细胞浆中的酶， $K=5 \times 10^3 (30^\circ\text{C})$ ，当等分子的 NADPH 或 NADP 存在时，催化 α -酮戊二酸还原氨基化。

此酶分子量较高，不需辅基，虽然它是合成代谢的主要酶，但其调节机制知道很少。当谷氨酸存在时，此酶的合成受阻（酵母）。另外，在线粒体中还含有需 NAD 的谷氨酸脱氢酶，它催化相同反应。而需 NADP 的细胞浆中的酶催化谷氨酸的合成并把氨基转给其他物质，线粒体的谷氨酸脱氢酶催化谷氨酸通过 α -酮戊二酸和三羧酸循环进行代谢以供给能量。反应向左移。在线粒体中的谷氨酸脱氢酶可为 ATP 所抑制而为 ADP 所激活。因而谷氨酸脱氢酶催化反应的方向可为这二种酶控制，当不需合成氨基酸时细胞浆中酶活性受阻，当不需要能量时线粒体中的酶活性受阻。

杆菌、小杆菌、棒杆菌及芽孢杆菌都能积累谷氨酸，因此在工业生产上常利用它们作为谷氨酸发酵的生产菌株。

2. 丙氨酸的生物合成

丙氨酸脱氢酶存在于某些细菌中以 NADH_2 为受氢体，反应机制和谷氨酸脱氢酶相近，但此酶不如谷氨酸脱氢酶分布广，作用不如谷氨酸脱氢酶重要。生产上可用枯草杆菌进行丙氨酸发酵。



3. 甘氨酸的生物合成

乙醛酸通过还原氨基化可以生成甘氨酸。此反应不可逆，酶已从结核分枝杆菌中分离出来。

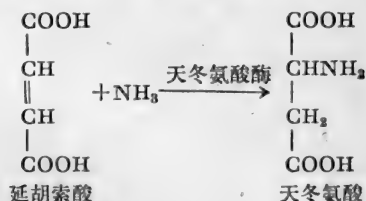


但甘氨酸主要从丝氨酸互变合成，[见三(三)]或转氨反应合成。

(二) 直接氨基化反应

天冬氨酸的生物合成：

延胡索酸通过天冬氨酸酶催化，可直接氨基化，生成天冬氨酸。天冬氨酸酶存在于植物和某些细菌中，能使无机氨结合到有机酸分子上。也是自然界氮固定的另一种反应。工业上用延胡索酸为原料，利用大肠杆菌中的 L-天冬氨酸酶生产天冬氨酸。



(三) 酰胺化反应

谷氨酰胺及天冬氨酰胺的生物合成，谷氨酰胺及天冬氨酰胺合成酶广泛存在于动物、植物、微生物，分别催化谷氨酸及天冬氨酸

酸合成谷氨酰胺及天冬氨酰胺。这种形成酰胺的方式也是生物体贮存 NH_3 的一种方式(反应见 NH_3 的去向)。

大肠杆菌的谷氨酰胺合成酶的分子量为 592,000, 含有 12 个亚基。随着细菌种族的差异, 该酶分子量也有不同, 约在 350,000 至 600,000 之间。谷氨酰胺合成酶也是一种调节酶。

总结起来, 氨基化作用起着同化氮固定氮的作用, 在生理上有着十分重要的意义。氨基化作用中以还原性氨基化反应特别是谷氨酸的还原性氨基化反应尤为重要。通过还原性氨基化反应合成谷氨酸, 再通过转氨基作用可以形成体内多数氨基酸。

二、转氨基作用

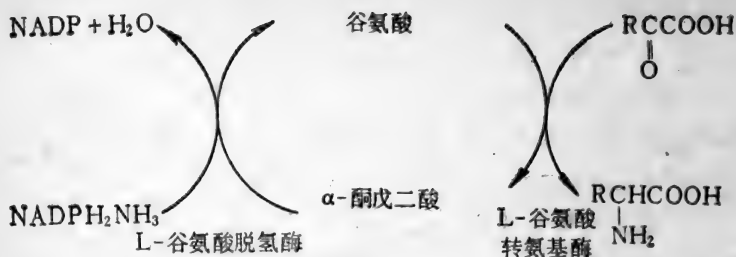
转氨基作用是由 α -酮酸转变成氨基酸的重要反应, 由转氨酶(或氨基移换酶)催化, 使一种氨基酸的氨基, 转移给 α -酮酸, 形成新的氨基酸(见脱氨基作用)。转氨基作用既催化氨基酸脱氨基又催化 α -酮酸氨基化, 因此是糖代谢与氨基酸代谢的桥梁。

谷氨酸和 α -酮戊二酸在氨基移换中起着重要作用。

在细菌或其浸出液中, 许多氨基酸如甘、丝、苏、胱、半胱、缬、氨、脯、组、鸟、瓜、精、赖、亮、异亮、酪、色等氨基酸都可与 α -酮戊二酸作用, 生成谷氨酸和相应的酮酸。相反, 也可以通过谷氨酸和这许多酮酸转氨基, 形成各种新的氨基酸, 使氨基酸种类增加, 有利于蛋白质的合成。

转氨基作用已见于许多细菌, 如大肠杆菌、痢疾杆菌、变形杆菌、假单胞菌、固氮菌及酵母及霉菌。转氨基作用是氨基酸合成代谢及分解代谢中的极重要反应。

转氨基作用只能转移氨基酸的氨基, 而不能使无机氮转变成氨基酸。当转氨基作用和还原氨基化反应联合时可以从 NH_3 及酮基酸合成生物体内大部分氨基酸。



植物、微生物一般能生成全部氨基酸的碳链(α -酮基酸),因此通过转氨作用,可以自身合成,全部氨基酸。有些微生物如金黄色葡萄球菌、乳酸菌等不能合成某些氨基酸,必须由培养基中加入这些氨基酸(或蛋白胨、蛋白水解物)才能生长。人和高等动物不能自行合成某些氨基酸,必须由食物供给,这些氨基酸对人和高等动物来说叫“必需氨基酸”。人有八种必需氨基酸不能自行合成。这八种是:缬氨酸、赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、苏氨酸与亮氨酸。其实所谓不能合成必需氨基酸是指动物和人的细胞不能合成氨基酸的碳链骨架,如果外加入带有这些碳链的酮基酸,则除赖氨酸外,还可以通过转氨反应合成。必需氨基酸是人类必需的营养成分,不可缺少,否则蛋白质合成受阻表现疾病症状,所以现在工业发酵用发酵法生产各种人类所需的必需氨基酸,用于医药。这已成为工业发酵重要内容的一个方面。

三、氨基酸间的相互转化

最初由 α -酮基酸还原性氨基化生成的氨基酸(称初生氨基酸),除通过转氨作用转变成其他氨基酸外,还可以通过碳链上的变化直接合成另一些氨基酸。例如:从谷氨酸可以合成脯氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸和精氨酸;从天冬氨酸可以合成二氨基庚二酸、赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸。苏氨酸又能转变成异亮氨酸,丝氨酸又能形成半胱氨酸。因此,除缬氨酸和亮氨酸、芳香族氨基

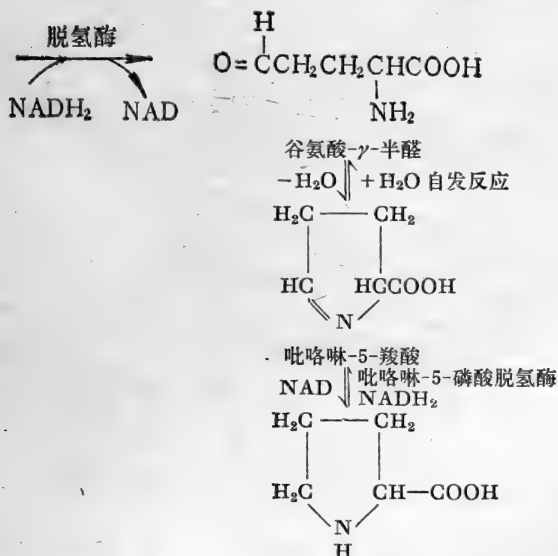
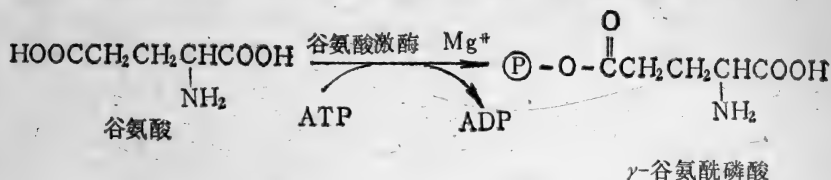
酸以及组氨酸有其特殊合成途径外，大多数氨基酸都可以分别从谷氨酸、天冬氨酸和甘氨酸转变而来。

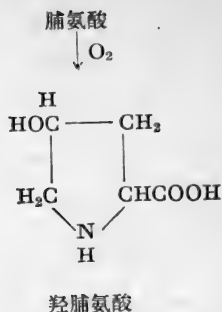
氨基酸在代谢过程中，通过相互转化而保持一定的平衡关系，当外界供给某种氨基酸时即可转变成另一些氨基酸。

(一) 脯氨酸、鸟氨酸、精氨酸的合成

1. 脯氨酸的合成

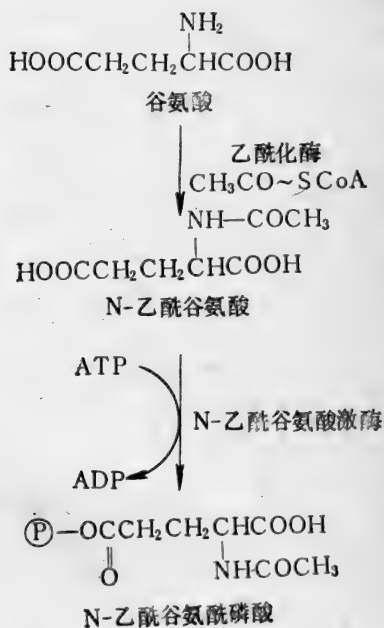
谷氨酸可在动物、植物、微生物体内被还原成谷氨酸半醛，后者可以脱水环化而形成吡咯啉-5-羧酸，再经 NADH_2 还原而生成脯氨酸。脯氨酸氧化可以转变成羟脯氨酸。脯氨酸在酵母内合成较旺盛，还可以分泌到细胞外来。啤酒前酵 17 小时即有脯氨酸分泌到发酵液中说明脯氨酸合成较多。其意义尚未明了。

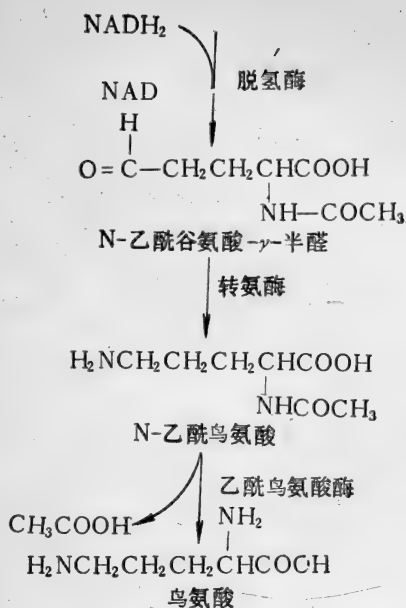




2. 鸟氨酸的合成

微生物可由谷氨酸合成鸟氨酸。由谷氨酸转变成鸟氨酸首先需要经过乙酰化过程。反应变化如下：

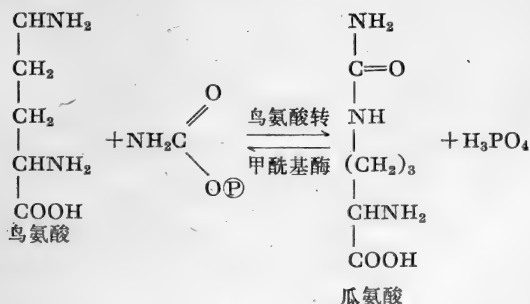




3. 瓜氨酸的合成

生物体均可由鸟氨酸合成瓜氨酸。

鸟氨酸经鸟氨酸转甲酰基酶的作用，接受氨基甲酰磷酸分子上的甲酰基，即可形成瓜氨酸。



4. 精氨酸的合成

从瓜氨酸或鸟氨酸可合成精氨酸。精氨酸又能分解为鸟氨酸

与尿素。这个以鸟氨酸、瓜氨酸、精氨酸为中心的循环称鸟氨酸-精氨酸循环。通过此循环，可不断从鸟氨酸和氨形成循环上任何一种氨基酸。

反应从鸟氨酸开始，加上氨基甲酰磷酸，形成瓜氨酸。

瓜氨酸与天冬氨酸缩合成精氨酰琥珀酸，精氨酰琥珀酸裂解为精氨酸与延胡索酸。通过鸟氨酸-精氨酸循环合成精氨酸，反应如下：

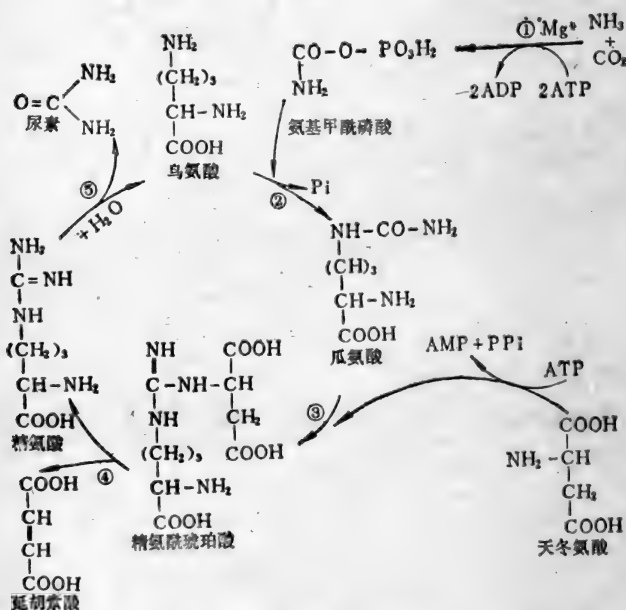


图 9-5 鸟氨酸-精氨酸循环

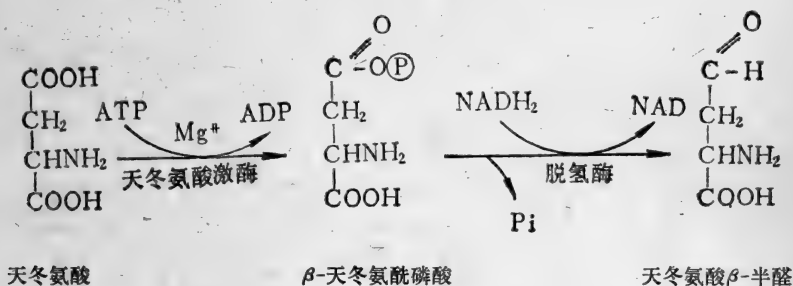
- ① 氨基甲酰磷酸合成酶 ② 鸟氨酸氨基甲酰转移酶 ③ 精氨酰琥珀酸合成酶 ④ 裂解酶 ⑤ 精氨酸酶

鸟氨酸-精氨酸循环是动物形成含氮代谢末产物——尿素的主要途径。植物和微生物体内氨基酸脱氨后所放出的氨，也可以通过形成尿素暂时贮存起来，在需要时，尿素又可被脲酶水解放出氨，供合成各种含氮化合物的需要。

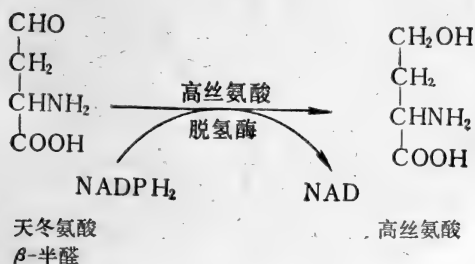
(二) 赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸的合成

赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸都是人和动物体内不能合成的必需氨基酸，必须依靠植物或微生物合成供应。植物和微生物可由天冬氨酸转变而来。

首先，天冬氨酸生成 β -天冬氨酰磷酸，然后再经还原脱磷酸作用，生成天冬氨酸 β -半醛。

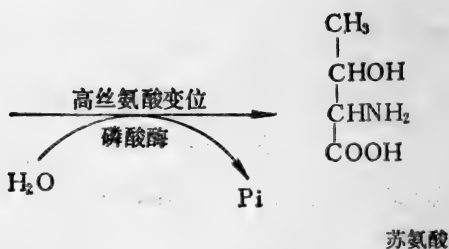
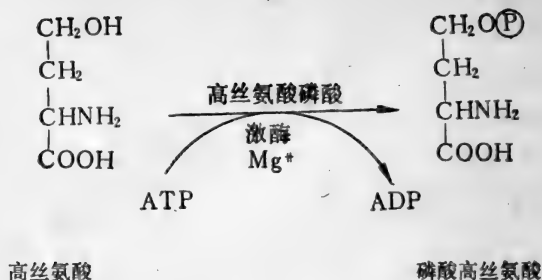


由天冬氨酸 β -半醛可以合成赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸。天冬氨酸 β -半醛转变成蛋氨酸、苏氨酸时，首先经脱氢酶催化，还原成高丝氨酸。反应为：



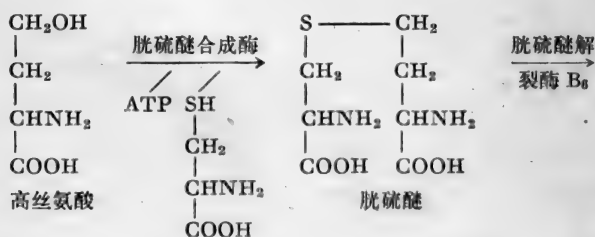
1. 苏氨酸的合成

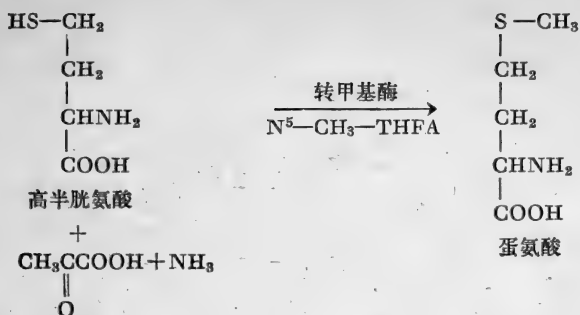
高丝氨酸经高丝氨酸激酶催化，消耗 ATP 经磷酸化生成磷酸高丝氨酸，后者经脱磷酸变位生成苏氨酸。



2. 蛋氨酸的合成

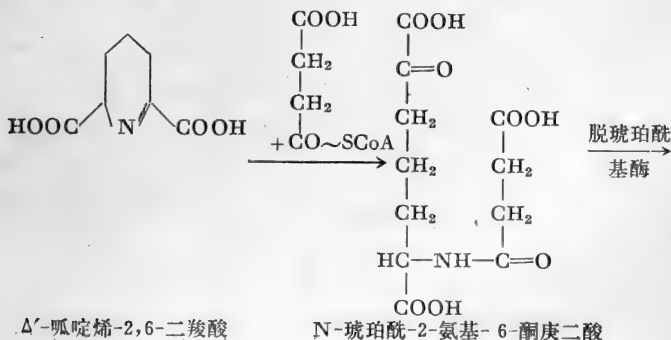
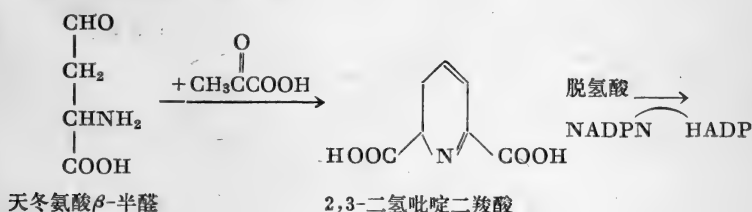
高丝氨酸经胱硫醚合成酶催化与半胱氨酸缩合生成胱硫醚，再经胱硫醚解裂酶分解形成高半胱氨酸并释出丙酮酸加氨。高半胱氨酸经转甲基酶及转甲辅酶 $\text{N}^5\text{-CH}_3\text{-四氢叶酸}$ 作用生成蛋氨酸。

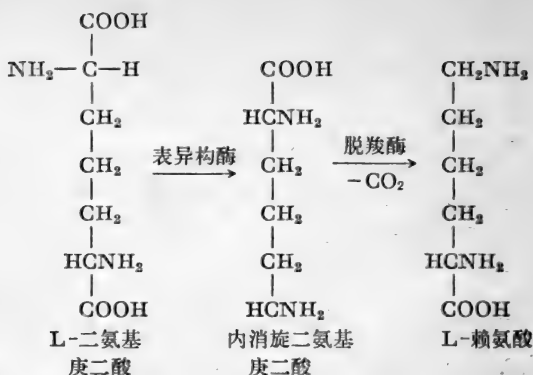




3. 赖氨酸的合成

天冬氨酸转变成赖氨酸的途径比较复杂。天冬氨酸先转变成天冬氨酸β-半醛，再与丙酮酸加合生成带杂环的中间产物，当加入琥珀酰~CoA后形成N-琥珀酰-2-氨基-6-酮庚二酸，后者经转氨基生成N-琥珀酰-L-二氨基庚二酸。N-琥珀酰-L-二氨基庚二酸脱去琥珀酸则形成L-二氨基庚二酸，再经异构、脱羧反应则生成L-赖氨酸。反应如下：





以上为细菌合成赖氨酸的途径，酵母和链孢霉合成赖氨酸则按另外途径进行。

总结苏氨酸、蛋氨酸和赖氨酸的合成示意图见图 9-6。

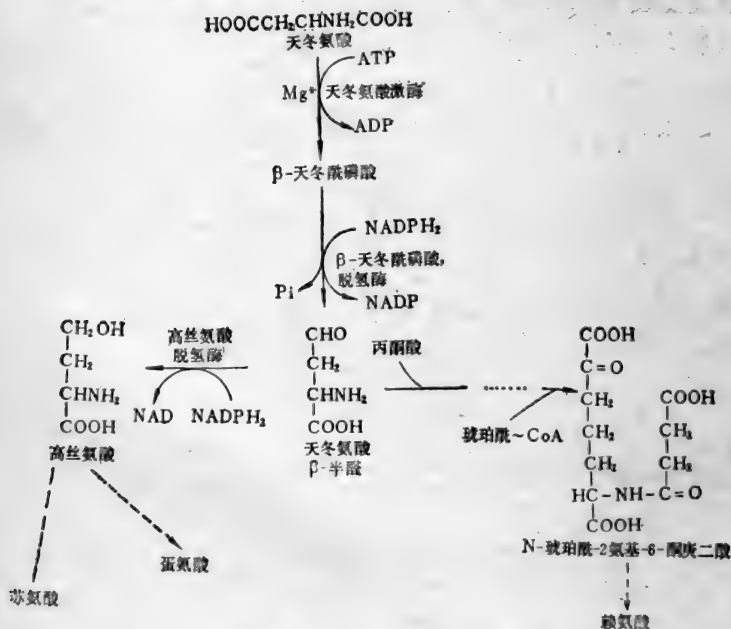


图 9-6 赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸合成示意图

从上述合成赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸的途径可以看出：天冬氨酸 β -半醛是从天冬氨酸合成三种氨基酸的共同中间体。当天冬氨酸 β -半醛还原成高丝氨酸则可以合成苏氨酸和蛋氨酸。当天冬氨酸 β -半醛和丙酮酸、琥珀酰 CoA 缩合则能合成赖氨酸。所以当工业发酵生产氨基酸时，必须选育营养缺陷型菌株，并控制发酵条件，使有利于产物的形成。赖氨酸发酵生产即产用营养缺陷菌株。

营养缺陷菌株是微生物经过物理或化学诱变剂处理后，失去了合成某种物质（如某种氨基酸）的能力，必须由外界补充这些物质才能正常生长。这种营养上表现出某种缺陷的变异菌株称为营养缺陷菌株。在这些营养缺陷型菌株体内，失去了合成某些物质的能力，导致合成这些物质的原料积累，有利于另一些物质的合成。氨基酸及肌苷酸的发酵都采取营养缺陷菌株。

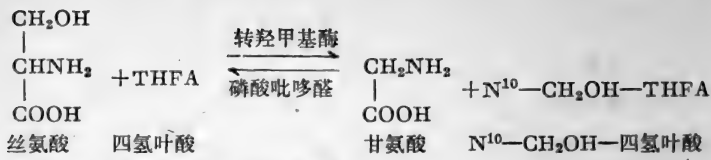
赖氨酸发酵生产利用谷氨酸生产菌——北京棒状杆菌 *A. s.* 1.299 的人工诱变营养缺陷型菌株进行生产的。这种菌株是高丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸营养缺陷型。已用于生产的是高丝氨酸缺陷型 *As.* 1.563 菌株。由于 *As.* 1.563 菌株是高丝氨酸营养缺陷型，因此失去了从天冬氨酸 β -半醛合成高丝氨酸的能力，因此也不能再合成苏氨酸及蛋氨酸。这就使天冬氨酸 β -半醛可以大量和丙酮酸、琥珀酰 CoA 缩合，向合成赖氨酸方向进行。

苏氨酸脱水、脱氨生成 α -酮基丁酸，可进一步和活性乙醛缩合，形成 α -乙酰羟基丁酸，再合成异亮氨酸（见异亮氨酸合成）。

（三）丝氨酸与半胱氨酸的合成

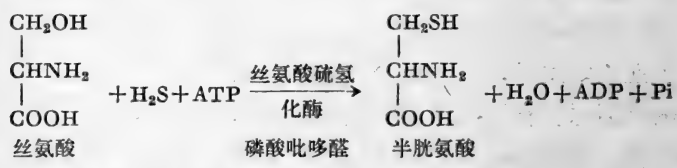
1. 丝氨酸与甘氨酸的互变转化

生物体内丝氨酸可由甘氨酸互变合成。丝氨酸在丝氨酸转羟甲基酶催化下，与四氢叶酸作用，可转变为甘氨酸。



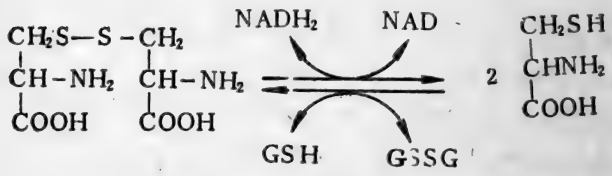
2. 丝氨酸转变成半胱氨酸

丝氨酸可作为原料合成半胱氨酸。在细菌、霉菌、酵母、绿色植物和多种动物组织中都有丝氨酸硫氢化酶，能合成半胱氨酸。



3. 胱氨酸与半胱氨酸的互变

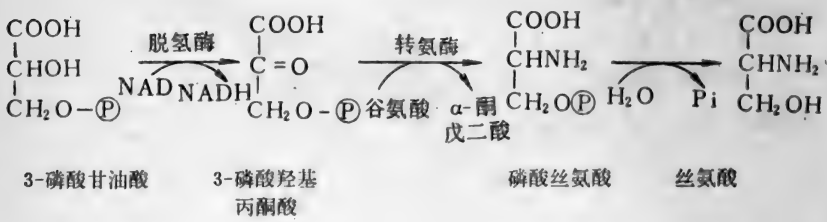
胱氨酸与半胱氨酸可在微生物体内进行互变。



此反应由胱氨酸还原酶催化，NADH₂(NAD)、GSH(GSSG)、谷胱甘肽参加作为氧化还原剂。

4. 从磷酸甘油酸合成丝氨酸

大肠杆菌等微生物从磷酸甘油酸可合成丝氨酸，途径如下：



四、氨基酸合成的其他方式

氨基酸的生物合成除通过还原性氨基化反应，固定氮形成谷氨酸，通过转氨反应合成大部分氨基酸，以及通过氨基酸互相转化合成脯氨酸、羟脯氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸、精氨酸（谷氨酸系统）、赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸（天冬氨酸系统）外还可以通过其他方式直接从糖代谢产物活性乙醛、丙酮酸等合成氨基酸的各种不同的碳链支架如枝链碳链、芳香族含环碳链、含杂环碳链等，再进一步合成氨基酸。

（一）缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸的合成

这三种氨基酸的共同特点是都含有枝链的碳氢链，且都是人和动物的必需氨基酸，只能依靠植物和微生物进行合成。这三种氨基酸的合成，很有相似之处。

1. 合成途径

缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸都能在微生物如酵母、霉菌、大肠杆菌等体内由糖类代谢的中间产物丙酮酸和活性乙醛缩合合成。当活性乙醛和丙酮酸缩合，经还原异构、脱水、转氨后可形成缬氨酸；当苏氨酸的代谢中间产物 α -酮基丁酸与活性乙醛缩合，经与上类似途径，则生成多一个碳原子的异亮氨酸；当乙酰辅酶A与缬氨酸代谢中间产物 α -酮基异戊酸缩合后，通过相似代谢途径，则能形成亮氨酸。它们的共同特点都是先合成与缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸相应的酮基酸，再通过转氨反应使酮基酸转化成相应的氨基酸。

缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的合成如图9-7。

2. 缬氨酸的合成与酒类风味物质——双乙酰的形成

从缬氨酸的合成途径看来，葡萄糖通过中间代谢产物丙酮酸与活性乙醛缩合形成 α -乙酰乳酸，进一步再合成缬氨酸。啤酒



α -酮基丁酸



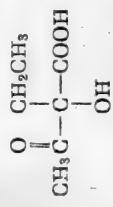
丙酮酸

缩合酶

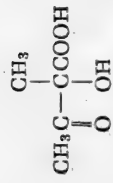
缩合酶



TPP



α -乙酰 α -羟基丁酸



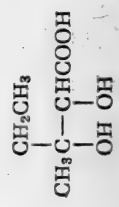
α -乙酰乳酸

还原异构酶

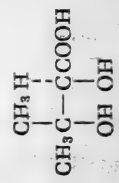
还原异构酶

NADH_2

NADH_2



α, β -二羟基己酸



α, β -二羟基戊酸

二羧酸脱水酶

二羧酸脱水酶

$-\text{H}_2\text{O}$

$-\text{H}_2\text{O}$

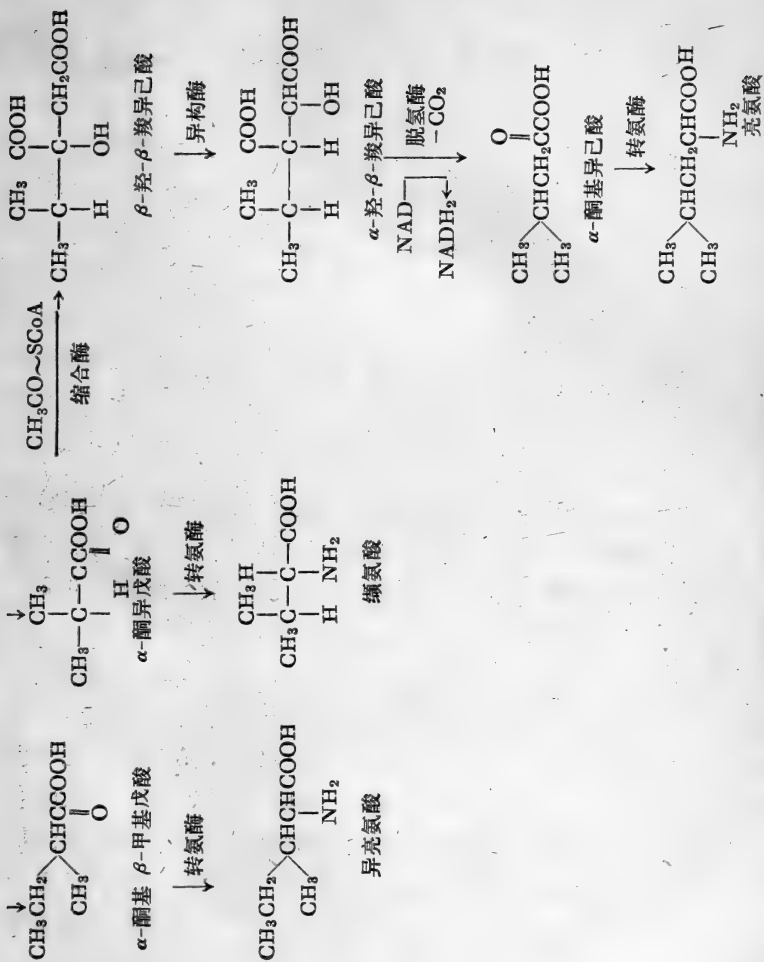
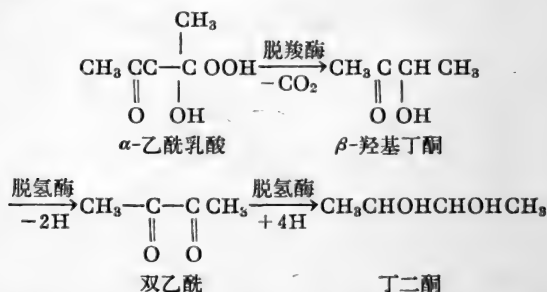


图 9-7 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的合成

酵母、酒精酵母能使 α -乙酰乳酸脱羧形成 3-羟基丁酮 $\left(\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}- \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \right.$
 $\left. \begin{array}{c} -\text{CH} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{OH} \end{array} \right)$ 再经脱氢生成双乙酰 $\left(\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}-\text{C} \text{CH}_3 \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array} \right)$ 。双乙酰又能还
 原成丁二酮。



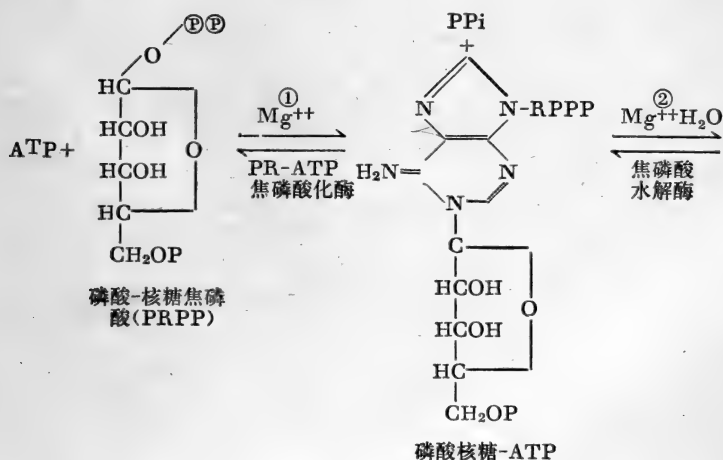
双乙酰是酒类重要的风味物质。微量双乙酰可给予酒类特殊的风味。白酒中双乙酰含量较高可达 20 毫克/升。啤酒为低浓度酒，微量双乙酰使啤酒有特殊风味，双乙酰限量不得超过 0.2 毫克/升。当双乙酰含量在 0.2 毫克/升以上即有馊味。

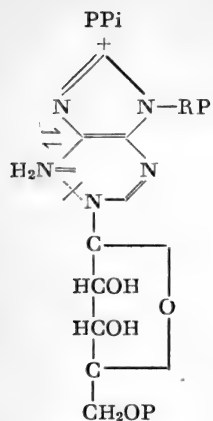
为了控制双乙酰浓度，在啤酒酿造时，特别在缩短酒龄中，要求麦汁中氨基氮含量为 180~240 毫克/升。麦汁中缬氨酸含量不能过低，因为麦汁中氨基氮不足，或缬氨酸浓度过低，能促使葡萄糖较多地通过形成 α -乙酰乳酸，合成缬氨酸。当 α -乙酰乳酸增加，双乙酰量也增加。调节麦汁中缬氨酸含量，则可通过反馈调节，抑制 α -乙酰乳酸的合成则可减少双乙酰含量，使啤酒含有适量双乙酰芳香成分，以保持啤酒风味。也可用将双乙酰还原成丁二酮的方法促进啤酒老化，调节啤酒风味。

(二) 组氨酸的生物合成

组氨酸的分布较广，它是组蛋白、精蛋白血红蛋白等蛋白质的氨基酸主要组成成分。组氨酸也常是酶活性部位的组成部分，对酶的催化功能起重要作用。

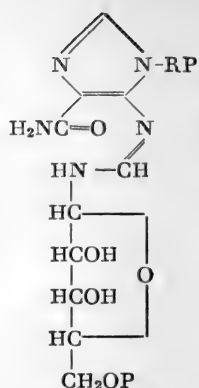
组氨酸的合成过程有一部分和嘌呤的合成是一致的。腺苷三磷酸和 5-磷酸核糖焦磷酸(PRPP) 经磷酸核糖腺苷三磷酸 (PR-ATP) 焦磷酸化酶及 Mg^{++} 的催化生成磷酸核糖腺嘌呤三磷酸(磷酸核糖-ATP)(反应 1), 该化合物经焦磷酸水解酶脱去焦磷酸, 变成磷酸核糖-AMP(反应 2), 然后经磷酸-AMP 水解酶作用将腺嘌呤的 1 位氮和 6 位碳间的键断裂形成磷酸核糖亚氨基氨基咪唑甲酰胺核苷酸(磷酸核糖亚氨基- AIG-RP)(反应 3)。此化合物的核糖基经异构酶作用转变为核酮糖基(反应 4)。又经氨基转移酶的作用, 由谷氨酰胺参加, 加入氨后(反应 5)。再经裂解及环化酶环化(反应 6)生成氨基咪唑甲酰胺核苷酸(AIG-RP)和咪唑磷酸甘油。咪唑磷酸甘油可转变成组氨酸。由咪唑磷酸甘油转变成组氨酸的过程, 是先经咪唑磷酸脱水酶脱水生成咪唑磷酸丙酮醇(反应 7)。再经咪唑磷酸丙酮醇谷氨酰胺转氨酶参加, 生成磷酸 L-组氨酸(反应 8), 又经磷酸组氨酸磷酸酯酶水解, 生成 L-组氨酸(反应 9)。L-组氨酸经组氨酸脱氢酶催化, 脱氢氧化即可生成 L-组氨酸。组氨酸合成反应如图 9-8。





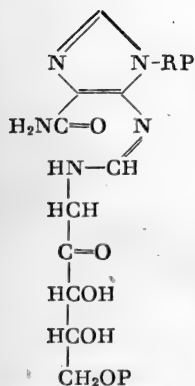
磷酸核糖-AMP

③
磷酸核糖-AMP
环水解酶



磷酸核糖亚胺
甲基-AIC-RP

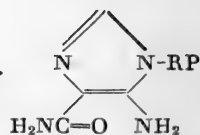
④
异构酶



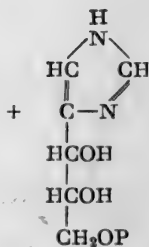
磷酸核酮糖亚胺
甲基-AIC-RP

⑤
转氨酶
谷氨酰胺

⑥
环化酶
裂解、环化



氨基咪唑
甲酰胺核苷酸
AIC-RP



咪唑磷酸甘油

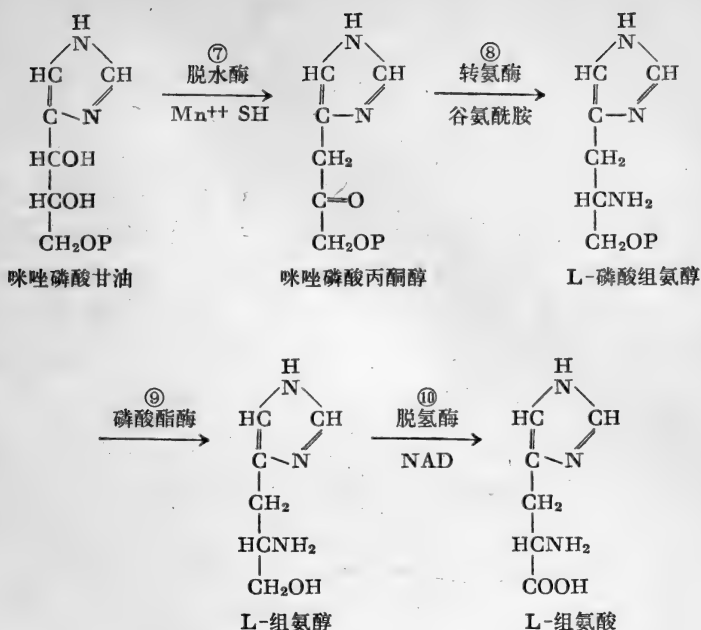


图 9-8 L-组氨酸合成图

L-组氨酸合成的酶系与结构基因的遗传图谱已经搞清楚了，共有 9 个结构基因参与组氨酸的合成，是目前研究清楚的可阻遏操纵子体系。（见十二章代谢的调节控制）。

(三) 苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸的合成

芳香族氨基酸包括苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸。

植物、微生物如大肠杆菌，粗链孢霉、酵母等都能从糖代谢中间产物合成这三种氨基酸。苯丙氨酸、色氨酸是动物和人的必须氨基酸，动物和人不能合成这二种氨基酸，只能利用苯丙氨酸合成酪氨酸。

含苯核氨基酸的主要生物合成特点是它们的苯核完全来自糖类代谢的中间产物，来自直链碳链前身，再经转氨等反应合成氨基酸。反应途径从大肠杆菌变异菌株中研究阐明。关键性物质莽

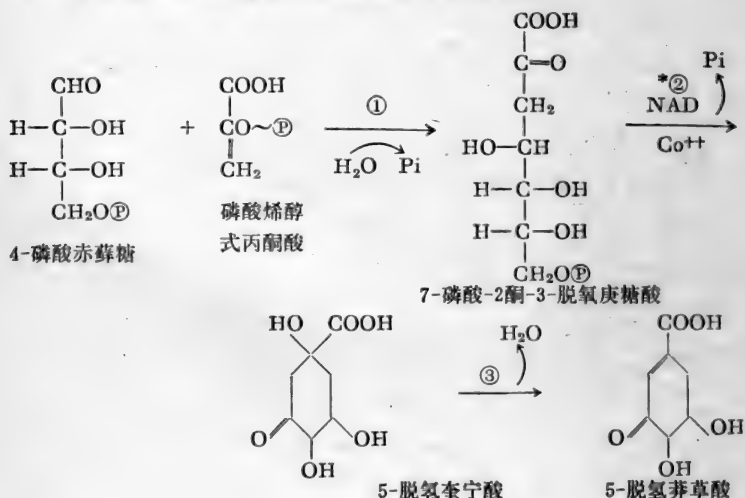
草酸是从高等植物中发现的，莽草酸在有些植物中含量丰富，莽草酸可以代替芳香族氨基酸使变异菌株生长，和莽草酸相类似的化合物也能使变异菌株维持生长，又经同位素实验的揭示和证实，现合成途径已经搞清楚了。

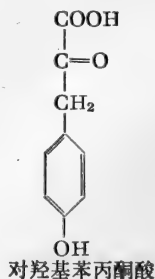
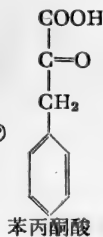
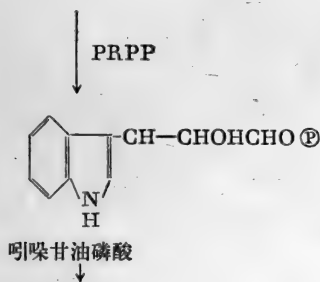
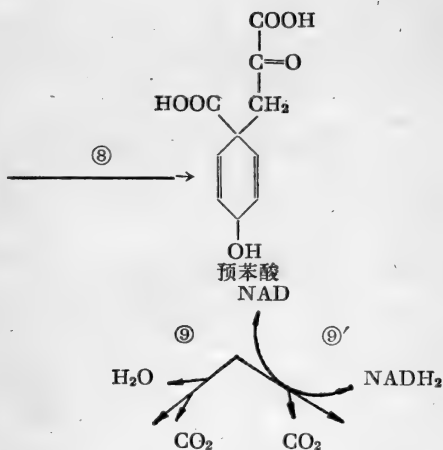
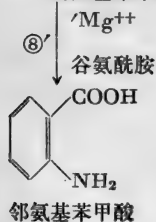
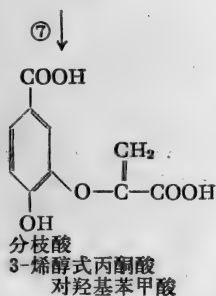
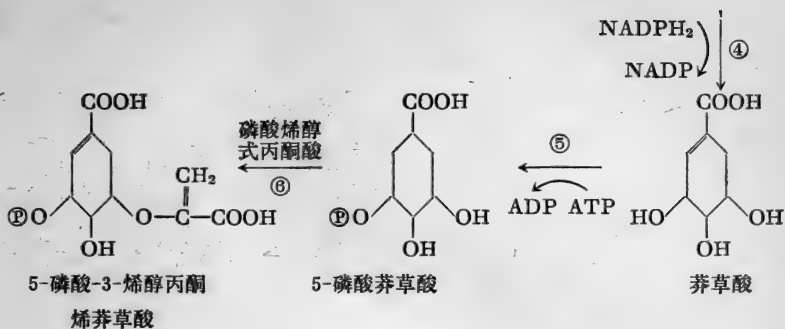
合成芳香环的共同前体是莽草酸。莽草酸由糖代谢 HMP 途径的中间产物 4-磷酸赤藓糖，和糖代谢 EMP 途径的中间产物磷酸烯醇式丙酮酸，缩合后，再经过一系列反应而生成。

莽草酸是植物、微生物合成许多产物的共同中间体。当莽草酸经一系列反应(脱氢、激活、合成等)合成分枝酸(3-烯醇式丙酮酸对羟基苯甲酸)后，可以进一步形成邻氨基苯甲酸及予苯酸。邻氨基苯甲酸是合成色氨酸的前体，予苯酸是合成苯丙氨酸和酪氨酸的前体。所以分枝酸是微生物合成色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸的转折点。而预苯酸又是微生物合成苯丙氨酸和酪氨酸的转折点。当预苯酸经脱羧脱水生成苯丙酮酸时，则可合成苯丙氨酸，当予苯酸经脱氢脱羧生成对羟基苯丙酮酸时，则可合成酪氨酸。

苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸的合成途径见图 9-9。

1. 苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的合成途径





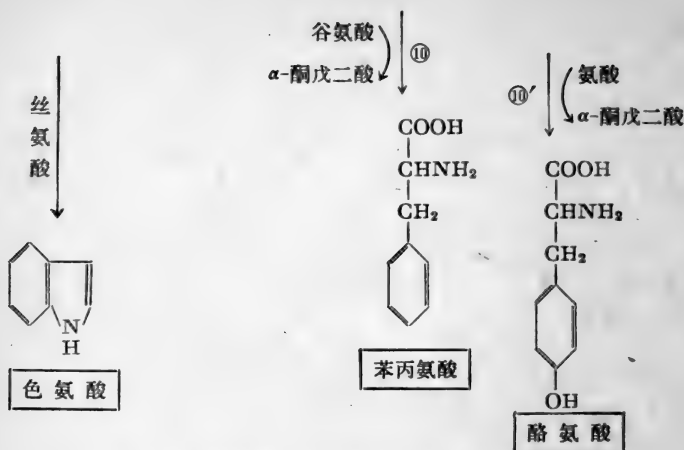
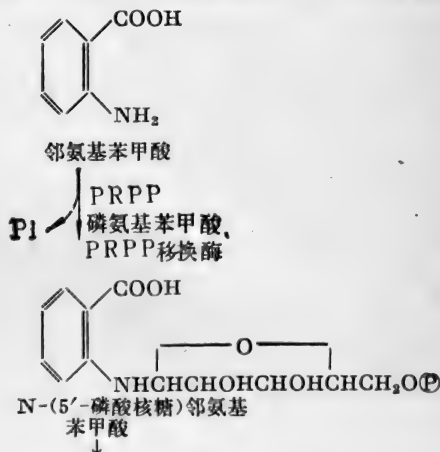


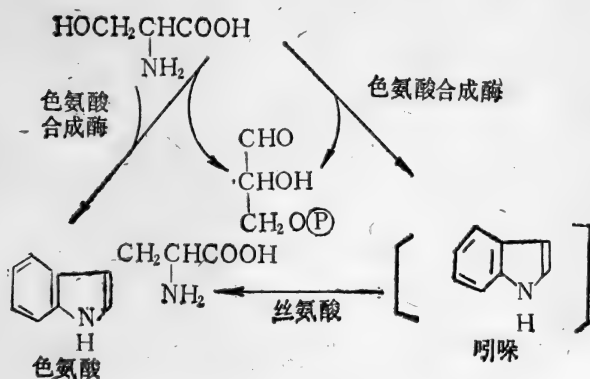
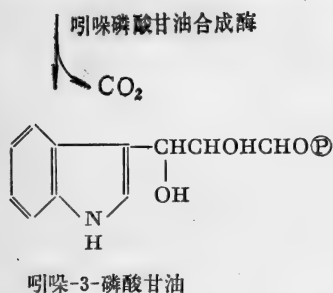
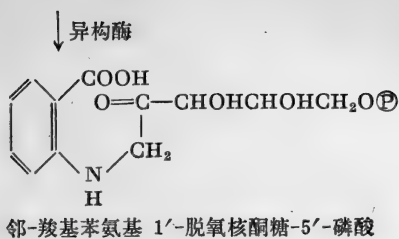
图 9-9. 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸的合成途径

① 7-磷酸-二酮-3-脱氧庚糖酸合成酶；② 5-脱氢奎宁酸合成酶；③ 5-脱氢奎宁酸脱水酶；④ 莽草酸脱氢酶；⑤ 莽草酸激酶；⑥ 5-磷酸烯醇丙酮酰莽草酸合成酶；⑦ 分枝酸合成酶；⑧ 分枝酸变位酶——分枝酸脱水酶；⑧' 邻氨基苯甲酸合成酶；⑨ 予苯酸脱氢酶和予苯酸脱水酶；⑨' 予苯酸脱氢酶(即氧化脱羧酶)；⑩、⑩' 酪氨酸 α-酮戊二酸转氨酶。 * 反应②尚有脱氢、脱磷酸、异构等中间步骤再缩合成 5-脱氢奎宁酸

2. 邻氨基苯甲酸合成色氨酸

从邻氨基苯甲酸转变成色氨酸的详细反应如下：





色氨酸合成酶研究得较多。

色氨酸合成酶是含有磷酸吡哆醛的酶，分子量为 135,000，已分离得到结晶，它催化：

吲哚-3-甘油磷酸 + 丝氨酸 → 色氨酸 + 3-磷酸甘油醛
 此反应又可分二步进行。

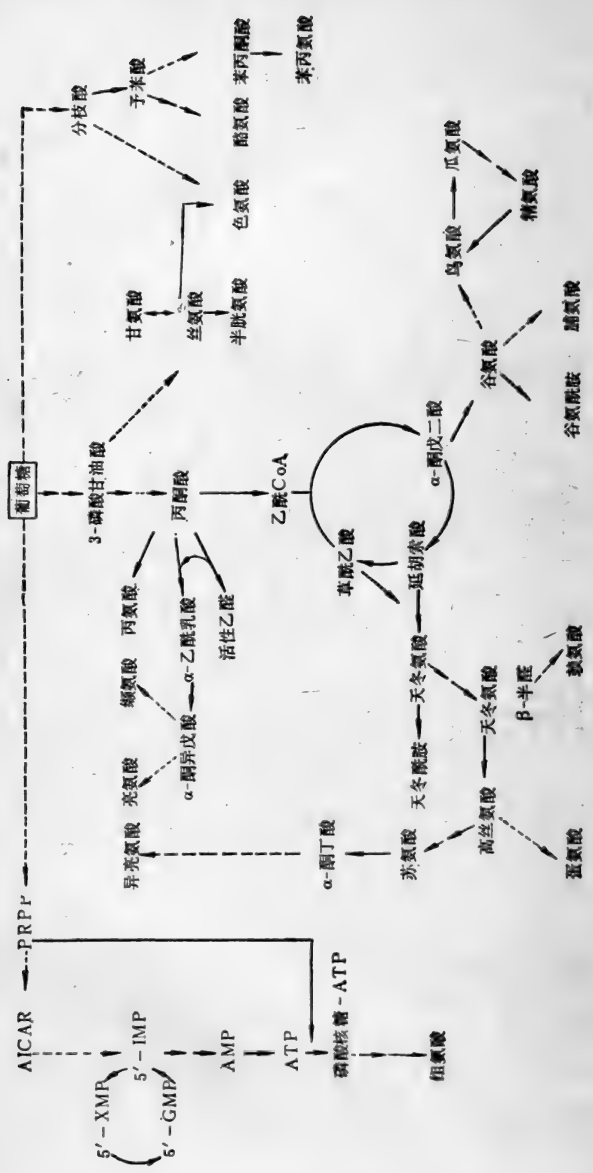


图 9-10 氨基酸合成途径图解(虚线表示多步反应)

吲哚-3-甘油磷酸 \longrightarrow [吲哚]+甘油醛-3-磷酸 ①

[吲哚]+丝氨酸 \longrightarrow 色氨酸+H₂O ②

大肠杆菌的色氨酸合成酶含有4条多肽链，二条 α -链和二条 β -链； α -链催化反应①但速度较慢， β -链催化反应②，但速度也慢。当 α -链和 β -链结合，则反应速度大增。 α -链和 β -链的氨基酸排列次序已经测定。霉菌和大肠杆菌的色氨酸合成酶的氨基酸成分和排列次序略有差别。

邻氨基苯甲酸合成酶是合成色氨酸的调节酶，当色氨酸含量增加，可抑制此酶活性，使分枝酸向色氨酸合成方向减少，而使酪氨酸、苯丙氨酸合成增加。

芳香族氨基酸合成的具体调节控制见第十二章。

总之，微生物细胞可以合成构成蛋白质成分的二十种氨基酸。其中合成途径最特殊的是组氨酸，组氨酸的合成与核苷酸合成相联系。组氨酸咪唑环中一个氮原子和一个碳原子来自嘌呤中的嘧啶环，另一氮原子来自谷氨酰胺而组氨酸的其他碳原子来自核糖。除组氨酸外其他氨基酸的碳链部分都来自糖代谢的中间产物，并通过转氨，还原氨基化等形式固定氮形成氨基酸。

氨基酸的合成从单反应过程到很复杂的多反应代谢途径，后者往往是不可逆的，因为反应过程中消耗了能量及还原性物质。

由于微生物能合成二十种氨基酸，使氨基酸发酵工业成为工业发酵的重要方面，用以生物合成各种氨基酸，特别是人和动物不能合成的必须氨基酸。

现将氨基酸合成途径示意总结于图9-10。

第六节 谷氨酸发酵

一、概 述

谷氨酸是小麦面筋组成的基本成分。过去谷氨酸用盐酸(34%)水解谷物蛋白质(面筋)制取。

由于微生物工作者研究微生物菌种的氨基酸形成情况，发现大部分菌株在一定条件下，能向基质中分泌氨基酸，后来他们找到了谷氨酸微球菌(*Micrococcus glutamincus*, 也称谷氨酸棒杆菌)能最好地产谷氨酸，经过多次突变成为优良的氨基酸生产菌，目前在工业上用微生物直接从糖发酵生产谷氨酸成功，这是氨基酸生产中的重大革新。

二、谷氨酸生产菌的主要生化特点

谷氨酸的生成机制现在已经基本搞清楚了。主要途径是 α -酮戊二酸的还原性氨基化。这是通过谷氨酸脱氢酶完成的。 α -酮戊二酸的来源是从葡萄糖，通过丙酮酸和柠檬酸，再转变而成的。在这过程中有三个重要环节可控制谷氨酸的大量生成。这就是谷氨酸生成菌所必需具备的主要生化特点。

首先，生产菌必须具备 α -酮戊二酸不能转化成琥珀酸的特点，这样才能使 α -酮戊二酸大量堆积以形成谷氨酸。也就是说生产菌的 α -酮戊二酸脱氢酶的活性必须极低或缺失。

其次，生产菌必须具备强烈的谷氨酸脱氢酶活性，而此活性不被低浓度产物谷氨酸所抑制。一般，谷氨酸脱氢酶是受谷氨酸

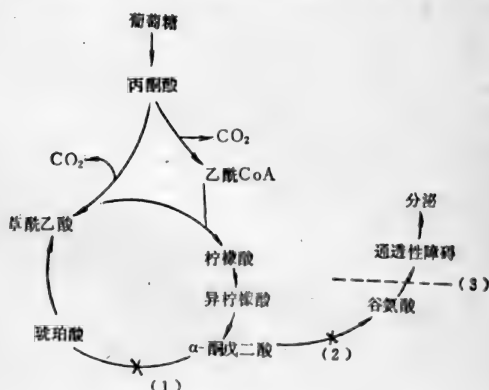


图 9-11 谷氨酸发酵的三个关键点

抑制的。而生产菌株必须在谷氨酸浓度较高时才能抑制谷氨酸脱氢酶。实际上谷氨酸生产菌的谷氨酸脱氢酶活性都很高。

第三，L-谷氨酸的大量分泌仅当培养液中生物素浓度低水平(亚适量)时才可能。在此条件下细胞膜对谷氨酸的通透性高。谷氨酸的分泌降低了产物的浓度，消除了谷氨酸转化成其他代谢物的危险，减低了对谷氨酸脱氢酶的抑制，并使谷氨酸的生成途径畅通。由生物素饥饿(亚适量)可造成细胞膜对产物的高通透性。目前还有其他技术可以造成细胞膜的通透性增加而进行谷氨酸生产。

三、谷氨酸生物合成的代谢途径

现阐明以葡萄糖为碳源，发酵生产谷氨酸时，谷氨酸生物合成的途径。

谷氨酸生产菌利用葡萄糖合成谷氨酸的代谢途径可以分为两部分：(1) 葡萄糖转化成 α -酮戊二酸；(2) α -酮戊二酸加氨生成谷氨酸。

(一) 葡萄糖转变成 α -酮戊二酸

从谷氨酸发酵的扩展短杆菌 (*Brevibacterium diaaricutum*) 所含的酶系统看来，谷氨酸生产菌既有 EMP 途径有关的酶系统(葡萄糖激酶、葡萄糖磷酸异构酶、醛缩酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶)以及 HMP 途径有关的 6-磷酸葡萄糖脱氢酶系统，以及 TGA 有关的各种酶系统。因此认为由葡萄糖转变成 α -酮戊二酸，包括糖类代谢的主要代谢途径 EMP、HMS 及 TGA 循环。(具体步骤见糖代谢)。一般认为 EMP 和 HMS 途径之比为 9:1。乙醛酸环在菌体生长时进行，在产谷氨酸时减弱，在以乙酸为原料发酵谷氨酸时较显重要。

在谷氨酸发酵中丙酮酸同样显重要作用，它是发酵转折的关键。当氧充分时丙酮酸进入 TGA 环产生 α -酮戊二酸，当供氧不足时丙酮酸就转变成乳酸，谷氨酸产量大为减少。从糖转变成

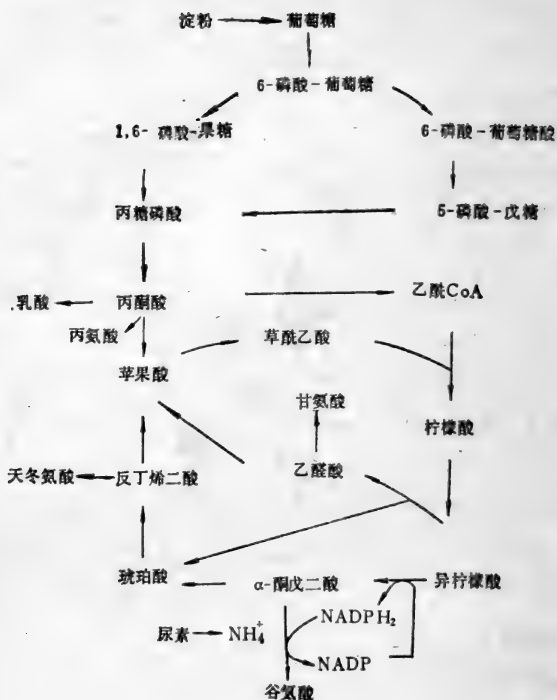


图 9-12 从糖质原料发酵生成谷氨酸的代谢途径

α -酮戊二酸及谷氨酸合成的途径见图 9-12。

(二) α -酮戊二酸转变成谷氨酸

谷氨酸生产菌中含有氨基酸转移酶与谷氨酸脱氢酶两种酶系统。促使谷氨酸形成的主要酶系统是谷氨酸脱氢酶，而不是转氨酶，因为转氨酶不能利用自由态的氨，且在谷氨酸生产菌中活性微弱；而谷氨酸脱氢酶活性强，且能利用自由态的氨。 α -酮戊二酸通过还原性氨基化合成谷氨酸，也即 α -酮戊二酸通过加氢加氨生成谷氨酸；氨来自尿素、氨水等，氢主要来自异柠檬酸的脱氢氧化。由下列试验结果证明通过谷氨酸脱氢酶的辅酶和异柠檬

酸脱氢酶的辅酶相偶联即可产生谷氨酸。

利用谷氨酸棒杆菌的无细胞提取液，在有氧与无氧条件下，试验对三羧酸循环上化合物作用产生谷氨酸的情况见表 9-1。

表 9-1 各种底物的谷氨酸生物合成

底 物	谷氨酸生成量 (微克分子)	
	无 氧	有 氧
NH_4^+ +反丁烯二酸	0	0
NH_4^+ +反丁烯二酸+ α -酮戊二酸	21	14
NH_4^+ +琥珀酸	0	0
NH_4^+ +琥珀酸+ α -酮戊二酸	6.3	0
NH_4^+ +苹果酸	0	54
NH_4^+ +苹果酸+ α -酮戊二酸	9	6.8
NH_4^+ +柠檬酸	85	49
NH_4^+ +柠檬酸+ α -酮戊二酸	88	53
NH_4^+ +顺乌头酸	81	48.5
NH_4^+ +顺乌头酸+ α -酮戊二酸	85	49
NH_4^+ +异柠檬酸	89	51
NH_4^+ +异柠檬酸+ α -酮戊二酸	91	56
NH_4^+ + α -酮戊二酸	9	0

试验条件:

无细胞提取液 100 毫克, NH_4Cl (供气)200 微克分子

TGA 环上化合物(底物)100 微克分子, 磷酸盐缓冲液 350 微克分子

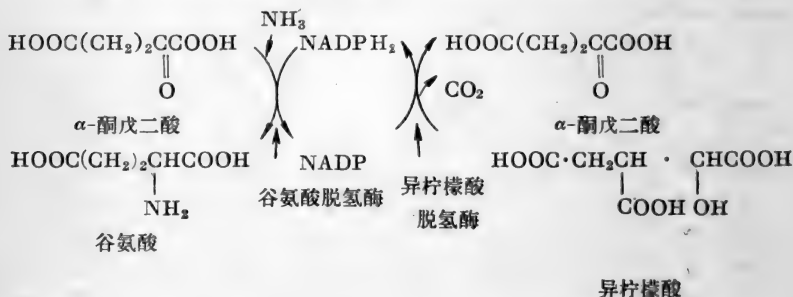
加水共配成 5 毫升溶液, 温度 37°C

培养 3 小时

从表 9-1 可以看出: 当 NH_4^+ 存在, 用 α -酮戊二酸为底物时, 谷氨酸产量甚少; 而以柠檬酸、异柠檬酸及乌头酸等三羧酸为底物时, 谷氨酸产量很高。其原因是以上三种三羧酸, 都可脱氢作为供氢体使 NADP 还原成 NADPH_2 , 以供给 α -酮戊二酸在谷氨酸脱氢酶的作用下, 还原氨基化生成谷氨酸所需的 NADPH_2 。

而 α -酮戊二酸不能使 NADP 还原，不能形成 NADPH_2 ，因而无法合成谷氨酸（试验中形成的少量谷氨酸是利用无细胞提取液中残存的 NADPH_2 生成的）。

总结以上试验证明： α -酮戊二酸转变成谷氨酸的机制为：



从上述试验还可以看出：无氧条件下谷氨酸的生成比有氧条件下的产量为高。这是由于 NADPH_2 在无氧条件下，不进入氧化途径进行氧化，大量 NADPH_2 供给还原性氨基化生成谷氨酸用；在有氧条件下，一部分 NADPH_2 进入氧化途径，减少了 α -酮戊二酸还原为谷氨酸所需 NADPH_2 的数量。所以在谷氨酸发酵中，氧的供应（通风量）必须注意掌握。应控制适量，既要保证丙酮酸逐步氧化生成足够的 α -酮戊二酸，又要控制使 NADPH_2 不进入氧化途径；供氧要适量，才利于谷氨酸生成。

四、环境条件对谷氨酸发酵的影响

谷氨酸生产菌能生长于 10% 以上高浓度的葡萄糖培养基上，生成 5% 以上高浓度的谷氨酸，除选择具有特定生理特性的菌株外，必须在特定的环境条件下才能实现。这种生理特性和环境条件主要为了适应生产的需要。

（一）供氧量

当供氧适量，谷氨酸产量增加。当供氧不足，乳酸、琥珀酸增加，这是因为缺氧时丙酮酸可加氢还原成乳酸，三羧酸环上的

草酰乙酸、延胡索酸又可加氢还原成琥珀酸。当供氧过多时， NADPH_2 进行氧化，则 α -酮戊二酸还原氨基化受阻， α -酮戊二酸增加，谷氨酸反减少。

(二) 氨离子浓度

当氨离子浓度不足， α -酮戊二酸还原氨基化量减少，谷氨酸量减少， α -酮戊二酸量增加。当氨离子浓度过高，则谷氨酸又进一步生成酰胺，谷氨酸产量也减少。当氨离子浓度适量则谷氨酸产量提高。

(三) pH

在中性或微硷性环境，有利于谷氨酸的生成。当发酵环境偏酸性时，谷氨酰胺乙酰化酶活性增加，产物中 N-乙酰谷氨酰胺增加，谷氨酸减少。

(四) 磷酸盐

过量磷酸盐能促进 EMP 途径，并增加丙酮酸和乙醛缩合生成 α -乙酰乳酸的量， α -乙酰乳酸增加，缬氨酸产量增加，谷氨酸产量下降。适量磷酸盐则有利于谷氨酸的生成。

(五) 生物素

除其他条件适宜之外，生物素的用量必须控制在亚适量（贫乏）的水平，才能保证谷氨酸大量积累。生物素是影响谷氨酸发酵最重要的因素，目前研究得最活跃的。

目前认为生物素的作用主要是改变细菌细胞膜的通透性。

将谷氨酸生产菌，培养于生物素含量不同的培养液中，发现在生物素含量多的培养液中，细菌细胞内谷氨酸含量也高，但培养液中谷氨酸的含量甚少。而在含有亚适量生物素培养液中，则正好情况相反，即细胞内谷氨酸量少，培养液中的谷氨酸含量多。

由这一实验结果可以看出，当培养液中生物素含量多时，所培养的菌体内即使用去污剂洗涤，也不能将其中谷氨酸洗出（洗出 5%）而含生物素少的菌体内的谷氨酸几乎全部（95%）都能洗出。如

表 9-2 各种条件下生长的菌体内谷氨酸及洗净而流出的谷氨酸

向培养基添加底物	菌体内谷氨酸 (微克分子/100毫克N)	由洗净而流出 (%)
生物素 3 微克/升	84	95
生物素 30 微克/升	179	5
生物素 30 微克/升		
青霉素G 2 单位/毫升 9 小时	1151	96
生物素 30 微克/升		
吐温 60 0.42% 7 小时	156	96
油酸 80 毫克/升	82	76
油酸 300 毫克/升	138	12

果加入生物素量多而又加入青霉素则由于青霉素影响细胞壁的合成,因此仍能全部(96%)洗出。加入生物素量多而又加入吐温60则同样能全部洗出(96%),这说明生物素过多能降低细胞膜的透性。

前面,已指出生物素是催化脂肪酸合成多酶体系的辅酶,而脂肪酸又是细胞膜脂蛋白的重要成分。生物素不足时,细胞膜的结构发生改变。易于渗漏,而使谷氨酸从细胞内漏入培养液中,便于分离和提取。油酸是细胞膜磷脂的成分,当油酸加入量增加到 300 毫克/升,使细胞膜磷脂的成分发生变化,细胞膜通透性减少。则谷氨酸洗净流出的%也减少。这也是生物素改变细胞膜通透性的另一证明。

因此,现在认为生物素的作用主要是改变细胞膜的通透性,促进谷氨酸渗出,提高谷氨酸的产量。生物素改变细胞膜通透性的机制可能与影响磷脂的含量及成分有关。

第七节 氨基酸与糖、脂肪代谢的相互联系

氨基酸与糖脂肪间可以互变。

氨基酸脱去氨基后生成的酮基酸可以转变为糖，也可以转变成脂肪酸、甘油；又可经还原性氨基化合成氨基酸、蛋白质；所以酮基酸是联系蛋白质代谢、糖代谢、脂肪代谢的桥梁。氨基酸、糖与脂肪代谢之间的联系主要表现在三者可以互相转变、互相制约，并具有共同的完全氧化的途径。

一、氨基酸与糖代谢的联系

糖类虽不能直接转变成蛋白质，但糖分解过程中可产生许多 α -酮基酸(如丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸)，这些酮基酸经氨基化作用或转氨作用可产生氨基酸，由氨基酸可以再合成蛋白质。工业发酵往往以糖质原料为主，以铵盐或尿素为氮源，此时即通过糖代谢转变成酮基酸，再经酮基酸还原性氨基化合成氨基酸，从而进一步合成蛋白质。另一方面，蛋白质也可以转变成糖。蛋白质分解产生氨基酸，氨基酸脱氨后产生 α -酮基酸，经转变成丙酮酸后可再合成糖。培养基中糖供应不足。氨基酸供应过多，或当菌体处于饥饿营养不足时即可出现分解氨基酸转变成合成细胞成分所必需的糖。

二、氨基酸与脂肪代谢的联系

氨基酸脱氨后的酮基酸，可以形成中间产物乙酰-CoA，进而合成脂肪酸；酮基酸又可通过形成中间产物丙酮酸而合成甘油；再由甘油、脂肪酸合成脂肪。甘油和脂肪酸也可形成中间产物乙酰-CoA，再合成还原性氨基化所必要的酮基酸，进一步合成氨基酸。一般发酵工业由于培养基中糖质原料多于脂肪，因此由脂肪转变成氨基酸或氨基酸转变成脂肪的情况实际上不多。

三、糖与脂肪代谢的联系

糖可以转变成脂肪。糖代谢通过形成磷酸二羟基丙酮，及乙酰-CoA 可分别形成甘油及脂肪酸，再合成脂肪。一般发酵工业

所用培养基中脂肪很少，但微生物成分中各种脂类都可以形成，也是一个证明。脂肪中的甘油部分通过磷酸二羟基丙酮可以合成糖。脂酸虽也可通过乙酰-CoA 进入三羧酸环形成 α -酮戊二酸、草酰乙酸，再间接形成丙酮酸合成糖，但毕竟量少，且在培养基糖多于脂肪的条件下，实际脂肪酸转变成糖较少。

此外，无论氨基酸还是糖或脂肪，通过不同的代谢途径在生成乙酰-CoA 之后，都可以进入三羧酸循环，彻底氧化成二氧化碳和水，放出能量。很明显，三羧酸循环是氨基酸、糖、脂肪三类物质共同的分解产能的途径。在三羧酸环上 α -酮戊二酸、草酰乙酸又与谷氨酸，天冬氨酸密切联系，所以三羧酸循环又是三类物质互相转变的枢纽。

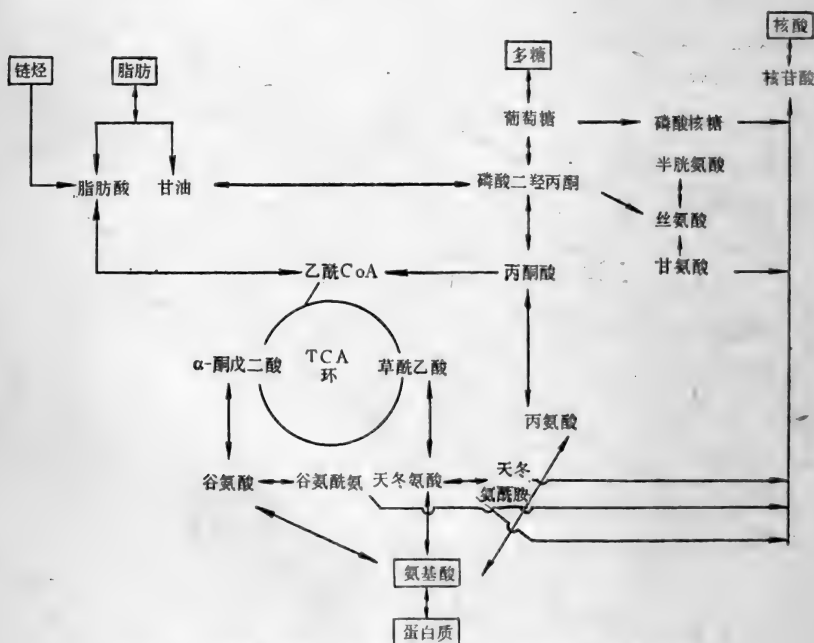


图 9-13 蛋白质、氨基酸、糖、脂肪代谢联系示意图

再则，糖代谢通过HMP途径生成的5-磷酸核糖是合成核苷酸时核糖和磷酸的原料；甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺等又是合成嘌呤、嘧啶的原料(第十、十一章)。可见糖代谢、氨基酸代谢与核酸合成关系密切。烃类发酵时链烃通过氧化成脂肪酸而进一步被利用。现将蛋白质、氨基酸、糖、脂代谢的联系示意于图9-13(包括参予核苷酸的合成)。

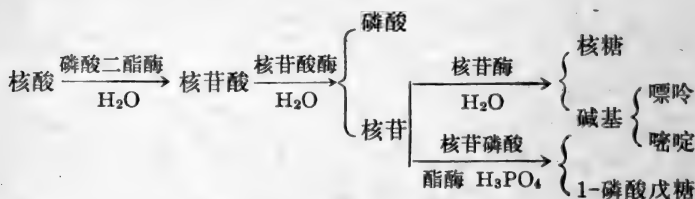
复 习 题

1. 蛋白质是怎样水解成氨基酸的？
2. 氨基酸是怎样脱氨基的？
3. 脱下的氨如何进行代谢？
4. 酮基酸有哪些代谢途径？
5. 什么是氨基酸的脱羧基作用？
6. 试述磷酸吡哆醛(或胺)在氨基酸代谢中的作用。
7. 哪些氨基酸与酒精发酵中杂醇油的生成关系密切？
8. 支链氨基酸及带苯核氨基酸合成有何特点？
9. 氨基酸代谢与糖和脂肪是怎样联系起来的？
10. 试述谷氨酸发酵的代谢机制。
11. 氨基酸代谢和糖、脂肪代谢相比，有何共性和特性？

第十章 核苷酸代谢

第一节 核酸的降解与有关的酶

动物和异养型微生物可以分泌消化酶类，分解食物或体外的核酸类物质，以获得各种核苷酸。核苷酸还可以水解脱去磷酸而生成核苷，核苷再分解生成嘌呤碱或嘧啶碱和糖。核苷酸及其水解产物均可被细胞所吸收和利用。所有生物的细胞都含有核酸代谢有关的酶类，能够分解细胞内各种核酸促使核酸分解更新，在体内核酸的水解产物——糖可参加戊糖代谢；嘌呤和嘧啶还可以进一步分解。核酸的分解过程如下：



一、核酸的解聚作用

核酸是由许多核苷酸以 3'、5'-磷酸二酯键连接而成的大分子化合物。核酸分解的第一步是水解连接核苷酸之间的磷酸二酯键，而生成低级多核苷酸或单核苷酸，在生物体内有许多磷酸二酯酶可以催化这一解聚作用，特异性强，只能作用于核酸的磷酸二酯酶，称为核酸酶；水解核糖核酸的叫核糖核酸酶 (RNase)，水解脱氧核糖核酸的叫核糖核酸酶 (DNase)，核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶能够水解核酸分子内的磷酸二酯键，因此又称为核酸

内切酶。对能水解 DNA 的磷酸二酯酶简称限制酶，它们与以往发现的 DNase 相比，在碱基专一性及磷酸二酯键的断裂方式上有其特殊性，使它特别适合于作为 DNA 结构与功能等方面研究的工具酶，在遗传工程研究中，限制酶被认为起决定性作用。

有些非特异性的磷酸二酯酶，例如蛇毒磷酸二酯酶和牛脾磷酸二酯酶，对核糖核酸和脱氧核糖核酸(或低级多核苷酸)都能分解。它们能从多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸链的一端逐个水解下核苷酸，因此又称为核酸外切酶。蛇毒磷酸二酯酶是从多核苷酸链的 3'-羟基端开始，逐个水解下 5'-核苷酸。牛脾磷酸二酯酶

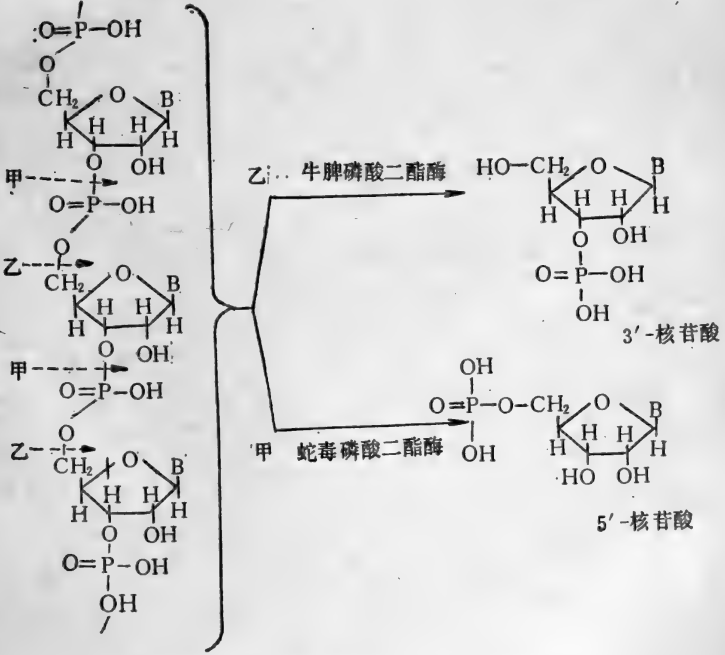


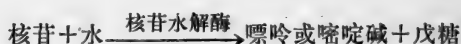
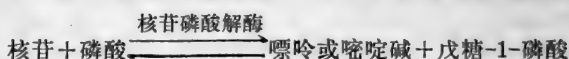
图 10-1 磷酸二酯酶对核酸的水解位置
甲—蛇毒磷酸二酯酶的作用部位
乙—牛脾磷酸二酯酶的作用部位
B—碱基

二酯酶则相反，从游离 5'-羟基端开始，逐个水解下 3'-核苷酸，由于水解的位置不同，因而所得的核苷酸可以是 3'-核苷酸（牛脾磷酸二酯酶），或是 5'-核苷酸（蛇毒磷酸二酯酶），见图 10-1。

二、核苷酸的降解

核苷酸水解下磷酸即生成核苷，生物体内广泛存在的磷酸单酯酶或核苷酸酶可以催化这个反应。非特异性的磷酸单酯酶对一切核苷酸都能作用，无论磷酸基在核苷的 2'、3'或 5'位置上都可被水解下来，某些特异性强的磷酸单酯酶只能水解 3'-核苷酸或 5'-核苷酸，则分别称为 3'-核苷酸酶或 5'-核苷酸酶。

核苷经核苷酶作用分解为嘌呤碱或嘧啶碱和糖。分解核苷的酶有两类：一类是核苷磷酸解酶，另一类是核苷水解酶，前者分解核苷生成含氮碱和糖的磷酸酯；后者生成含氮碱和糖；



核苷磷酸解酶存在比较广泛，所催化的反应是可逆的。核苷水解酶主要是在植物和微生物体内发现的，并且只能对核糖核苷作用，对脱氧核糖核苷没有作用，反应是不可逆的。它们对作用底物常具有一定的特异性。

核苷酸的降解产物嘌呤和嘧啶还可以继续降解，不同种类的生物分解嘌呤或嘧啶的能力不一样，因而代谢产物亦各不相同。某些微生物能利用嘌呤或嘧啶作为碳源、氮源和能源。动物分解嘌呤为尿酸或尿囊素。微生物分解嘌呤生成氨、二氧化碳，以及各种有机酸如甲酸、乙酸、丙酸、乳酸等；嘧啶最后也分解为氨、二氧化碳和水等。其详细过程在此不再详述。

第二节 核苷酸的生物合成

除少数微生物外，大多数微生物都能合成各种嘌呤和嘧啶核苷酸。在发酵工业上已利用微生物来进行嘌呤类核苷酸与核苷的生产，称核苷酸发酵。

一、嘌呤核糖核苷酸的合成

用同位素标记的化合物做实验，证明生物体内能利用二氧化碳、甲酸盐、谷氨酰胺、天冬氨酸和甘氨酸作为合成嘌呤环的前体。如图 10-2 所示。

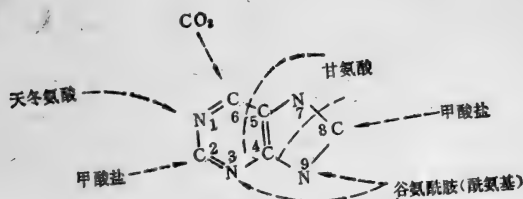


图 10-2 嘌呤环的元素来源

目前关于嘌呤的合成途径已经了解得比较清楚，生物体内不是先合成嘌呤，再与核糖和磷酸结合成核苷酸，而是从 5-磷酸核糖开始，经过一系列酶促反应，生成次黄嘌呤核苷酸，然后再转变为其他嘌呤的核苷酸。

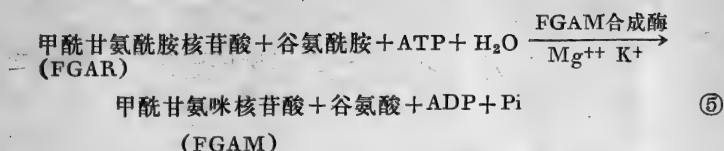
(一) 次黄嘌呤核苷酸的合成

次黄嘌呤核苷酸的合成是一系列连续的酶促反应过程，为便于学习，可将其分为五个主要阶段说明。

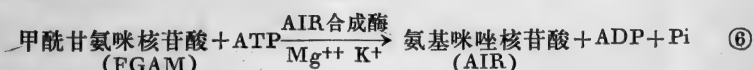
第一阶段的反应：

生物体内 5-磷酸核糖主要由己糖单磷酸途径提供，5-磷酸核糖在 ATP 作用下生成 5-磷酸核糖焦磷酸(反应①)。催化这一反应的酶为 5-磷酸核糖焦磷酸激酶。

可由 Mg^{++} 和 K^+ 所激活。

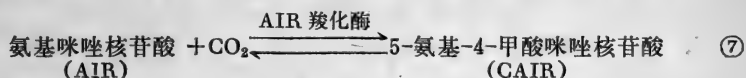


在有 ATP 存在时，甲酰甘氨酸核苷酸经氨基咪唑核苷酸合成酶的作用转变成氨基咪唑核苷酸，这个作用可被 Mg^{++} 和 K^+ 所激活。

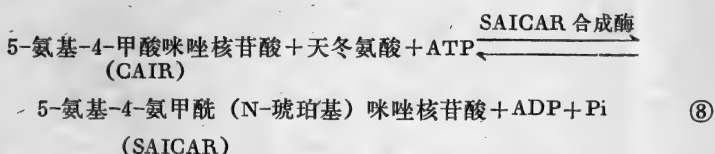


第四阶段的反应：

在氨基咪唑核苷酸羧化酶的催化下，氨基咪唑核苷酸可与二氧化碳反应，生成 5-氨基-4-甲酸咪唑核苷酸，反应是可逆的。

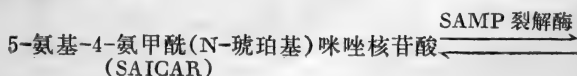


在有 ATP 存在时，5-氨基-4-甲酸咪唑核苷酸与天冬氨酸缩合成 5-氨基-4-氮甲酰 (N-琥珀基) 咪唑核苷酸 (SAICAR)，反应是由 SAICAR 合成酶所催化的。



在腺嘌呤核苷酸琥珀酸 (SAMP) 裂解酶的催化下，5-氨基-4-氮甲酰 (N-琥珀基) 咪唑核苷酸被分解脱去一分子延胡索酸而转变成 5-氨基-4-氮甲酰咪唑核苷酸。

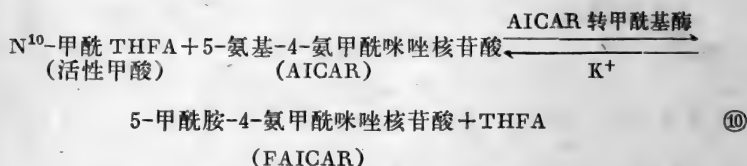
由于此裂解酶同时具有分解腺嘌呤核苷酸琥珀酸的能力，故称为 SAMP 裂解酶。



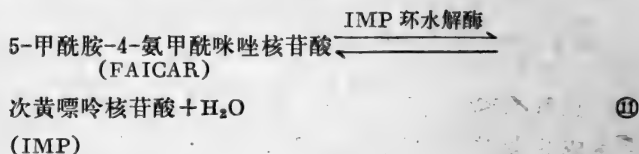
5-氨基-4-氨甲酰咪唑核苷酸 + 延胡索酸 ⑨

第五阶段反应:

在以 N^{10} -甲酰四氢叶酸供给甲酰基的情况下, 5-氨基-4-氨甲酰咪唑核苷酸经甲酰化生成 5-甲酰胺-4-氨甲酰咪唑核苷酸 (反应⑩), 催化这个反应的酶为 5-氨基-4-氨甲酰胺咪唑核苷酸转甲酰酶, 反应是可逆的。



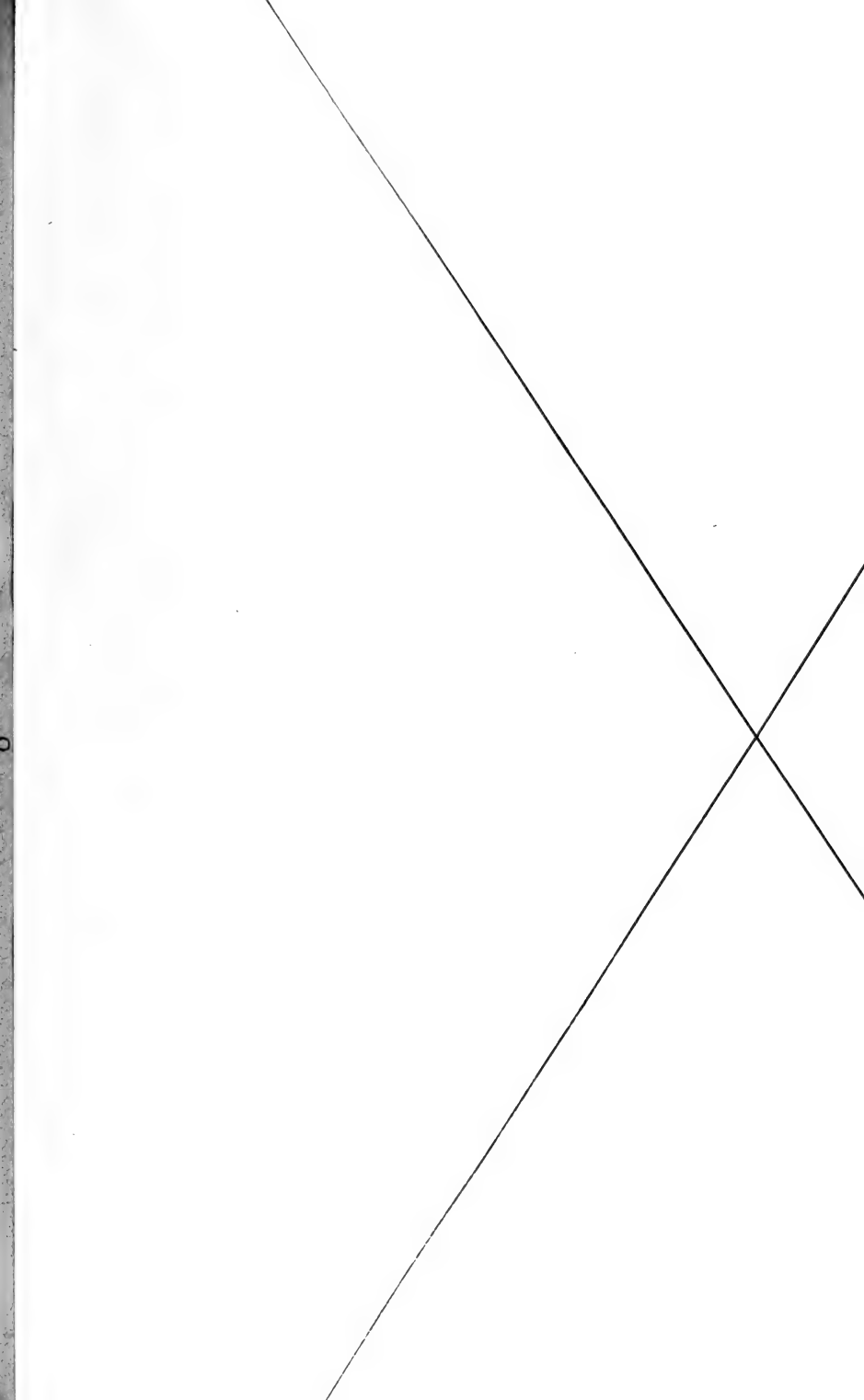
5-甲酰胺-4-氨甲酰咪唑核苷酸在次黄嘌呤核苷酸环水解酶作用下脱水环化, 形成次黄嘌呤核苷酸。



叶酸的衍生物四氢叶酸 (THFA) 是一碳单位的载体, 它在嘌呤和嘧啶核苷酸中起着重要作用, 因此叶酸的拮抗物, 如氨基嘌呤, 氨甲嘌呤能强烈抑制核苷酸的合成。现将次黄嘌呤核苷酸的酶促合成总结于插图。

(二) 腺嘌呤核苷酸 (AMP) 的合成

生物体内由次黄嘌呤核苷酸氨基化生成腺嘌呤核苷酸, 次黄嘌呤核苷酸在 GTP 供给能量的条件下与天冬氨酸合成腺苷酸琥珀酸, 此反应由腺苷酸琥珀酸合成酶所催化, 酶的活性需要镁离子激活, 中间产物腺苷酸琥珀酸随即在腺苷酸琥珀酸裂解酶的催化下分解成腺嘌呤核苷酸和延胡索酸, 反应过程见 397 页。

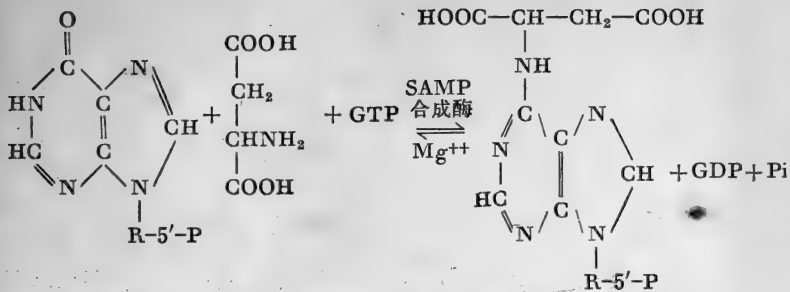


第
在
甲酰咪
(反应①
转甲酰

N¹⁰

5-
作用下

叶
呤和嘧
呤，氨
酶促合
(二
生
嘌呤核
珀酸，
子激活
化下分

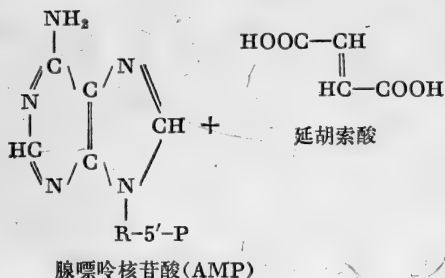


次黄嘌呤核苷酸,

天冬氨酸(IMP)

腺苷酸琥珀酸(SAMP)

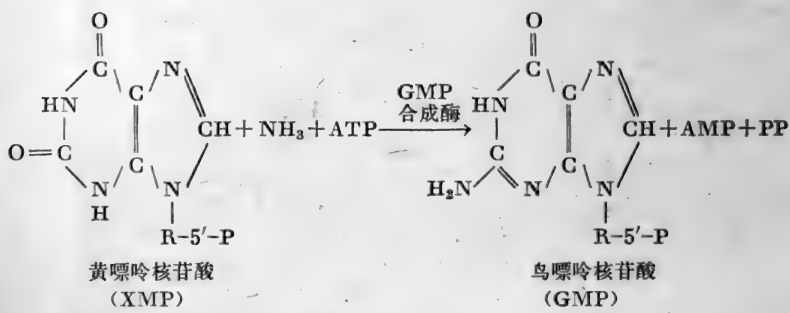
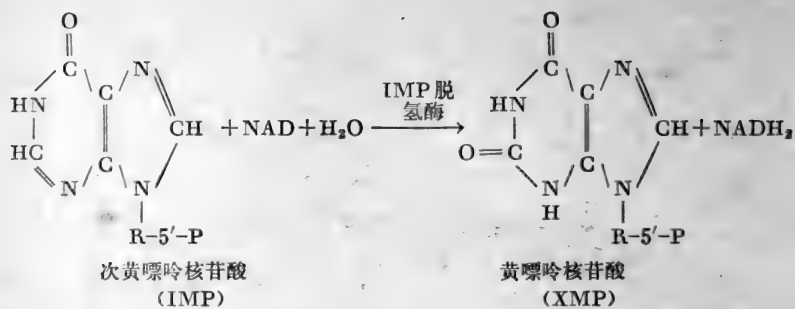
↓ SAMP
裂解酶



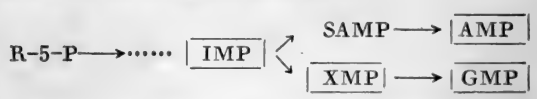
腺嘌呤核苷酸(AMP)

(三) 鸟嘌呤核苷酸的合成

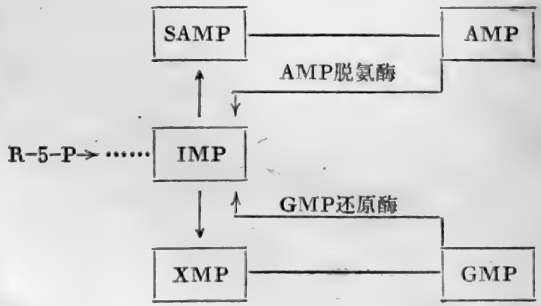
次黄嘌呤核苷酸经氧化生成黄嘌呤核苷酸，反应由次黄嘌呤核苷酸脱氢酶所催化，并需要 NAD 为辅酶和 K^+ 活化，黄嘌呤核苷酸再经氨基化即生成鸟嘌呤核苷酸。细菌直接以氨作为氨基供体；动物细胞则以谷氨酰胺的酰胺基作为氨基供体。氨基化时需要 ATP。促使黄嘌呤氨基化生成鸟嘌呤核苷酸的酶称为鸟嘌呤核苷酸合成酶或黄嘌呤转酰胺酶，动物细胞中的酶需要镁离子活化。



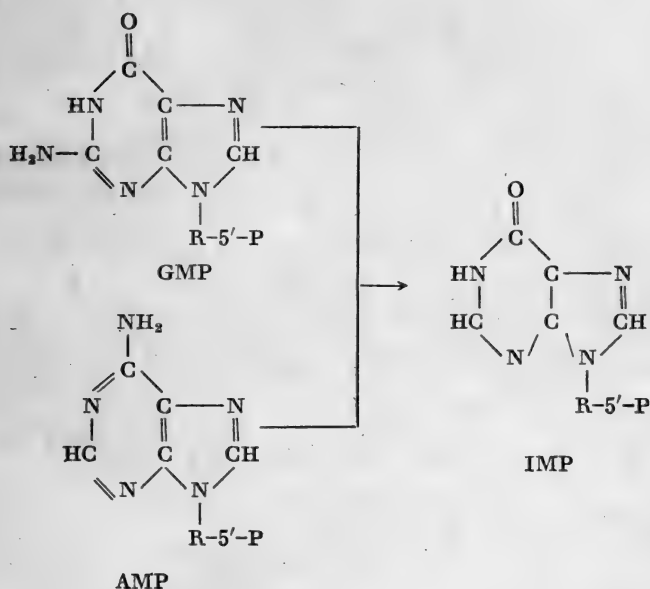
现将嘌呤核苷酸合成途径总结如下：



不同微生物合成嘌呤核苷酸的途径也不同，如大肠杆菌，产氨短杆菌都是按上述途径进行合成的，但枯草杆菌的合成途径则有些不同，介绍如下：

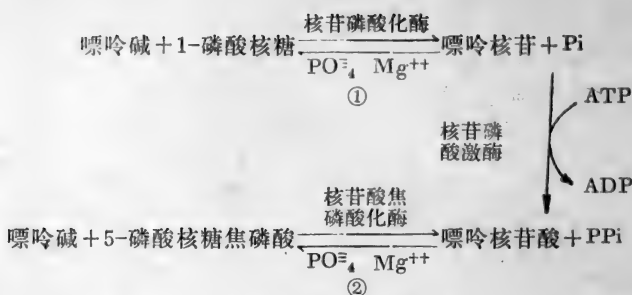


这条途径的特点是形成了两条环形路线而使GMP与AMP可以互相转变，这是因它具有AMP脱氨酶与GMP还原酶之故，因而使这四种嘌呤核苷酸能相互转变，其反应式如下：



(四) 嘌呤核苷酸的其他合成途径

生物体内除上述方式合成嘌呤核苷酸外，尚能利用已有的嘌呤碱和核苷形成嘌呤核苷酸。现已知道，嘌呤碱与1-磷酸核糖通过核苷磷酸代酶的作用，可以生成嘌呤核苷，后者再经核苷磷酸激酶的作用，由ATP供给磷酸基，即形成嘌呤核苷酸。嘌呤碱与5-磷酸核糖焦磷酸通过核苷酸焦磷酸化酶的作用也可以形成嘌呤核苷酸。它们的反应如下：



同样，鸟嘌呤可以合成鸟苷酸，腺嘌呤可以合成腺苷酸。这种利用外界供给嘌呤碱基来合成相应的嘌呤核苷酸的途径称半合成途径或补救合成途径。因为在此途径中，并非整个化合物都是生物体自己合成的，而一半来自外界。相应地前面的途径称全合成途径。在核苷酸发酵生产中则分别称为半合成法与全合成法。核苷的发酵法生产，可以半合成法中途径①进行。

嘌呤核苷和嘌呤核苷酸都是核酸的代谢中间产物，在正常生理条件下这些产物的含量都保持在一定水平上，不会过分积累。

现将嘌呤核苷酸全合成及补救合成总结如下：



图 10-3 嘌呤核苷酸全合成及补救合成途径

注：在补救合成中

- ① 由腺嘌呤合成腺苷酸
- ② 由次黄嘌呤合成次黄嘌呤核苷酸
- ③ 由鸟嘌呤合成鸟苷酸

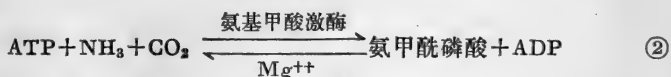
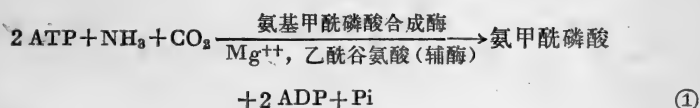
二、嘧啶核糖核苷酸的合成

已知，嘧啶核苷酸是由氨、二氧化碳、天冬氨酸和5-磷酸核糖为前体合成的。合成过程需要ATP供给能量，在生物体内首先合成尿嘧啶核苷酸，然后再转变为其他嘧啶核苷酸。

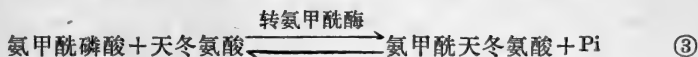
(一) 尿嘧啶核苷酸的合成

由氨、二氧化碳和ATP作用首先形成氨甲酰磷酸，再与天冬氨酸反应合成氨甲酰天冬氨酸，然后闭环并被氧化生成乳清酸。乳清酸与5-磷酸核糖焦磷酸作用生成乳清苷酸，脱羧后就成为尿嘧啶核苷酸。

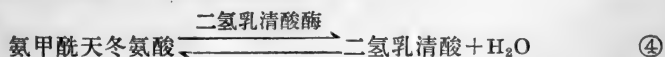
生物体内的氨甲酰磷酸可以有多种来源，但主要是由氨、二氧化碳和ATP合成的。这一步在动物体内是由氨甲酰磷酸合成酶所催化，在细菌和植物体内为氨基甲酸激酶所催化，其反应如下：



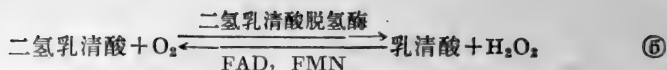
氨甲酰磷酸在天冬氨酸转氨甲酰酶的作用，给出氨甲酰部分并转移至天冬氨酸的 α -氨基上，形成氨甲酰天冬氨酸。



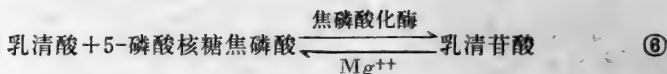
氨甲酰天冬氨酸通过可逆的环化脱水作用转变成二氢乳清酸。催化这步的酶为二氢乳清酸酶。



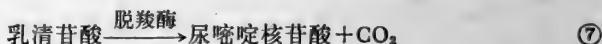
二氢乳清酸随后在二氢乳清酸脱氢酶催化下被氧化成乳清酸。该酶是一含铁的黄素酶，在以氧为受氢体时生成过氧化氢。



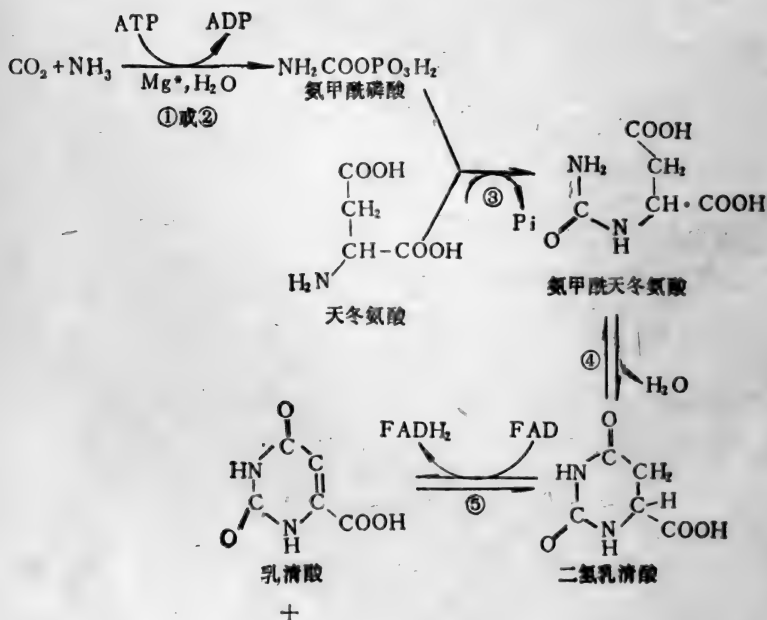
乳清酸是合成尿嘧啶核苷酸的重要中间产物，至此已形成嘧啶环，而后再和 5-磷酸核糖焦磷酸相连接生成乳清苷酸。催化乳清酸与 5-磷酸核糖焦磷酸作用的酶，称为乳清苷酸焦磷酸化酶，镁离子可以活化此反应。

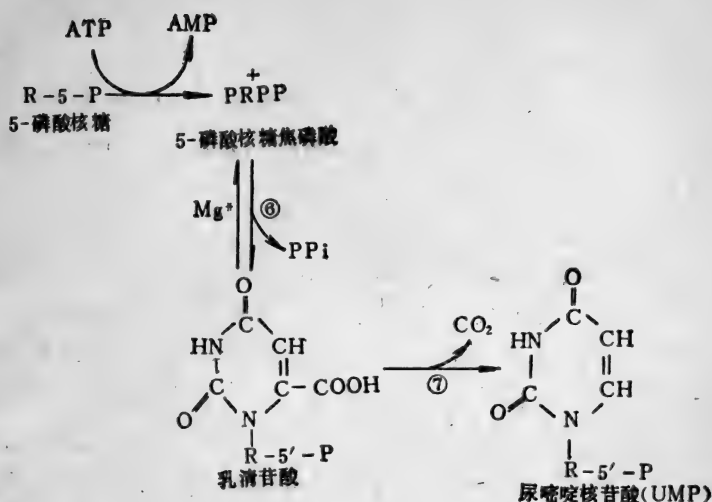


乳清苷酸在乳清苷酸脱羧酶作用下脱去羧基，即生成尿嘧啶核苷酸。



尿嘧啶核苷酸的酶促合成过程如下：

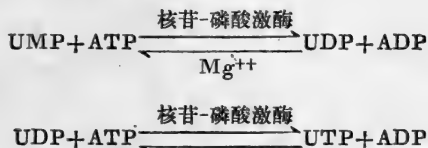




催化以上反应的各种酶，已在大肠杆菌中发现，当突变株缺陷二氢乳清酸脱氢酶时，必须自外界供应尿嘧啶、胞嘧啶或乳清酸才能生长。

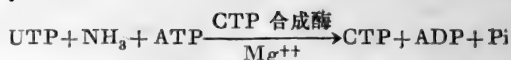
(二) 胞嘧啶核苷酸的合成

由尿嘧啶核苷酸转变为胞嘧啶核苷酸是在尿嘧啶核苷三磷酸的水平上进行的，尿嘧啶核苷三磷酸可以由尿嘧啶核苷酸在磷酸激酶作用下经 ATP 转移磷酸而生成。



尿嘧啶、尿嘧啶核苷和尿嘧啶核苷酸都不能和氨作用变为相应的胞嘧啶化合物，尿嘧啶核苷三磷酸则能氨基化生成胞嘧啶核苷三磷酸。在细菌中，尿嘧啶核苷三磷酸直接与氨作用，反应需要 ATP 供给能量，催化此反应的酶为胞嘧啶核苷三磷酸合成酶，

反应式如下：



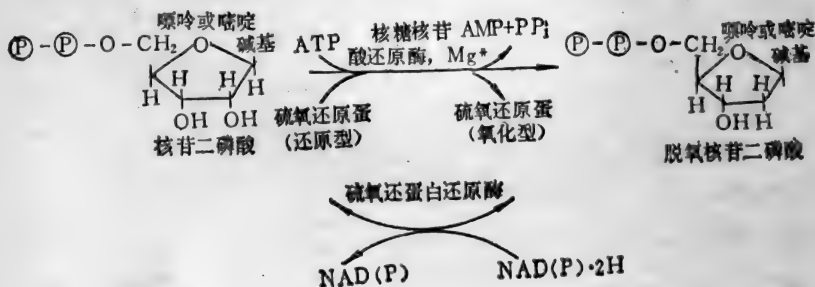
在动植物组织中，由谷氨酰胺供给氨基，并且需要 GTP 供给能量，该酶称为胞嘧啶核苷酸(AMP)合成酶。

三、脱氧核糖核苷酸的合成

脱氧核糖核酸是以四种脱氧核糖核苷酸聚合而成的，脱氧核糖核苷酸可以由核糖核苷酸还原形成。腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶脱氧核糖核苷酸由相应的核糖核苷酸经还原，将核糖第二位碳原子上的氧脱去，直接转变而成。胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸则需经过两个步骤，首先由尿嘧啶核糖核苷酸还原形成尿嘧啶脱氧核糖核苷酸，后者再经甲基化，将尿嘧啶转变成胸腺嘧啶。

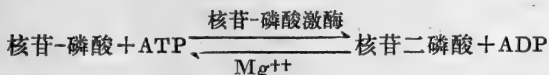
(一) 核糖核苷酸的还原

在生物体内，四种核糖核苷酸均可被还原成相应的脱氧核糖核苷酸，由细菌和动物组织中已分别提取出催化此还原反应的核糖核苷酸还原酶，酶活性由镁离子所激活。核糖核苷酸的还原需要由一种分子量较小，对热稳定，具有二硫醇形式的含硫蛋白质，即还原型硫氧还蛋白(Thioredoxin)作为天然的还原剂，并且需要 ATP 供给能量。氧化型硫氧还蛋白可在硫氧还蛋白还原酶作用下，由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸供给氢而被还原，通常核糖核苷酸是在核苷二磷酸的水平上被还原的，其还原过程如下：



有关核糖核苷酸还原酶的特异性和作用机制了解得很少，有待进一步研究解决。

四种核苷二磷酸可在核苷二磷酸激酶作用下，由 ATP 供给磷酸基而形成。

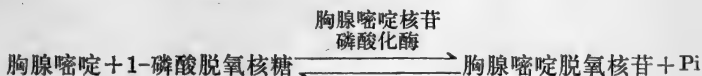


(二) 胸腺嘧啶核苷酸的合成

胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)是脱氧核糖核酸的组成成分，它的合成途径有二。

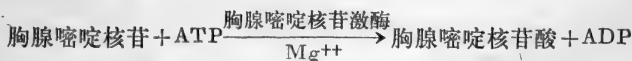
(1) 由尿嘧啶脱氧核糖核苷酸(dUMP)经甲基化而生成 催化尿嘧啶脱氧核糖核苷酸甲基化的酶称为胸腺嘧啶核苷酸合成酶。甲基化的供体是 N^5, N^{10} -亚甲基四氢叶酸，其反应见 406 页。

(2) 由碱基合成胸腺嘧啶脱氧核苷酸 许多生物能利用外源的胸腺嘧啶和 1-磷酸脱氧核糖以合成胸腺嘧啶核苷酸。由动物组织中提取得到的胸腺嘧啶核苷磷酸化酶可以催化胸腺嘧啶和 1-磷酸脱氧核糖合成胸腺嘧啶核苷。

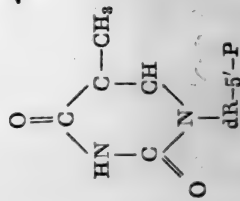
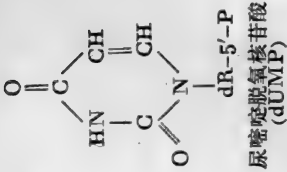


上式中 1-磷酸脱氧核糖可由 5-磷酸脱氧核糖经变位酶作用转变而成，后者则由 3-磷酸甘油醛与乙醛经缩合酶作用缩合而成。

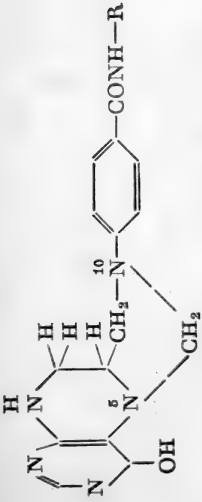
胸腺嘧啶脱氧核苷在胸腺嘧啶核苷激酶催化下，由 ATP 供给磷酸基而形成胸腺嘧啶核苷酸。胸腺嘧啶核苷酸酶已由细菌中提取得到。



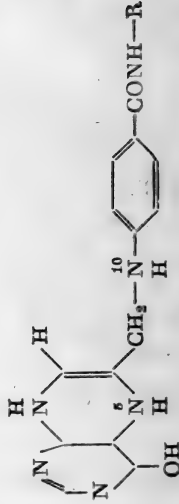
胸腺嘧啶核苷酸在胸腺嘧啶核苷一磷酸激酶和核苷二磷酸激



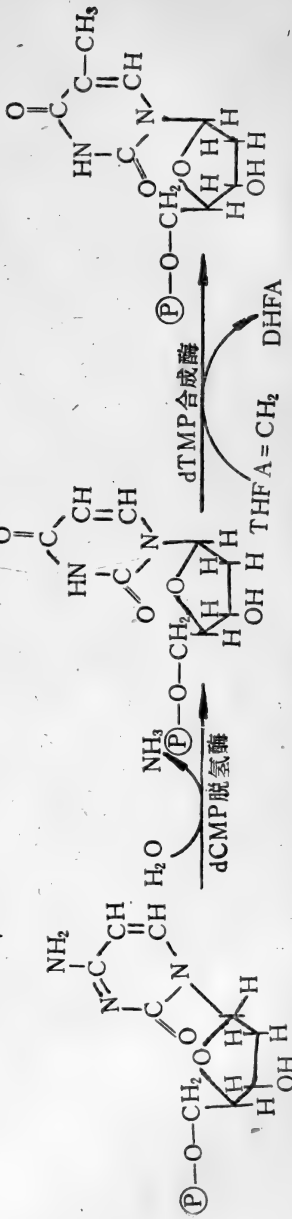
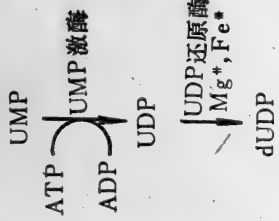
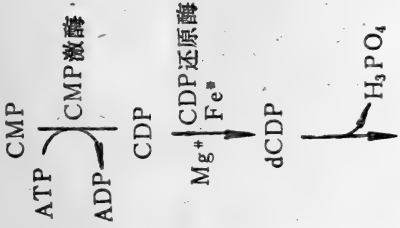
TMP
合成酶



5, N¹⁰-亚甲基四氢叶酸
(活性甲基)



二氢叶酸
(DHFA)



2-脱氧胞苷 5'-磷酸 (dCMP)

2-脱氧尿苷 5'-磷酸 (dUMP)

2-脱氧胸苷 5'-磷酸 (dTMP)

酶的催化下，与 ATP 反应而生成胸腺嘧啶核苷二磷酸和胸腺嘧啶核苷三磷酸。后者可参加脱氧核糖核酸的合成。407 页的图为 dGMP、dUMP 和 dTMP 的合成途径。

复 习 题

1. 试述核酸降解有关的酶及其作用机制。
2. 生物体内怎样由次黄嘌呤核苷酸生成腺嘌呤核苷酸和鸟嘌呤核苷酸。
3. 枯草杆菌合成嘌呤核苷酸与产氨短杆菌合成嘌呤核苷酸的途径有何异同？

第三篇 遗传的分子基础及 代谢的调节控制

第十一章 遗传的分子基础

核酸是生物体的主要生命物质之一。近十几年来分子生物学的迅速发展充分证明：核酸与生物体的新陈代谢，生命起源，遗传变异，病毒的感染以及蛋白质的生物合成都有非常密切的关系。

脱氧核糖核酸是遗传变异的主要物质基础，通过 DNA 的自我复制把遗传信息一代一代地传下去，换言之，生物体的遗传特征主要由核酸来决定，而生物体的生命活动则又要通过蛋白质的活动来实现，并认为生物体的遗传特征主要就是以密码的形式编录于 DNA 分子上，表现为特定的核苷酸排列顺序。DNA 通过半保留复制把遗传信息传递下去。凡是能引起 DNA 变化的物理化学因素，都能引起微生物变异，为微生物诱变育种奠定了理论基础，种的变异与核酸有密切关系。

目前有关核酸结构与功能的研究是分子生物学的主要内容，对阐明遗传变异的本质是十分重要的，因此，核酸的研究对促进生物学的进展有其理论与实践意义。

第一节 核酸的生物合成

核酸是分子量很大的高聚物，其结构单位是核苷酸，所以核

酸是一个由四种核苷酸聚合的大分子物质。根据核酸的化学结构分为核糖核酸和脱氧核糖核酸，现分述其生物合成过程。

一、DNA 的生物合成

DNA 是遗传的主要物质基础，是基因的化学本质。DNA 的最重要的功能活动就是自我复制，将其贮存的遗传信息传给子代。除去偶尔的突变以外，母细胞分裂形成的两个子细胞中的每一个都含有其母细胞遗传物质的一分精确的复本。其二是 DNA 所提供的信息控制着专一的酶蛋白类的合成，而后者又返过来在生长的细胞内调节代谢反应。DNA 本身是遗传信息的载体，因之 DNA 的合成方式有它的特殊性。

一般，生物体内酶反应产物的结构是由酶对底物的作用来决定的。但是核酸合成酶是能利用多种底物进行反应的酶，它只识得那核苷酸前体的规则的糖——磷酸部分，所以不能确定产物核酸结构中碱基的排列顺序。可以明显的看到，DNA 酶促合成产物的碱基比例与模板 DNA 一样，因之 DNA 是自我复制的直接模板，它以半保留方式进行自我复制。

(一) DNA 半保留复制

DNA 的自我复制是 DNA 特有的生物合成方式。复制时，亲代 DNA 的双股螺旋之间氢键断裂并分开为两条单链，各条单链并作为模板，在聚合酶的催化下，利用体系中存在的四种脱氧核苷三磷酸为前体通过碱基配对原则(A=T G≡C)便以氢键相结合并通过磷酸二酯键形成释放出焦磷酸，从而合成了两条互补的新链(子代 DNA)，其生成的两条双股螺旋的子代 DNA 与原来的 DNA 分子(亲代 DNA)完全相同。螺旋中的一股来自亲代，另一股是新合成的。DNA 分子的这种复制方式称半保留复制(指子代 DNA 链中保留了一条旧的链)。见图 11-1。

这一假设在一九五八年用浮力密度梯度离心法将经 N^{15} 标记的大肠杆菌 DNA 试验获得证实。

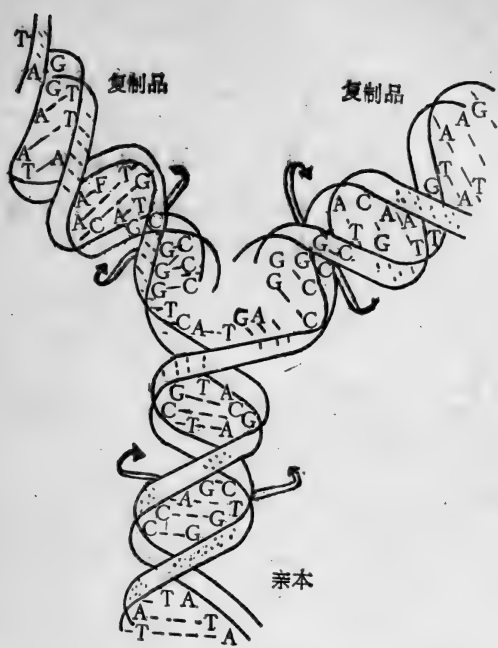


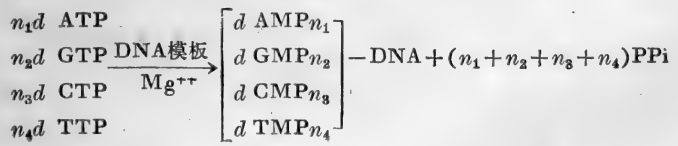
图 11-1 半保留复制模型

箭头指的是亲本螺旋伴随着子螺旋形成而解开时所需的旋转方向。
 两条新合成的链是以向下的方向进行生长。

(二) 以 DNA 为模板的酶促合成

DNA 的酶促合成概括为按下列三个主要阶段进行：

- (1) 形成脱氧核糖核苷酸。
- (2) 通过适当的激酶，把它们磷酸化为脱氧核糖核苷三磷酸。
- (3) 在有 Mg^{++} 和适当的模板存在的条件下通过 DNA 聚合酶的作用，脱氧核糖核苷三磷酸聚合为 DNA。



所有已知 DNA 聚合酶催化的基本反应是 DNA 模板 指导的脱氧核苷三磷酸的缩合反应。合成是从 3'-OH 末端进行，合成中的链是从 5'→3' 方向延伸，每掺入一个脱氧核苷酸释放一个焦磷酸分子。

这个合成反应的机制涉及脱氧核糖多核苷酸链生长末端上的 3'-OH 对焦磷酸活化的 5'-脱氧核糖核苷酸进行亲核攻击。见图 11-2。每释放一个无机焦磷酸，链便加长了一个单位。

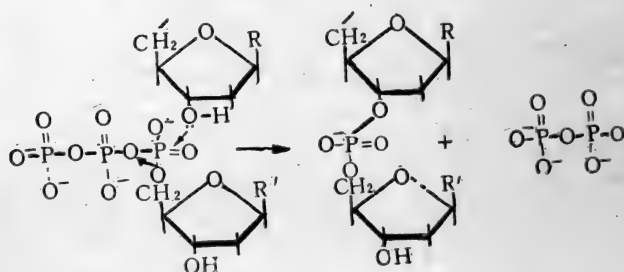


图 11-2 DNA 聚合酶的作用机制

迄今所发现的 DNA 聚合酶都是按 5' 至 3' 的方向合成 DNA 的，所以只能复制双链中的一条，另一条 3' 至 5' 方向的链不能以同样的方式进行复制。而认为它的合成是不连续性的，仍按 5' 至 3' 的方向合成一个一个 DNA 短片，经研究测定其长度为 10^3 核苷酸的短链，然后再通过 DNA 连接酶将 DNA 片段连接起来，形成一条连续的多核苷酸链，尽管该链沿 3' 至 5' 方向延长，但实际上合成仍按 5' 至 3' 方向进行。因之，DNA 双链中的两条链都是按同一方向(5'→3')合成的。见图 11-3。

(三) DNA 聚合酶

DNA 聚合酶基本上有两类：一类是以 DNA 为模板的 DNA 聚合酶，在所有正常细胞中都有。一类是以 RNA 为模板的 DNA 聚合酶，存在于某些癌肿 RNA 病毒以及一些正常细胞和胚胎之

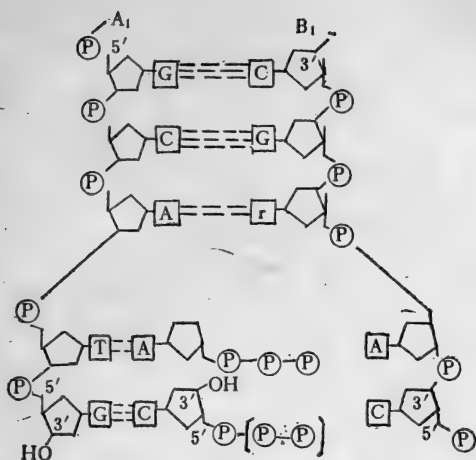


图 11-3 大肠杆菌 DNA 聚合酶的作用机制示意图
合成是按箭头方向进行的，起始 DNA 的 A 链作为模板

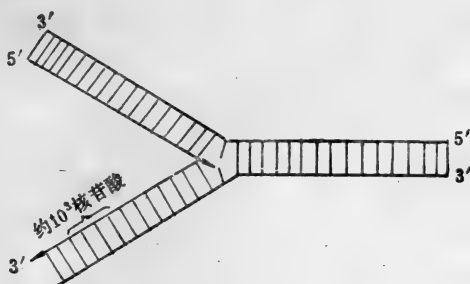


图 11-4 在 DNA 复制点形成短链

中，一般称为反转录酶。

根据目前的资料，大肠杆菌的以 DNA 为指导的 DNA 聚合酶有三种，其他微生物中也有不同的 DNA 聚合酶。今以大肠杆菌的三种聚合酶介绍如下：

1. DNA 聚合酶 I (Pol I)

DNA 聚合酶 I 在每个大肠杆菌细胞内约有 400 个分子，是分子量为 109000 的单一多肽链，含有一个锌原子。进行聚合反应时，必须有 Mg^{++} 或 Mn^{++} 。这个酶除了有 DNA 合成酶的活性以外，还能催化单股核酸 $3' \rightarrow 5'$ 方向外切降解和双链 DNA 的 $5'$ 末端按 $5' \rightarrow 3'$ 方向外切降解。DNA 聚合酶 I 的 $3' \rightarrow 5'$ 外切酶活力是 DNA 聚合酶功能的一个必要部分。它的作用是识别并切除 $3'$ 末端的错配(非配对)碱基，起校正功能，以保证 DNA 复制的真实性。DNA 聚合酶 I 的 $5' \rightarrow 3'$ 外切核酸酶活性负责去除引物 RNA。并能切除碱基配对错误的部分或由于紫外线照射而形成的胸腺嘧啶二聚体。

2. DNA 聚合酶 II (Pol II)

每个大肠杆菌细胞约有 40 个分子聚合酶 II，分子量为 120000 的单一多肽链，进行聚合反应时，必须有 Mg^{++} 、 NH_4^+ 及 DNA 模板。它除了具有 DNA 聚合酶活性以外，还伴有核酸酶活性，能沿 $3' \rightarrow 5'$ 方向降解单股 DNA 链。

后来又发现完全丧失 DNA 聚合酶 II 活性的大肠杆菌突变株 PolB，这种突变株仍能正常生长，所以 DNA 聚合酶 II 仍不是真正的 DNA 复制酶。最近有人提出，DNA 聚合酶 II 和 DNA 修复有关。

3. DNA 聚合酶 III (Pol III)

现在认为，DNA 聚合酶 III 是 DNA 复制必须的主要复制酶。

每个大肠杆菌细胞具有 10 个分子 DNA 聚合酶 III。酶分子由两条多肽链组成，一条多肽链分子量为 140000，另一条为 40000。除了具有 DNA 聚合酶活性之外，它还具有 $3' \rightarrow 5'$ 的外切核酸酶活性。

上面已谈到，DNA 聚合酶 I，II，III 都是多功能酶，它们可以催化 DNA 的聚合反应，又具有 $3' \rightarrow 5'$ 或 $5' \rightarrow 3'$ 的外切核酸酶活性。它们在 DNA 复制中的作用也还没有完全弄清楚。也有可能还存在有其他的 DNA 聚合酶。

今将大肠杆菌三种 DNA 聚合酶的性能列于表 11-1。

表 11-1 大肠杆菌三种 DNA 多聚酶的性能

性 能	种 类	DNA 多聚	DNA 多聚	DNA 多聚
		酶 I	酶 II	酶 III
功 能	5'→3' 聚合作用	+	+	+
	5'→3' 核酸外切酶	+	-	-
	3'→5' 核酸外切酶	+	+	+
活 性	为高浓度盐所抑制	-	-	-
	与三磷酸前体结合能力	低	低	高
	被 SH 阻碍剂所抑制	-	+	+
	一般	单链	单链	双链
分子量	109,000	120,000	{ 140,000 40,000 180,000	
多聚的核苷酸/分/分子 (于 37°C)	~1,000	~50	~15,000	

4. DNA 连接酶

上面谈到, DNA 连接酶是一种能将 DNA 短片连接起来的酶, 即它能把 DNA 双链结构中的一条单链上的缺口连接起来, 从而完成 DNA 复制。同时它在 DNA 的修复或重组中亦是不可缺少的。

DNA 连接酶是双链中一条链上的切断点(缺口)中的 5'-磷酸基(5'-P 端)和它相邻的 3'-OH 基端以磷酸二酯键相结合的酶。DNA 连接酶有两种, 一种要求 ATP(T₄ 噬菌体感染的大肠杆菌连接酶)作辅助因子; 另一种要求 NAD(大肠杆菌连接酶)作辅助因子。两者都还需要 Mg⁺⁺ 等二价阳离子。

缺失 DNA 连接酶的突变株, 大量积累 DNA 片断即把片段连接成高分子的 DNA 的能力严重丧失。可见, DNA 的复制必须有 DNA 连接酶。

(四) 以 RNA 为模板的酶促合成(反向转录)

在某些致癌 RNA 病毒中发现一种酶，能够以 RNA 为模板，即按照 RNA 分子中核苷酸顺序来合成 DNA，被称为反向转录酶（依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶）。在 RNA 指导下合成 DNA 的过程可分为两步：首先在反向转录酶的作用下，在 RNA 链上合成出一条互补的 DNA 链，形成 RNA-DNA 杂合体；然后此杂合体在另一酶（DNA 聚合酶）作用下形成双链的 DNA 并释放出 RNA 链。

后来在正常细胞，特别是胚胎细胞中也找到这种反向转录酶，这些实验表明，不能把“中心法则”绝对化，所谓“中心法则”即认为遗传信息的传递方向是由 DNA 转录到 RNA，然后再由 RNA 翻译成蛋白质，是一种单向进行的过程。DNA 作为遗传信息的贮藏者，只能在细胞繁殖时通过自我复制维持其连续性。反向转录酶的发现说明在某些情况下 RNA 也可以是遗传信息的基本携带者，并且可以指导 DNA 的合成。现将分子遗传学中心法则见图 11-5。

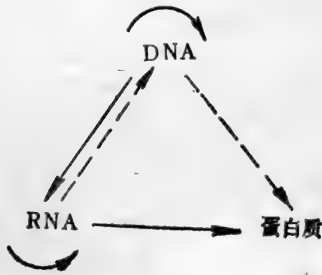


图 11-5 分子遗传学“中心法则”示意图

图中实线箭头表示遗传信息的一般流向，虚线箭头表示特殊流向，其中 RNA 的复制和由 RNA 转录成为 DNA 已经发现，由 DNA 直接流向蛋白质亦于一九六五年用大肠杆菌做实验而得到证实认为是可能的。由此可以看出核酸与蛋白质生物合成的关系，DNA 是遗传信息的贮藏者，由 DNA 转录出来的 RNA 分子就作为指导转译的直接样板分子，在转译过程中氨基酸有秩序地掺入蛋白质分子。

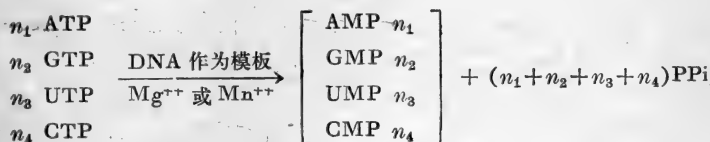
将分子遗传学中心法则见图 11-5。

图中实线箭头表示遗传信息的一般流向，虚线箭头表示特殊流向，其中 RNA 的复制和由 RNA 转录成为 DNA 已经发现，由 DNA 直接流向蛋白质亦于一九六五年用大肠杆菌做实验而得到证实认为是可能的。由此可以看出核酸与蛋白质生物合成的关系，DNA 是遗传信息的贮藏者，由 DNA 转录出来的 RNA 分子就作为指导转译的直接样板分子，在转译过程中氨基酸有秩序地掺入蛋白质分子。

二、RNA 的生物合成

(1) 以 DNA 为模板合成 RNA (包括 rRNA, mRNA, tRNA) 生物机体的遗传信息贮存在 DNA 分子中, 通过 RNA 而决定蛋白质的合成, 从而控制着细胞的新陈代谢活动, 无论是 DNA 的复制或 RNA 的转录, 遗传信息传递的基本规律都是通过碱基配对形成互补的多肽核苷酸链。

一九六零年至一九六一年, 由微生物或动物细胞中分离得到依赖 DNA 的 RNA 聚合酶。该酶以四种核苷三磷酸作为底物, 并需要二价阳离子 Mg^{++} 或 Mn^{++} , 在适当的 DNA 为引子下进行合成, 反应如下:



RNA 聚合酶又称转录酶, 因为它转录了 DNA 链上的部分信息给 RNA, 亦即 RNA 的碱基序列和 DNA 链上部分碱基序列互补。在体外 RNA 聚合酶能将 DNA 两条链同时转录。但体内的两条链仅有一条可进行转录, 另一条链仅能复制, 无转录功能, 其作用尚不清楚。

转录时, DNA 局部解开双链, 随着 RNA 聚合酶的移动, 在酶前的 DNA 链渐渐解开, 其中一条链作为模板以形成 RNA 分

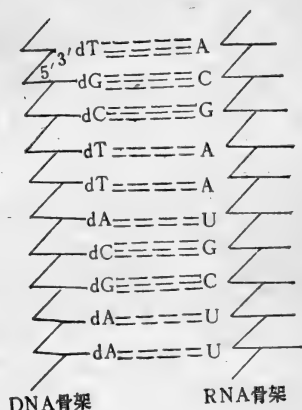


图 11-6 DNA 和 RNA 之间的互补配对由碱基提供必须的信息

子，另一条不作为模板的链的作用尚不清楚，酶后的双链又渐渐缠绕，这可解释为 DNA-DNA 的双螺旋比 DNA-RNA 杂合体在能量上稳定得多，因而在 RNA 聚合酶离开合成区域后，RNA 链很快被原来的 DNA 链所取代而立即离开 DNA 链。

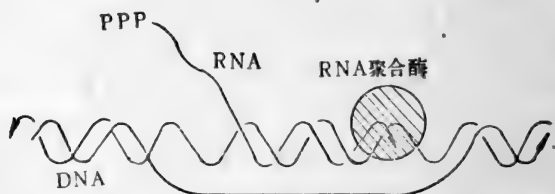


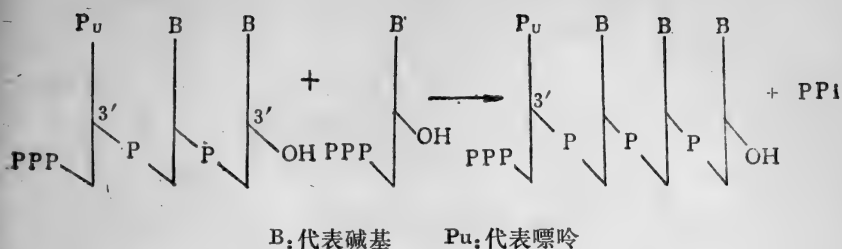
图 11-7 RNA 在 DNA 分子上转录的过程

RNA 聚合酶以 DNA 为模板，催化合成 RNA 的过程分四步进行：

① 酶与 DNA 链的特定部位结合。

② 启动：由 RNA 聚合酶分子中的一个组分称 σ 因子认出模板 DNA 上启动信号，（即能够开始合成的起始点），使这部位的双链 DNA 部分折开，并使核苷三磷酸结合上去，生成一个酶-DNA-核苷三磷酸的络合物，形成 RNA 链中的第一个核苷酸链。启动后， σ 因子脱离出来。然后第二个核苷三磷酸再结合上去形成磷酸二酯键并游离出焦磷酸。已经证实第一个结合上去的是 ATP 或 GTP，而在模板 DNA 链中的起始点则为嘧啶核苷酸残基。

③ 链的延长：以核苷三磷酸为底物，使与模板 DNA 核苷酸序列相对的磷酸-核苷顺序继续结合在游离的 3-OH 上使 RNA 延长，并释出焦磷酸。故 RNA 的聚合是从 5'→3' 方向进行的。只有 5'末端的核苷三磷酸不释出焦磷酸而保持三个磷酸。



④ 链的完成：RNA 的合成到达中止信号即行停止，与启动信号一样，都是特殊的核苷酸顺序。终止时需要有一个特殊蛋白质称 ρ 因子，它是由四个分子量为 50000 的亚基组成的中性蛋白质。 ρ 因子帮助酶识别 DNA 链上的终止信号，终止 RNA 链的延长，并使 RNA 从模板上脱落下来。图 11-7 是 RNA 在 DNA 模板上合成机制。DNA 的复制与按 DNA 模板转录 RNA 时，两者十分相似，但有几点不同：① 在正常复制中 DNA 链解开，二链分别作为新互补链合成的模板；而转录则是不对称的，只有一条链作为模板。② 复制时二条链保持分开，DNA-DNA 子螺旋稳定；而转录时形成的 DNA-RNA 杂种双链不稳定，RNA 链很快与 DNA 链分开移走。③ DNA 复制时，子代 DNA 分子大小与亲代相同；而转录时，在一个 DNA 分子上可以合成许多个 RNA 分子，它们都比通常的 DNA 模板小得多。

(2) 以 RNA 为模板的生物合成-RNA 的自我复制(体外实验) 关于 RNA 复制的研究是以感染各种 RNA 噬菌体(例如噬菌体 Q β)的大肠杆菌为材料进行的，从这种细胞中可分离到一种酶称复制酶，即依存于 RNA 的 RNA 多聚酶。能合成与模板 RNA 相同的 RNA。合成时，除四种核苷三磷酸外，还必须 Mg^{++} 。酶的模板特异性很高，例如 Q β 噬菌体的复制酶只能以 Q β 噬菌体 RNA 为模板。合成的 RNA 在大小与碱基组成上与模板完全一致，也可作为模板进行 Q β RNA 的再合成，因此 Q β RNA 可自我复制。同样地对大肠杆菌具有和模板 RNA 相同的侵染力。

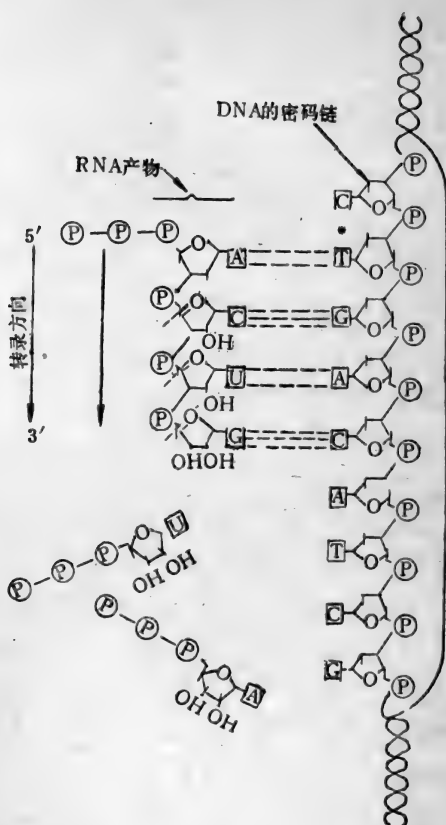


图 11-8 RNA 在 DNA 模板上合成的机制。

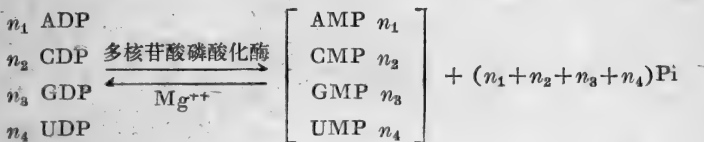
* 表示转录的起始点 虚线表示碱水解位置

现在一般认为，病毒 RNA 在体内的复制过程可以分为两个阶段：① 侵入的病毒 RNA 链具有信使 RNA 的功能，可与寄主细胞的核蛋白体相结合，共同控制各种重要的酶类和病毒外壳蛋白质的合成。② 然后在复制酶的作用下合成病毒 RNA。

很多证据说明 Q β 复制过程要先以 Q β RNA 为正链作模板，然后形成互补的 Q β RNA 正链，再以负链为模板合成正链。但负链的合成必须有寄主菌的蛋白质因子。

RNA 的合成亦按 5'→3' 方向进行。

(3) 以 5'-核苷二磷酸为前体，经多核苷酸磷酸化酶合成高分子量的核糖多核苷酸，同时放出正磷酸，反应是可逆的，需要 Mg^{++} 。当 60~80% 的核苷二磷酸已消失时这反应便达到平衡。



在这个反应中，如加入少量多核苷酸作为引物可以使反应速度加快，引物的作用是接受底物延长核苷酸链。这种酶在细菌中分布很广，在植物组织中也曾被发现，而在动物体内则很少发现，可能不是 RNA 合成的主要方式。

通常生物体内的 RNA 都是在 DNA 控制下合成的，由 DNA 到 RNA 到蛋白质的过程就是生物体由遗传特征到生命活动的表现过程。在细胞生命活动不同时期，DNA 链在不同区域进行转录，合成各种 RNA，从而控制着细胞机能的改变和分化。因此关于遗传信息的转录及其调节机制，已成为生物学中最受重视的课题之一，它的解决无疑具有重大理论意义和实践意义。

第二节 核酸与蛋白质的生物合成

核酸的生物学功能是多方面的，核酸在遗传性状的传递，突变的产生，肿瘤的发生等方面都起着重要作用，而这些作用都与蛋白质的合成有关。蛋白质的生物合成是生命活动的基本过程，因此研究核酸与蛋白质生物合成的关系对认识和控制生命活动具有重要意义。

核酸的生物学功能是通过控制蛋白质(酶)的合成而表达的，也就是说，核酸分子中的遗传信息(即核苷酸碱基的顺序)通过

某种传递过程以决定蛋白质分子结构，而一定结构的蛋白质就表现出一定的功能。例如镰刀型贫血病患者的血红蛋白(Hb-S)与正常血红蛋白在生理功能和物化性质上都不同，Hb-S性质的改变是由于血红蛋白分子中仅一个氨基酸被另一氨基酸取代(β -链N-端第六个氨基酸——谷被缬取代)引起的，镰刀型贫血病是一种遗传病，归根到底是由于核酸中的遗传信息发生了改变，即遗传信息的变异导致血红蛋白分子结构的改变，这个例子说明了核酸分子的结构(核苷酸排列顺序)和蛋白质分子结构(氨基酸排列顺序)之间有着直接的关系。这就是说，作为遗传信息载体的核酸和以生理功能表现这些信息的蛋白质分子结构之间有着直接的相互关系。本节将要详述核酸与蛋白质生物合成的关系。

一、遗传信息及其传递

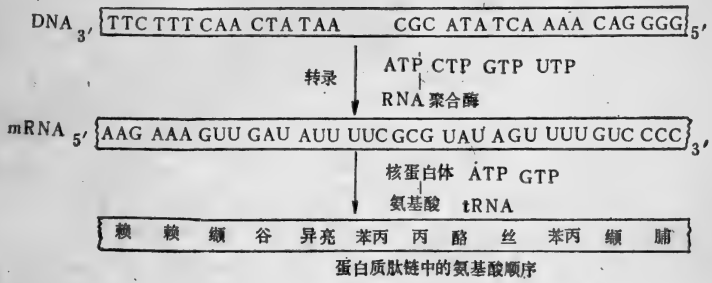
我们知道，亲子之间所传递的不是现成性状而是遗传信息。从分子水平看，生物体的遗传信息主要是以密码的形式编码在DNA分子上，表现为特定的核苷酸排列顺序。DNA通过复制可以将遗传信息传递给子代DNA分子，DNA分子又可以通过转录作用将遗传信息传递给信使RNA(mRNA)，mRNA进而控制专一蛋白质的合成，使遗传信息在蛋白质肽链的氨基酸排列顺序上得到体现，这可叫作遗传密码的翻译。

DNA首先决定着特殊的mRNA的合成，mRNA作为DNA和蛋白质之间的信使而参与蛋白质的合成过程，这就是遗传信息的传递，简单表示如下：



上节已阐述了mRNA在DNA分子上的合成过程，mRNA是DNA链上某一段的副本，它的核苷酸排列就是DNA的核苷酸排列次序的翻版，不过它是核苷酸单链。所以在分子遗传学中，以DNA一条链为模板，通过RNA多聚酶的催化，由三磷

酸核糖核苷酸合成 RNA 的过程称转录。在核糖核蛋白体上，按 mRNA 所携带的 DNA 遗传信息，转移 RNA 把氨基酸逐个联成肽链的过程谓之翻译，下面是遗传信息传递的示意图，实际上就是蛋白质生物合成的简单概括：



二、信使 RNA 与遗传密码

尽管 DNA 蕴藏着生物全部遗传信息，但其自身并不直接合成蛋白质，而通过转录将信息传递给 mRNA，再由 mRNA 将信息通过翻译体现于蛋白质的氨基酸顺序上，即核酸分子中的核苷酸序列以密码方式控制着蛋白质分子中氨基酸排列顺序，故 mRNA 称为合成蛋白质的模板。mRNA 是由四种核苷酸组成的，而蛋白质是由 20 种氨基酸组成的，20 种氨基酸在肽链上的排列顺序如何由四种核苷酸构成的 mRNA 决定的呢？这就是遗传密码所要解决的问题。通过许多实验研究，确切证明，遗传密码是按照 DNA 分子中三个核苷酸（亦即三个碱基）组成来编码的，三个核苷酸代表一种氨基酸，三个核苷酸结构的密码单位叫密码子，或叫密码三联体。这样四种核苷酸可以代表 $64(4^3=64)$ 种氨基酸，足以满足天然的 20 种氨基酸之需了，现已查明了所有氨基酸密码。

密码子是具有普遍性的，不受生物物种的限制。

由表 11-2 可以看出，有不少氨基酸具有一种以上的三联体密码，这叫密码的简併性，简併性往往是按照同一种氨基酸的密码三联体共用一个二联体的规则出现的。例如丝氨酸的密码三联体前二个核苷酸都是 UC，脯氨酸为 CG，丙氨酸为 GC 等，简併密码三联体中的一个碱基经置换后，有时就变为同一种氨基酸的另一个三联体。

表 11-2 氨基酸的三联体密码

第一个核苷酸	第二个核苷酸				第三个核苷酸
	U	C	A	G	
U	苯丙 (Phe) { UUU 亮 (Ileu) { UUC { UUA { UUG	丝 (Ser) { UCU { UCC { UCA { UCG	酪 (Tyr) + 终止 { UAU { UAC { UAA { UAG	半胱 (Cys) + 无意义色 (Try) { UGU { UGC { UGA { UGG	U C A G
C	亮 (Ien) { CUU { CUC { CUA { CUG	脯 (Pro) { CCU { CCC { CCA { CCG	组 (His) { CAU { CAC 谷酰胺 (Gin) { CAA { CAG	精 (Arg) { CGU { CGC { CGA { CGG	U C A G
A	异亮 (Ilen) { AUU { AUC { AUA Met 甲硫 * AUG	苏 (Thr) { ACU { ACC { ACA { ACG	天酰胺 (Asn) { AAU { AAC 赖 (Lys) { AAA { AAG	丝 (Ser) { AGU { AGC 精 { AGA { AGG	U C A G
G	缬 (Val) { GUU { GUC { GUA * GUG	丙 (Ala) { GCU { GCC { GCA { GCG	天 (Asp) { GAU { GAC 谷 (Glu) { GAA { GAG	甘 (Gly) { GGU { GGC { GGA { GGG	U C A G

注：+ 肽链终止密码子 * 肽链起始密码子

从进化的观点看，遗传密码的广泛简併，可能是减少突变频率而稳定物种的一种方式，密码的简併必然涉及到同一种氨基酸存在几种不同的 tRNA。

mRNA 上还有控制蛋白质合成的起始与终止的信息。为了正确的转译 mRNA 上的遗传信息，mRNA 的特定位置上的起始密码为 AUG 及 GUG 两个三联体密码，mRNA 分子上控制蛋白质合成终止的三联体密码 UAG, UAA, UGA 三种不和任何一种氨

基酸相对应，称为无意义的密码，即终止密码。肽链合成时，如碰到了模板 mRNA 上有这种三联体密码时，合成即告终止。通常是有一个以上的终止密码串联在一起，以提高终止效率。

三、与蛋白质生物合成有关的 RNA

近年来研究表明，在蛋白质生物合成中，起着重要作用的 RNA 有：核糖核蛋白体 RNA 或称核糖体 RNA (Ribosomal RNA 简称为 rRNA)；转移 RNA (Transfer RNA 简称为 tRNA) 和信使 RNA (Messenger RNA 简称为 mRNA)。

(一) 转移 RNA (tRNA)

这类 tRNA 存在于细胞浆中，占细胞内 RNA 总量的 15% 左右，是细胞组成中的稳定成分，它能溶于 1.0 M 食盐溶液，故有时又叫做可溶性 RNA，用 sRNA 表示。tRNA 大约由 70~80 核苷酸组成的低分子量 RNA，分子量为 25000~30000。

目前已经分离的多种专一性的 tRNA，其一级结构比较清楚，各种 tRNA，不论其来源及对氨基酸的专一性如何，一级结构上有许多类似之处，它们接受氨基酸的一端 3'-末端具有共同的核苷酸顺序……Cp Cp Ap，另一端为 5'-末端，以鸟嘌呤核苷酸结尾。tRNA 的核苷酸链 pG……Cp Cp Ap 通过自身迴拆，碱基之间按 A-U, G-C 互补的原则配对，生成氢键，形成所谓三叶草形。在 tRNA 上有三个核苷酸组成反密码子，由它识别 mRNA 上的密码，几个已知结构的 tRNA 的反密码子为：丙氨酸 tRNA-IGC，丝氨酸 tRNA-IGA，酪氨酸 tRNA-GψA，缬氨酸 tRNA-IAG，苯丙氨酸 tRNA-GAA。这样 tRNA 可以将氨基酸运到 mRNA 相应的位置，保证肽链上氨基酸的正确排列次序。tRNA 对它所转移的氨基酸具特异性，对每一种氨基酸来说就有一种以上相对应的 tRNA。

酵母丙氨酸 tRNA 三叶草形结构见图 9。

近年来对 tRNA 的三级结构提出了许多模型，根据 Rich 于

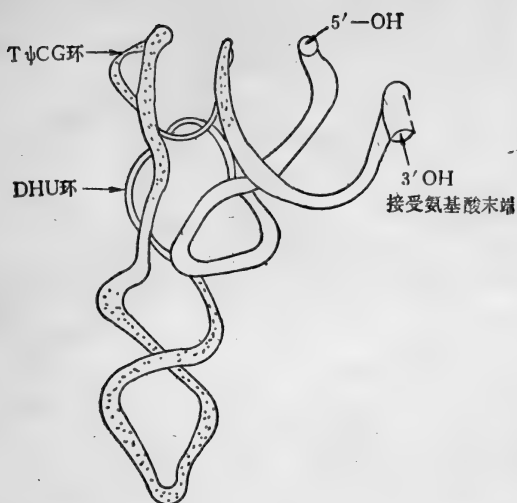


图 11-10 酵母丙氨酸 tRNA 立体构型呈倒L形

认 mRNA 上的密码子，每个 tRNA 根据自己的反密码子三联体找到 mRNA 相应的密码三联体，使氨基酸位于肽链中某一正确位置上，并在酶的催化下形成肽链。

(二) rRNA 及核糖核蛋白体

rRNA 也是 DNA 的部分转录品，在核仁里合成后，进入细胞质与蛋白质结合成核糖核蛋白体(核糖体)，成为氨基酸合成的场所。核蛋白体由 rRNA 及蛋白质组成，比例大约为 60:40。rRNA 占细胞中 RNA 总量的 80~90%。已发现有三种 rRNA，它们的沉降系数约为 5S，16~19S 及 23~29S。rRNA 的作用还不十分清楚，估计它们主要是保持核糖核蛋白体具有一个特殊的三度空间，使 mRNA 和 tRNA 得以结合在适宜的位置上，当核糖核蛋白体沿着 mRNA 移动时，根据 mRNA 上的三联体密码选择相应的氨基酰 tRNA，并借助于核糖核蛋白体上专门的酶一个一个地连接成肽。rRNA 还可能具有识别 mRNA 上启

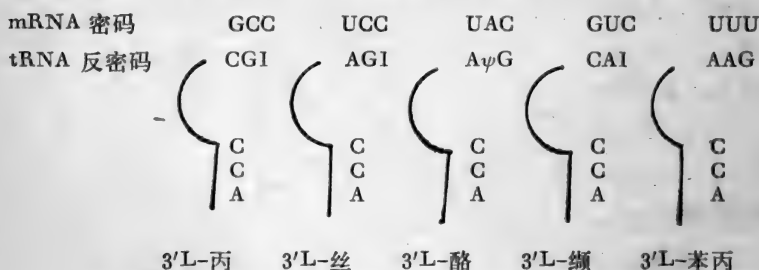
动和终止信号的能力。

核糖核蛋白体总是由两个不相等的圆形亚单位组成，一个亚单位约为另一个亚单位的两倍大小，分子量约为 180 万和 80 万。习惯上给予核蛋白体和它们亚单位的名称指的是他们在离心力场中的沉降率。细菌中较大的亚单位称为 50 S 粒子，较小的称为 30 S 粒子，而整个核蛋白体称为 70 S 核蛋白体。动物细胞的核蛋白体可使用的名称是 60 S 粒子，40 S 粒子和 80 S 核蛋白体。

(三) mRNA

mRNA 占总 RNA 的 5% 以下，它也是在细胞内以 DNA 为模板互补形成的。它是原始信息的直接接受者，在蛋白质合成中 mRNA 充作模板，把从 DNA 那里抄来的信息经 tRNA 的反密码子辨认后翻成氨基酸的语言，合成蛋白质。遗传信息由 mRNA 传至蛋白质叫作翻译。

按照 Wobbil 假说，密码以习惯的方向 5'→3' 方向来写，反密码以 3'→5' 方向来写，以示碱基对的反平行方向。



mRNA 是 RNA 中代谢最活跃的一种，它合成后很快就被破坏掉，更新时间很短。

四、蛋白质的生物合成

DNA 的遗传信息，首先由 RNA 聚合酶转录到 mRNA 上。然后，mRNA 和核糖体结合并成为合成蛋白质的直接模板，同时各种氨基酸和其特有的 tRNA 结合转移到核糖体上，在这里形

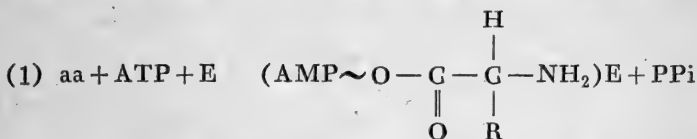
成肽链并释放出各种 tRNA。此时，各 tRNA 具有特有的反密码子，就和 mRNA 上的密码对应连接，则 mRNA 上的碱基排列就转抄为氨基酸的排列顺序，这后一过程就称为翻译过程。

很明显，mRNA 的遗传信息展现为蛋白质的一级结构，要以 tRNA 为媒介，所以 tRNA 是个改编分子。

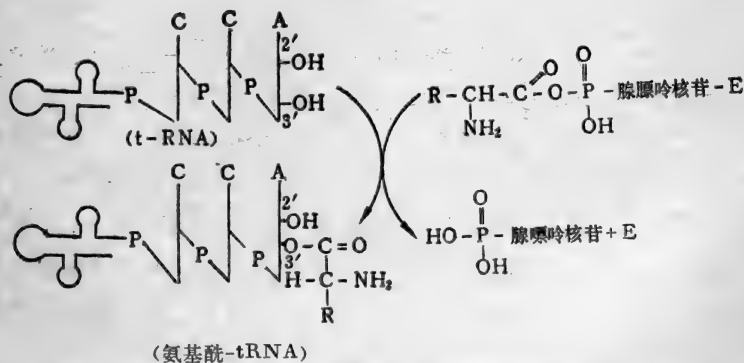
在整个翻译过程中，需要两个酶，一个催化氨基酸的活化，即形成氨基酰-tRNA，称为氨基酰-tRNA 合成酶；另一个催化肽链形成，称为氨基酰-tRNA 转肽酶。

(一) 氨基酸活化生成氨基酰-tRNA

已知在活细胞中形成多肽要消耗能量，后来有人证明细菌，酵母等细胞都有一种能使氨基酸在 ATP 或其他供能系统存在下活化的酶，称氨基酰-tRNA 合成酶，催化的反应分两步：



(2) tRNA 末端 A 3'-OH 处与活化了的氨基酸结合生成带氨基酸的 tRNA，同时酶游离出来。反应如下：



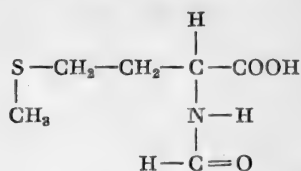
在此，tRNA 的重要功能还在于它能把对应于 mRNA 上的三联体密码的特定氨基酸转移到核糖体上。

氨基酰-tRNA 合成酶具有严格的专一性，特别是对 tRNA 的选择表现高度的专一性，这就保证了转移过程的正确性。

(二) 蛋白质合成过程的起译，肽链的延伸和终止

1. 起译

mRNA 形成后穿过细胞核膜进入细胞质中，与 30 S 亚单位的核糖核蛋白体结合，结合点是 mRNA 上的 AUG 密码处，mRNA 上的遗传信息 5'—>3' 端展现，在这个过程中，核糖核蛋白体同时和两分子氨基酰-tRNA 相结合，此时，tRNA 中的反密码部位和 mRNA 上的二个邻接三联体密码处于密码—反密码的结合状态。这两个 tRNA-AA 接合部位中，近 mRNA 的 5' 末端的结合位称“P”位(肽基)，近 3' 末端的结合位称“A”位(氨基)。经对大肠杆菌做实验知道，起译与 N-甲酰-甲硫氨酸-tRNA (fMet-tRNA) 有关，N-甲酰-甲硫氨酸的结构如下：



甲硫氨酸在 Met-tRNA 合成酶作用下生成 Met-tRNA，但蛋氨酸的 tRNA 中有 tRNA_F 和 tRNA_M 两种，因而可形成两种 Met-tRNA，然后甲酰化，在大肠杆菌中只能形成 fMet-tRNA，保护住了氨基就使它不能同另一氨基酸的羧基起反应，从而不能参入到多肽链内部而起起肽链的作用。因此 fMet-tRNA_F 首先辨认出 mRNA 上的 AUG 密码 (AUG 是甲硫氨酸的密码)，并进入核糖体位于“P”位，开始肽链的合成，所以 AUG 又称起始密码。这时 50 S 亚单位附着到复合物上并完成 70 S 核糖体，然后开始肽链的延长。

至于动物细胞蛋白质合成的机制则落后于微生物。根据试验认为和细菌情况不同，合成起始物不是 fMet-tRNA_F 而是 Met-

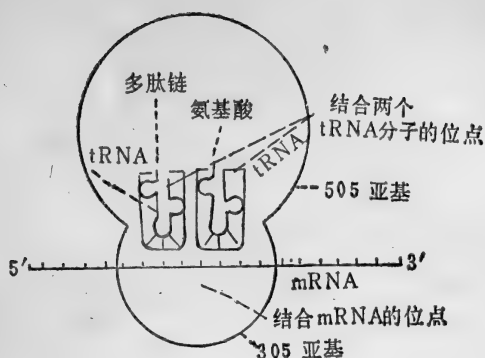


图 11-11 核糖核蛋白体图解

表示出信使 RNA 和两个 tRNA 分子，左边那个 tRNA 位于肽酰-tRNA 结合位点上，带有正在增长着的多肽链；右边那个占有氨基酰-tRNA 结合位点。

tRNA_F。

总之，肽链合成的起始包括三个过程：① 核糖核蛋白体的 30 S 亚基结合于 mRNA 的启动部位，② fMet-tRNA 和 30 S-mRNA 复合体结合，③ 50 S 亚基和 30 S 起始复合体结合成 70S 复合体。在此过程中需要 GTP 及启动因子等参加，见图 11-12。

2. 肽链的延伸

当 fMet-tRNA 进入核糖核蛋白体结合于“P”位，完成 70 S 复合体后，接着第二个 aa~tRNA 结合于“A”位，“P”位上肽酰-tRNA(或起译 fMet-tRNA)的活化酰基和 A 位上 aa~tRNA 的氨基之间在氨基酰-tRNA 转肽酶的作用下形成肽键(转肽反应)，“A”位上新生成的多一个氨基酸的肽酰-tRNA 向“P”位上转移，而“P”位上脱酰化的 tRNA 游离下来，mRNA 随之在核糖体上移动一个密码位，让下一个氨基酸的密码进入“A”位。从 aa~tRNA 连到“A”位和移位过程都需要 GTP 供能，亦即每个氨基酸掺入到肽链中去至少要用去两个 GTP。

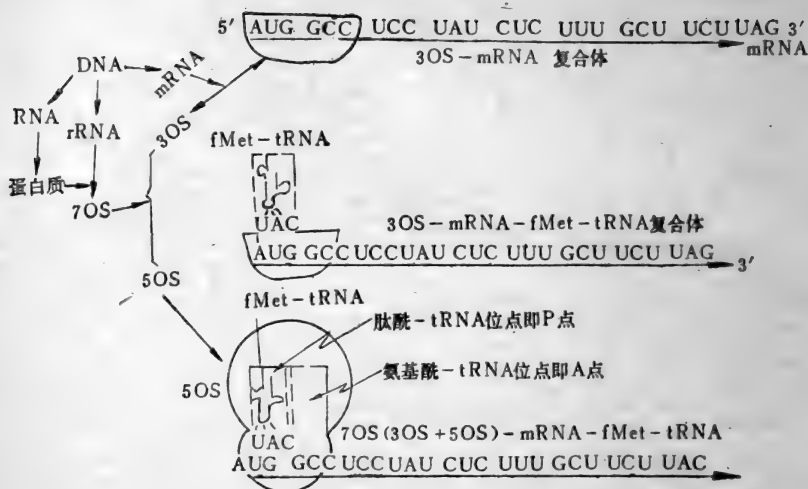
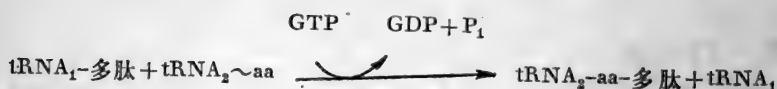


图 11-12 多肽链合成的起始



这一系列的事件依次进行下去，核糖核蛋白体不断向右移动，这些 tRNA 把 mRNA 上的密码子翻译出来，在氨基酰-tRNA 转氨酶作用下肽链不断地从游离的 $-NH_2$ 端增长，形成新的肽链，同时释放出相应的无载荷的 tRNA。

3. 终止

由四种碱基组成的 64 种三联体密码中 UAG, UAA, UGA 三种三联体不和任何一种氨基酸相对应，称为无意义密码子，即终止密码子。在接加当中核糖核蛋白体沿着 mRNA 不断移动，当 mRNA 上的 UAG, UAA, 或 UGA 任何一个进入核糖核蛋白体的“A”位置时，肽链合成即告结束，便从核糖核蛋白体上脱落下来。

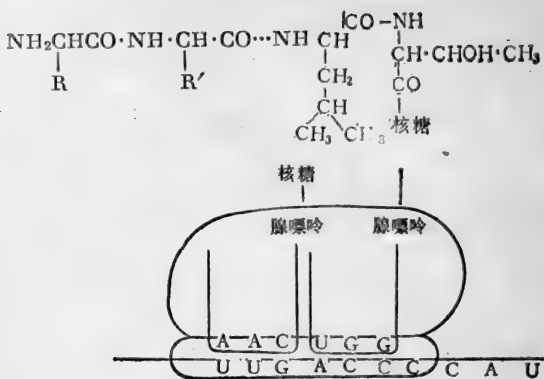


图 11-15 蛋白质生物合成：第三阶段

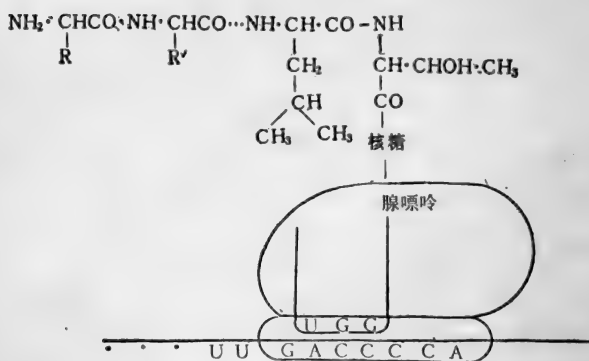


图 11-16 蛋白质生物合成：第四阶段



图 11-17 一个多聚核糖体的图解

(三) 蛋白质的空间构型的形成

已知蛋白质的生物活性很大程度上与其空间构型有关，上述蛋白质的生物合成过程，通过模板控制解决了肽链中氨基酸的排列顺序问题，也即蛋白质的一级结构。但是蛋白质的空间构型如何形成，认为多肽链在合成完毕后就从核蛋白体上释放下来，并变为折叠起来的活性构型。我国一九六五年在世界上首次全合成胰岛素的工作证明，在合成肽链后它会自动折叠成有活性的立体结构。这表示蛋白质的空间结构主要决定于其一级结构，蛋白质的三级结构乃是其肽链中特定氨基酸顺序的最稳定的空间构型。

现在至少已鉴定出七个蛋白质因子是蛋白质合成机构必不可少的成分。它们可能都是特异的核糖体蛋白质。这些因子的作用见表 11-3:

表 11-3 几种蛋白质因子在翻译过程中可能起的作用

1 与起始有关的因子
F ₁ 帮助 fMet-tRNA 结合到起始复合物上
F ₂ 帮助起始复合物形成
F ₃ 使30S亚单位结合到 mRNA 上去
2 与链延长有关的因子
TF ₁ 使氨基酰-tRNA 附着到核糖体上
TF ₂ 使肽酰-tRNA由A点转移到 P 点
3 与链终止有关的因子
R ₁ 识别终止密码子 UAA 和 UAG
R ₂ 识别终止密码子 UAA 和 UGA

现将核酸与蛋白质生物合成的关系图示如图 11-18。

五、蛋白质与基因

一切遗传性状和生命活动都是通过蛋白质的复杂代谢而实现的，因此基因对遗传性状和生命活动的控制，就是通过对蛋白质

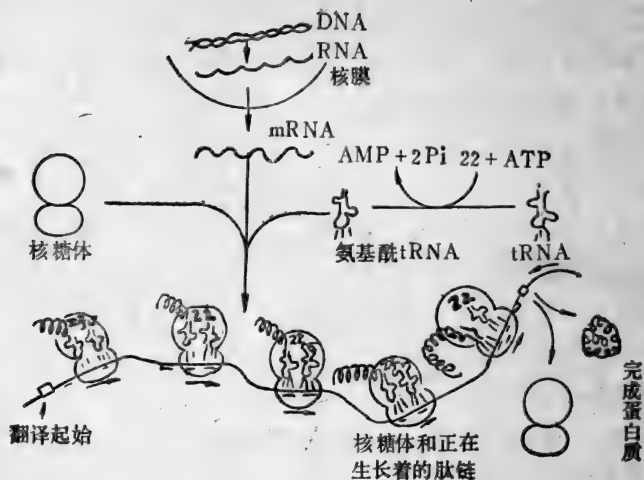


图 11-18 蛋白质生物合成示意图

的质和量的控制，从而改变代谢来达到的。对遗传的物质基础前面已经叙述了，那么基因本身又是什么呢？是怎样控制蛋白质的合成呢？

(一) 基因

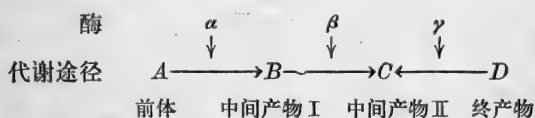
基因是遗传的功能单位。一个基因就是核酸（绝大多数是DNA，少数是RNA）上载有某种遗传信息的一个片段，这种遗传信息是用一定的核苷酸排列顺序来记录的，它代表着决定某种蛋白质分子结构的相应的一段DNA。因此基因是遗传性状在分子水平上的物质基础。遗传性状是由基因所决定和调节的。基因具有形成特异的酶或其他蛋白质的必要的信息。现在已知一个DNA分子可以包括许多基因，例如大肠杆菌染色体上至少已经标定了460个基因的位置，因此不论怎样，DNA不等于基因，DNA是构成基因的物质，而基因则是遗传物质的结构和功能单位，基因的本质是DNA。

(二) 基因的功能

多数基因的功能是控制多肽链的生物合成。这一点现在已普遍被接受了，但在四十年代以前人们并不知道基因的化学本质，也不知道基因的产物是什么。

基因和酶之间的对应关系的证据最初来自红色面包霉生化突变的

研究。野生型红色面包霉菌株能只在无机盐、糖和生物素的基本培养基上生长，说明它可以利用这些简单的化合物合成氨基酸、碱基、维生素及其他生长繁殖所必需的物质。这些物质是分别由一系列特异的酶催化步骤完成的，可以表达如下：



每个这样的反应系列称为一个生化途径或代谢途径。可以推测如果代谢途径中的酶是相应的基因决定的，则应可得到这基因之一发生突变，使相应的酶失活的突变型菌株。如上式决定酶 β 的基因突变，使酶 β 无活性，则中间产物 I (B) 将不再转化成 C，因而不能合成终产物 D。又假定 D 是生长必不可少的，则除非在培养基中补加 D，否则该菌将不能生长，这种突变型菌株就叫做生化突变型或营养缺陷型。

事实证明，通过诱变剂处理由红色面包霉分离到数以百计的遗传上不同的营养缺陷型，遗传学分析证明基因与相应酶的活性之间确实存在着对应的关系。

据此，有人提出了“一个基因一种多肽的假设”，认为一个基因的原始作用是决定一种多肽的氨基酸排列顺序，即多肽的一级结构。这已为实践所证明。

要记住，基因的直接产物并不是多肽，而是 RNA。rRNA 和 tRNA 也是基因的直接产物只有 mRNA 才作为多肽链合成的模板。

第十二章 代谢的调节控制

第一节 调节控制的一般概念

调节是一种控制，是通过对活动能力的控制而实现和谐节奏的一种方式。

生物与非生命物质有着本质的区别，但是就调节控制来说，其实活的生物机体与机器，与机器的自动控制过程有着明显的相似之处。被奉为通讯科学的经典之作的《控制论》的作者诺伯特威纳(Wiener, N, 1948)给控制论下的定义为“在动物和机器中控制和通讯的科学。”并把这一定义作为《控制论》这一著作的副标题。

一个有生命的体系必须同时具有行动及控制行动这两种能力。例如人类要会消化食物，但是我们不能成天地吃。因此我们需要一个正向的控制来使这个过程开始(在需要食物时有一个想吃的生理要求)以及一个反向的过程来使该过程停止(在吃够以后有一个停止吃的愿望)。同样，当我们受伤流血时，凝血的过程必须开始；但是事后又必须使其停止以免引起冠状动脉血栓。为了运动，我们必须使肌肉起劲，为了休息，又必须使其停止。简而言之，每一个生物体系都具有在某些条件下能够引起或加速一个过程，而在另外的条件下又能使之终止或减速的控制能力。

考虑到生物机体必须调节的过程的繁杂性，以及机体必须反应的那些环境条件的繁杂性，不难想象生物体系中的调节控制是极其复杂的。尽管如此，一切生物机体，包括高等动植物，生命活动的基本单位是细胞，所以细胞水平的调节控制乃是高等生物和其他较高级水平的调节控制方式的基础。

细胞是生命活动的基本单位，而生命活动的基础或生命的基

本特征则在于新陈代谢，在新陈代谢的基础上才有生物的生长、发育、繁殖等其他生命特征。

新陈代谢过程是极其错综复杂的。已估计过一个普通的细胞大约含有 3000 种不同的酶。其中每一种酶分别催化一个特定的化学反应，而使反应中某些化合物（底物）转变为另一些化合物（产物）。生物细胞中如此大量的反应，必然存在着一系列调节控制的方法才能维持新陈代谢的协调统一，保证生命现象的正常化。无论是简单的单细胞生物，还是高度发达的具有神经系统的哺乳动物，都需要有调节控制代谢的能力。否则就会失调，新陈代谢就会紊乱。就不能维持生物体内部的矛盾统一，不能保证生物体与环境的矛盾统一，那么疾病和死亡就会随之而来。

所谓代谢的调节控制，一般是指对代谢反应速度的调节和对代谢途径方向的控制两个方面。但是事实表明，代谢途径方向的控制，也必须在代谢反应速度调节的基础上来进行的。所以在代谢调节控制中，代谢速度的强调是主要的。

就目前认识来看，新陈代谢的调节，可以综合地分为：分子、细胞、激素及神经等四级水平的调节控制。但是在每一级水平之内以及各级水平之间都是密切配合的，相互补充的。例如，就分子和细胞水平的调节而言，酶的诱导和阻遏、正反馈与负反馈、细胞结构的部位效应和细胞膜的通透性等等，其协调的作用点是酶。在多细胞生物来说，在动物则以神经的调节占主导地位。神经系统对于代谢活动的调节是迅速准确而集中的，激素的调节则较缓慢持久而广泛。分子和细胞水平的调节是比较单一的。高级水平的神经及激素的调节仍不能脱离分子和细胞水平的调节，是以分子和细胞水平的原始调节为基础的，所以其作用点仍可归结为酶。

基于细胞即酶水平的调节在整个代谢调节控制作用中的基础地位和以微生物为对象的针对性出发，我们将只讨论细胞水平的调节控制作用。

第二节 细胞水平的调节机制

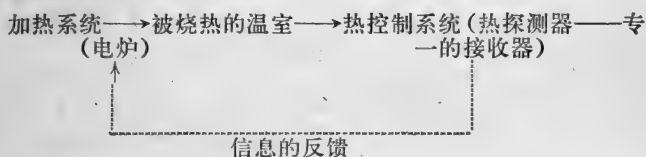
一、两个反馈体系控制酶的活动

生物体的新陈代谢是在细胞内进行的，细胞不宜只看作是一个充满着各种物质的小口袋，而实际上细胞象个有着一定组织结构的加工厂，它把从周围环境摄取的各种各样原料进行分解，产生能量，并依此能量以及分解产物为原料合成细胞成分。实际上细胞这种工厂的高度组织性、协调性、复杂性、高效率与自动化程度是我们现有的任何自动化工厂所不能比拟的。在正常情况下，各种生物包括最简单的细菌，它所合成的各种产物一般是不会过度地超过自身需要而继续合成，也不会感到缺乏的。其所以如此，是因为存在着自动的调节控制机制。象任何工厂不能没有机器那样，细胞工厂的基本机件是生物催化剂——酶。任何一种产物（例如特殊的蛋白质）的合成都需要一系列的步骤，每一步均要求特殊的酶。显然，细胞有两种可能的方法来控制某一产物的产量：（1）改变反应链中某步或全部酶（机器）的数量；（2）改变反应链中某步或全部酶的操作速度（即酶的活性）。因此，酶不但是细胞工厂生产的主体而且是代谢调节的基础和关键，通过对酶的控制最直接而有效地控制了产物的生产。通过研究表明，这种改变酶的数量或改变酶的活性而控制产物生产的控制因素就是代谢物（包括底物及产物）本身。这种对酶的数量和（或）对酶的活性的控制作用是由两个互不相关的反馈控制体系分别进行的，一个调节酶的合成，另一个调节酶的活性。

以常见的大肠杆菌作为材料所进行的研究，给这种控制方式提供了最好的证据。最早的实验关系到该细菌细胞中 L-异亮氨酸的制造。这种氨基酸在细胞中的主要消耗是与其他氨基酸一起用来合成蛋白质。如果在细胞中这种氨基酸多于制造蛋白质所需的正常需要量时，实验证明，这时细菌就停止自身制造这种氨基

酸。在这种情况下，细胞中该氨基酸的含量可以作为控制它自身合成的信号。如果含量低于一定的水平。细胞则重 又开始合成L-异亮氨酸。这种过程好象恒温室使用可调加热系统自动保持室温恒定一样，L-异亮氨酸在细胞内的浓度也保持一定的恒定水平。

在控制论上，这种恒温控制的方式叫做反馈控制 (feed back control)。就拿恒温调节控制系统来说，电炉丝加热的结果，使温度逐渐上升，造成停止加热的条件，达到一定温度时，加热系统被切断；停止加热，由于热量的散失(相当于蛋白质合成对L-异亮氨酸的消耗)使温度下降，又造成重新加热的条件。这种反馈控制的情形可表示如下：



“反馈”原来是电子工学的概念，后来引申用于化学反应体系。其意义为“输出对输入的控制”或“需要对供应的控制”。或可总的概括为“一种运动的效果反转过来对运动本身发生影响的作用”。

当化学反应进行时，造成对该反应不利的条件，使反应速度降低甚至停止，从而又恢复对反应有利的条件，又使反应加速。这样反复相互控制的结果使反应保持正常状态，正象温度调节器保持恒温一样。

代谢过程中的反馈控制是指反应链中某些中间产物或终产物对其前面某步反应速度的影响。凡能使反应速度加快的称为正反馈，凡使反应速度减慢的称为负反馈。在后面将可见到代谢调节中的负反馈控制方式，与在其他控制体中一样是更为常见和普遍的控制方式。

细胞中L-异亮氨酸的浓度在制造它自己的过程中起着负反馈控制的信号的作用，那么控制是怎样进行的呢？发现，过量的L-异亮氨酸对细胞具有两种作用：一种是抑制合成反应链中第一

步反应所需的酶 L-苏氨酸脱氨酶的活性；另一种是它能使细胞停止合成生产它自身所需的全部酶类（图 12-1）。这种控制方式完全和我们先前设想的控制细胞工厂的生产可以从控制投入生产线的酶量以及控制酶活性这样两种途径入手完全一致。并且这两种机制彼此之间是不发生关系的。通过对大肠杆菌突变菌株的实验发现，一种突变能使细胞丧失 L-异亮氨酸抑制 L-苏氨酸脱氨酶的能力，而另一种突变作用却能使细胞丧失 L-异亮氨酸阻止制造这整套酶的能力。这两种突变作用定位于细菌染色体的不同地方。显然这两种控制机制是完全分开的。

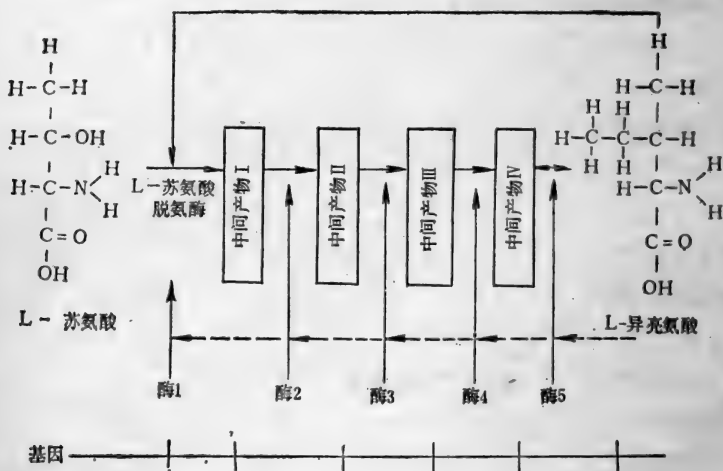


图 12-1 两个反馈系统控制着细胞产品的生成
此图为大肠杆菌中 L-异亮氨酸的生成，合成链中的最终产物起着信号的作用，它抑制反应链中第一个酶(L-苏氨酸脱氨酶)的活性——，还能阻止反应链中所有酶的生成……

二、细胞水平调节控制模式

细胞水平的代谢调节机制主要是代谢物的反馈控制（图 12-2）。前面已经提到，这种控制可以通过控制酶的活性或控制酶的

合成即控制酶的浓度来实现，或者这两种机制同时进行。属于细胞水平的调节控制，还有细胞结构的部位效应(隔离效应)和细胞膜通透性的调节。但是，其协调的作用点仍然是酶，并且同样是通过影响上述两种反馈控制机制来实现的，所以将着重讨论关于酶合成的控制及酶活性的控制这样两种反馈控制机制，并将简述细胞的通透性问题。

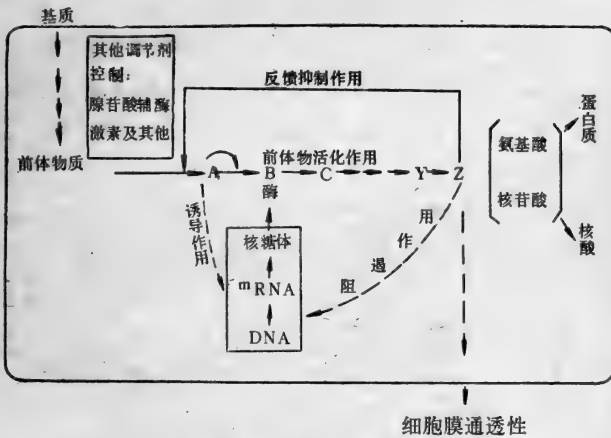


图 12-2 细胞水平调节模式

三、关于酶合成的调节(诱导、阻遏作用)——操纵子学说(operon theory)

细胞内特定的酶浓度，显然主要地是由细胞内该酶合成的速度与破坏的速度所决定。一定酶浓度是这两个相反过程平衡的结果，关于影响细胞内酶的破坏因素及其在调节细胞内酶浓度中的作用所知甚少，不过可以想象，这个过程在调节酶浓度方面的功能不会有重要地位的。影响细胞内酶浓度的主要方面是关于酶的合成的调节控制问题。细胞中酶(蛋白质)的合成可以由几个不同的环节加以控制，从而调节细胞内酶的浓度，即可以由控制 mRNA 与核糖核蛋白体的附着、调节转录和/或翻译的速度、控制

m-RNA 分子的周转率等环节来实现。在细菌中，控制 m-RNA 的合成即转录水平的控制比其他环节的作用远为重要。

通常细胞内酶浓度的控制从两个不同的方面被观察到：(1) 细胞内原先不存在的酶的诱导生成作用；和 (2) 细胞中原已存在的酶的继续合成的阻遏作用。诱导作用表征着酶合成的开动，而阻遏作用表征着酶合成的关闭。对在细菌中这样两个过程的例子是认识得比较早的。

如前所述，在以大肠杆菌为材料研究细菌的代谢调节控制实验中首先观察到 L-异亮氨酸不只有抑制 L-苏氨酸脱氨酶的作用，而且能阻止由 L-苏氨酸脱氨酶开始的有关合成 L-异亮氨酸的全部酶的继续合成。继之，J. Monod 等人发现过量的色氨酸的存在有如上 L-异亮氨酸相似的作用。这是产物的存在作为一个不需要合成这些有关酶的负反馈控制信号的最早观察。其实关于代谢物控制酶的合成的事例最早是在本世纪初由研究酵母的乳糖发酵时首先观察到。Frederic Dienert 发现了细胞中酶合成的诱导作用，他发现在乳糖培养基上培养过几代的菌株能够立即对乳糖发生作用，这些细胞具有大量的乳糖酶(β -半乳糖苷酶)。能特异地降解乳糖(图 12-3)。而没有在乳糖上生长的酵母则缺少这种酶。

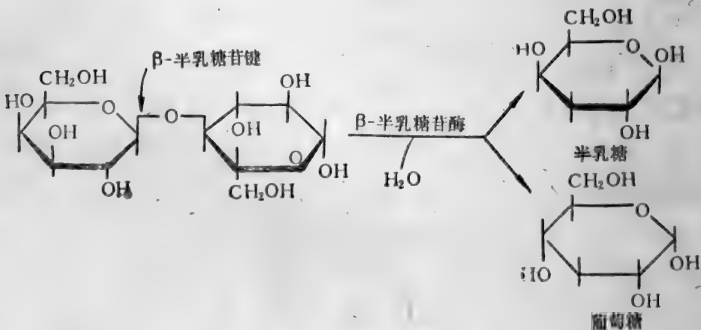


图 12-3 β -半乳糖苷酶

(一) 酶合成的诱导作用

目前研究得最清楚的是大肠杆菌的包括 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 的可诱导体系。当大肠杆菌生长在以葡萄糖为唯一碳源和能源的培养基上时, 平均说来, 每个细胞只含有 1 分子的 β -半乳糖苷酶 (每细胞中 β -半乳糖苷酶 的数目可以将酶与人工的荧光物质结合, 然后在荧光计上测量荧光而测定。这种检验是十分灵敏的, 能够允许检测单个的酶分子)。如果细胞被转移到含有乳糖而不含葡萄糖的培养基, 那么约在 2 分钟后即开始合成 β -gal, 并继续合成达到每细胞约含 3000 个酶分子的水平。现已知道, 与 β -gal 一起诱导合成的还有另外两个酶。一是乙酰化酶其功能尚且不知; 另一是透性酶 (permease enzyme), 该酶有助于乳糖进入细胞。关于乳糖操纵子诱导酶系的代谢功能见图 12-4。

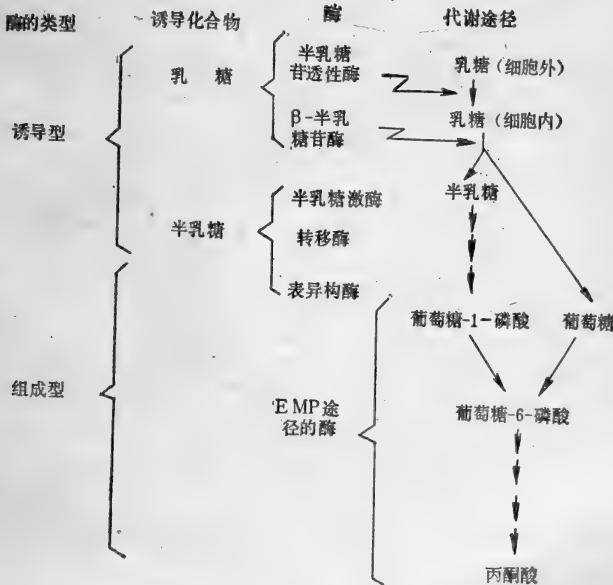


图 12-4 乳糖诱导酶系的代谢功能

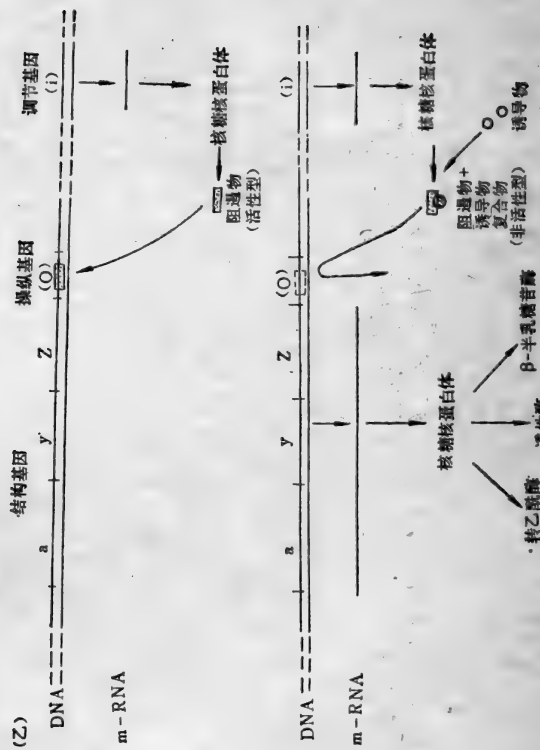
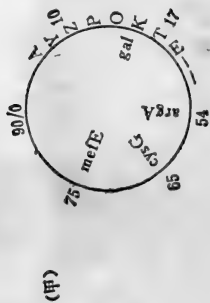


图 12-5 乳糖操纵子(甲、乙)



六十年代初, Monod 和 F.Jacob 对酶合成的调节控制的基本机制作了深入研究。他们首先发现大肠杆菌的一次突变能够消除乳糖对乳糖酶合成的控制: 即没有乳糖存在时, 突变细胞象它在有乳糖存在时一样合成 β -半乳糖苷酶。在这些细胞中, 改变了的只是它们的触发作用: 它们所制造的酶完全和没有发生突变的细胞所合成的酶一样。即酶合成的速率(或合成与否)好象完全受一种基因控制, 而酶的结构则完全由另一种基因所决定。遗传学的实验证明了调节基因和结构基因确实是在细胞的染色体的不同位置, 从而证实了上述情况。

三个不同的酶的合成由一个诱导物——乳糖所同时控制, 可由这样的事实作解释, 即为这三个酶编码的结构基因在细菌染色体上是相邻接的, 并且这三个结构基因被转录成一个多基因—m-RNA。转录本(transcript)转录是由基因链的 β -gal 端开始的, 每次转录形成的 m-RNA 有 β -gal 的基因及其他两个酶的基因。

关于酶诱导合成的机制问题即上面提出的“调节基因”如何控制“结构基因”工作的问题, 这就是一九六一年 Jacob 和 Monod 提出的操纵子概念, 他们并且完成了乳糖操纵子调节机制的详细细节。认为, 调节基因可以使细胞产生一种阻遏物分子, 这种分子控制着结构基因功能的表达。在没有乳糖存在时, 阻遏物分子阻止结构基因的转录, 从而阻止了结构基因指导乳糖酶等三个酶的合成。但是阻遏物分子并不直接作用于结构基因, 而是把自己结合到一个特殊的结构——操纵基因上。操纵基因和染色体上负责该酶合成的结构基因紧密地联结在一起。这种被称为操纵基因的特殊遗传结构和与它紧密联接的有关结构基因一起被称为操纵子, 操纵子是染色体上调节来自一个或数个结构基因的 m-RNA 的合成的区域。阻遏物和操纵基因结合能阻止相邻结构基因的转录, 这样就导致一系列酶的合成被封闭。

乳糖操纵子(图 12-5)包括: 三个结构基因 Z、Y 和 u, 分别相应于 β -半乳糖苷酶, 透性酶和乙酰化酶在转录时产生一个多

基因 m-RNA 的转录本；一个操纵基因区域(O)，它是识别由调节基因 *i* 产生的调节蛋白即阻遏物分子的部位，调节基因是调节蛋白的编码单位。另外还包括一个启动子(Promotor) (P)，它位于操纵基因的前面，是结构基因在转录开始时 RNA 聚合酶与之结合的部位。这些是操纵子这样的结构基因转录及其控制单位的必要成员。(注意：不包括调节基因在内)。

(二) 酶合成的阻遏作用

在酶的诱导合成机制清楚之后，就容易了解酶合成的阻遏作用了，无论是酶合成的可诱导操纵子体系或酶合成的可阻遏操纵子体系，其关键在于由调节基因所产生的专一物质——阻遏物(repressor)。细胞内不同调节体系的各种阻遏物是专一的“接收器”，每一接收器能辨认出一种特殊的信号，从而促使酶的合成或停止合成。因此，几乎在乳糖操纵子概念提出的同时，人们就努力了解由调节基因所产生的控制相应的操纵子活动的特异性物质的化学本质及作用方式。首先，人们认为阻遏物分子是 RNA，这主要是因为 RNA 是 DNA 的直接转录产物，并设想该 RNA 分子与操纵基因 DNA 结合，这样就能停止该操纵子结构基因的转录。但是 RNA 终究不是一个合适的物质，当发现阻遏物的活性能被蛋白质合成的抑制剂所抑制时，对阻遏物的假设就转向蛋白质。

那么，诱导体系与阻遏体系控制酶合成的机制上主要的不同之点在于：在诱导体系诱导物分子与具有活性的阻遏物分子结合，从而使其失去活性。而在可阻遏的操纵子体系中该调节基因产生的阻遏物不具活性，而代谢的末端产物——辅阻遏物(Co-repressor)，能活化该阻遏物。调节基因所产生的阻遏物蛋白显然是属于变构蛋白(本节五将详述)，它接受信号——诱导物或辅阻遏物而起调节作用的机制可由图 12-6 表示。

首先纯化得到乳糖操纵子阻遏物蛋白(分子量约 150,000 道尔顿)并对其与乳糖操纵基因的结合作用作了研究的是 Walter

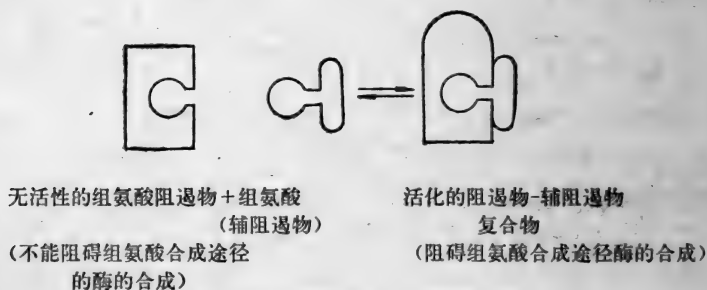
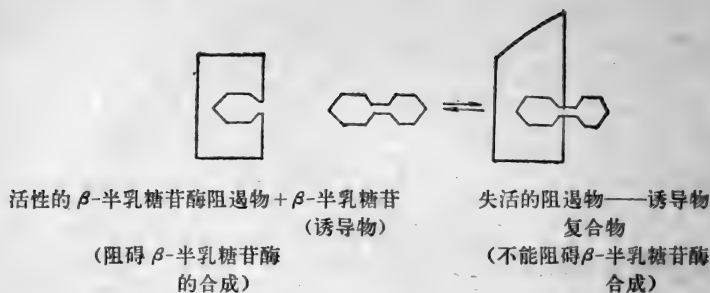


图 12-6 诱导作用和阻遏作用的模型

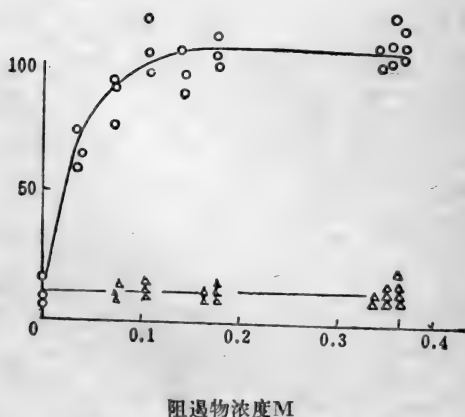
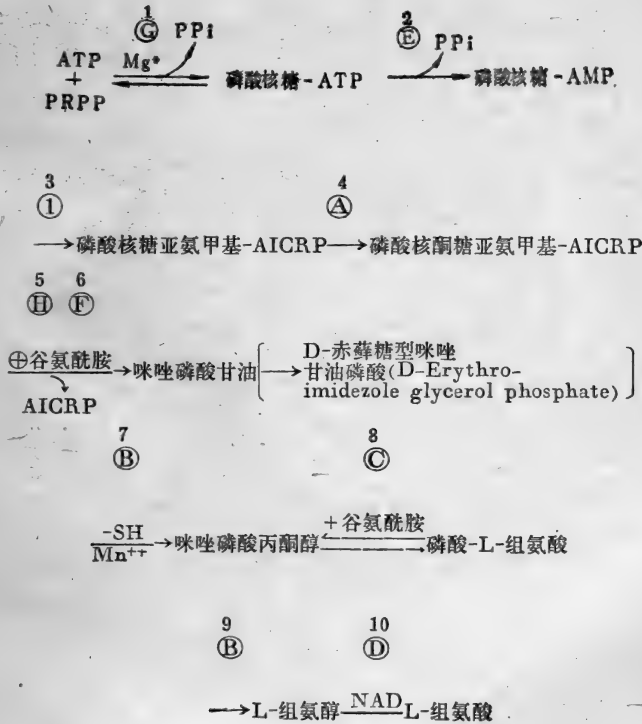


图 12-7 乳糖操纵子阻遏物与操纵基因的结合曲线
○—诱导物不存在的情形
△—诱导物存在的情形，诱导物浓度为一定数

Gilbert(图 12-7)。

沙门氏杆菌 (*Salmonella typhmuri*) 的组氨酸操纵子 (His operon) 是目前研究得最清楚的可阻遏操纵子体系 (图 12-8)。它共有 9 个结构基因, 为参与组氨酸生物合成的 10 个酶编码的代谢途径步骤, 催化这些反应的酶与结构基因的关系如图 12-8 所示。全部结构基因都被组氨酸同等地阻遏, 这是因组氨酸充当了辅阻遏物的作用, 当蛋白质的阻遏物未与组氨酸结合时, 它是潜藏的即不显示活性的, 而整个过程表现为一个单一的 m-RNA 分子的转录作用。此组氨酸操纵子的 m-RNA 是迄今研究所知的最大的多基因 m-RNA。



基因 步骤	E 2	1 3	F 6	A 4	H 5	B 7.9	C 8	D 10	G 1	O
酶	焦磷酸 水解酶	PR- AMP 水解酶	环化 酶	异构 酶	氨基转 移酶	脱水 磷酸酶	转氨 酶	脱氢 酶	PR- ATP 焦磷酸化酶	

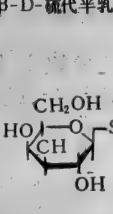


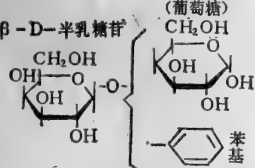

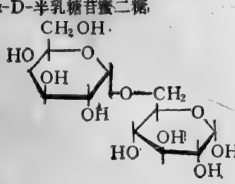
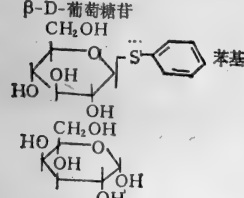
图 12-8 组氨酸操纵子 (组氨酸合成途径及有关酶与基因控制之间的关系图)

总之，诱导和阻遏虽则它们的结果相反，却是两种极为相似的效应。它们都控制酶蛋白的合成速度，都有高度的特异性，但这种特异性都和所控制的酶的作用的特异性无关。诱导作用和阻遏作用的动力学是相同的，在功能上不同的有关酶类常同时被一种底物或代谢物所诱导或阻遏，并且它们被诱导和阻遏的程度也是相同的。

诱导效应和阻遏效应的显著相似性表明此二种效应是基本上相似的机制的不同表现形式。从逻辑上说这意味着可能是在诱导体系中诱导剂是作为内部阻遏物的拮抗者，也可能是在阻遏体系中辅阻遏物作为内部诱导剂的拮抗者。经研究表明(已如上述)，生物体酶合成的控制作用的诱导或阻遏方式在绝大多数情况下是一种负反馈的控制，即诱导作用是一种内部阻遏作用的拮抗，而阻遏作用即是这种潜在的内部阻遏作用的活化(见图 12-6)。这种接收诱导物(在可诱导体系)或辅阻遏物(在可阻遏体系)中的阻遏物象一种高度自动化装置的“接收器”那样应对所接收的信号有高度的辨认能力，才能保证酶的合成按需要而准确地进行。然而好象其他自动化的机器也可能受骗一样，操纵子这种高度自动化的装置对所接收的信号亦可能发生错误，如伪造的货币亦可能使自动售货机售货一样，某些类似乳糖的人造化合物(如异丙基 β -D-硫代半乳糖苷-IPTG)也是 β -半乳糖苷酶极好的，甚至更好的诱导物，但却不能被 β -半乳糖苷酶所降解(见表 12-1)。这意味着细胞受骗了，消耗了能量来产生一些它不能使用(没有使用的对象)的酶类，相反地在可阻遏体系中受骗同样可能发生，而且发生这种事件时所造成的后果比前者要严重得多。有一种色氨酸类似物叫

5-甲基色氨酸, 它能象色氨酸一样在色氨酸操纵子中起辅阻遏信号的作用(也可能还起到反馈抑制信号的作用), 因而, 细胞停止制造色氨酸, 但它却不能代替色氨酸参加到蛋白质的组成中去, 没有

表 12-1 各种半乳糖苷对 β -半乳糖苷酶及乙酰化酶的诱导

化 合 物	浓 度	诱 导 值	
		β -半乳糖苷酶	乙酰化酶
β -D-硫代半乳糖苷 	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$ (异丙基) 10^{-4}M	100	100
	$-\text{CH}_3$ (甲基) 10^{-4}M	78	74
	10^{-5}M	7.5	10
	 (苯基) 10^{-3}M	<0.1	<1
	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  (苯乙基) 10^{-3}M	5	3
β -D-半乳糖苷 	10^{-3}M (葡萄糖) 10^{-3}M	17	12
	 苯基 10^{-3}M	15	11
α -D-半乳糖苷蜜二糖 	10^{-3}M	35	37
β -D-葡萄糖苷 	10^{-3}M	<0.1	<1
	10^{-3}M	<0.1	<1

色氨酸（色氨酸饥饿）细胞就无法制造绝大多数蛋白质而饥饿死亡。因此这种信号(5-甲基色氨酸)事实上起到了抗菌素的作用。

以上两类类似物在酶的诱导和阻遏中所起的作用在发酵生产和菌种选育及医学上都是极有意义的。例如使用人工合成的诱导剂可用于诱导性酶的生产上，而象 5-甲基色氨酸那样的天然辅阻遏物类似物在抗代谢调节菌种的筛选上得到了巧妙的运用。

如上所述，酶合成的基本控制机制是负的，是由调节基因产生的阻遏蛋白在不同的情况下与操纵基因结合，起着阻止结构基因表达的作用。但是在极少数的情况下，例如阿拉伯糖系统中可以看到是一种正的控制机制。阿拉伯糖操纵子(ara operon)的调节基因 C 不产生阻遏物，而是产生一种激活剂或叫起始因子。这种调节基因编码的起始因子对于有关阿拉伯糖代谢的酶的合成是必需的(见图 12-9)。

从逻辑性来说，可诱导性应是与降解外源性底物有关的各种

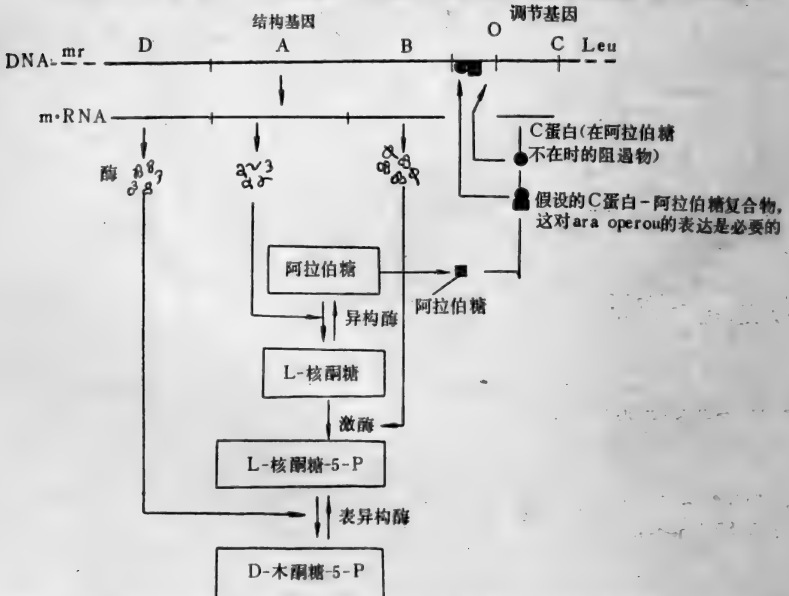


图 12-9 大肠杆菌的阿拉伯糖操纵子(正的控制作用)

分解酶的通则，那么可阻遏性则是合成重要代谢产物(如氨基酸、核苷酸等)的合成酶的通则。所以一般讲来诱导剂都是代谢系列中的底物或其类似物，而阻遏剂(辅阻遏物)往往是代谢系列中的产物或是它的类似物。从以上关于酶诱导或阻遏的机制完全保证了这种原则要求的实现，这是生物长期进化发展过程所形成的有效的代谢调节控制方式。

然而，生物细胞仅有对于酶合成的控制方式还是不够的，尽管这种控制是有效和根本的，但是要使代谢获得迅速而及时的有效控制，那么对酶活性的控制就显得更为重要。

四、酶活性的调节——反馈抑制和激活

如前所述，L-异亮氨酸的存在，不仅会停止制造它合成L-异亮氨酸所需的酶还能抑制氨基酸合成过程中的第一步的酶(见图11-1)。早在50年代就有人观察到酶活性的控制现象，Aaron Novick等人证明，大肠杆菌细胞中过量色氨酸的存在能使细胞立即停止制造色氨酸。这意味着信号(色氨酸)抑制了早就存在于细胞中的酶的活性。Umberger继续研究了L-异亮氨酸对其自身合成作用的酶的直接作用，他把这些酶从细胞中一一提取出来，证明了L-异亮氨酸抑制催化反应过程中的第一个酶(苏氨酸脱氨酶)的活性，也仅只有这第一步反应的酶的活性被抑制。这种作用十分专一，其他氨基酸即便是D-异亮氨酸也不能对酶的活性产生任何效应。

人们必然会注意到这种体系是非常经济而有效的。只要给予L-异亮氨酸达到适宜的程度，细胞马上就停止制造它。信号仅仅作用于第一步的酶，使它丧失活性，就足以停止全部生产过程。可以看到这种反馈抑制的调节作用来得迅速及时而有效，而反馈的阻遏作用则可以使控制作用更加彻底。

大肠杆菌的L-异亮氨酸的控制系统仅仅是活细胞中这种调节作用的一个例子。目前已经证明细胞制造其他的氨基酸、维生

素和核苷酸等重要物质，也都是由相似的迴路来控制的。这样，处于代谢途径的第一步的酶或处在代谢途径的分枝点上的酶往往具有结合一个或更多个代谢物，从而改变其催化能力，这样，这个酶在代谢中就具有接受信号调节代谢的反应速度和方向的功能。这样的酶称为调节酶。调节酶如何接受信号物质，即如何与小分子的代谢物结合，从而使酶的活性丧失(或激活)的。这种抑制作用显然不是象竞争性的抑制作用那样(如丙二酸对琥珀酸脱氢酶的竞争性抑制作用)，是代谢物与底物竞争酶的活性部位；也不是与酶的活性基团直接作用(如氰化物与铁卟啉、碘乙酸与3-磷酸甘油醛脱氢酶的SH基作用)从而使酶失活。当考虑了几种可能的解释之后，Monod Jacob等断言：唯一合理的解释是信号(代谢物)和底物分别结合在酶的不同位点上，信号通过这些位点之间的相互作用发挥效应，影响酶的活性。

五、调节的分子基础——变构蛋白与调节酶

所有的生命体系，从最小的细菌到人类，一切重要的生物功能都离不开蛋白质。酶是蛋白质；使我们能够看、听、尝、嗅的感觉受体是蛋白质；具有对感染免疫能力的抗体也是蛋白质，等等。同样地，控制的基本因素也是蛋白质。

在细胞代谢调节的两种不同的反馈控制机制中起着关键作用的是阻遏物蛋白质和调节酶，前者接受特异的小分子信号物质(效应物)，从而改变其活性状态，使操纵子的转录过程开启或封闭(参见图12-6)，而调节酶能够接受特异的小分子物质，从而改变其催化活性，使代谢过程进行或中断。已有充分的资料证明，在外因的影响下，即在接受细胞自身形成的或由外部进入的特异小分子物质的情况下，这类蛋白质能够改变形状，而正是这种改变形状的能力提供了生命系统中不可缺少的“起-止”控制能力。这类蛋白质被称为变构蛋白质，而对具有这种能力的酶蛋白则称为调节酶(regulatory enzyme 或 allosteric enzyme)。变构蛋白(包括

调节酶)分子表面具有两个或两个以上的各不相同的结合部位。例如对调节酶来说,与底物结合的部位称催化部位,而将能与特异信号物质即调节剂分子结合的部位叫做调节部位或变构部位。变构蛋白一般是具有多亚基四级结构的蛋白质。

酶与一般的催化剂显著不同的特点之一是其“特异性”。最早提出解释这种性质的是 Emil Fischer (一八九四年)的“模板”或“锁与钥匙”的假设。这个假设认为在酶催化时,底物与酶形成中间产物,只有与酶表面的特定形状相配合的特定化合物才能契合得上,如同一把钥匙对一把锁一样。但是这种呆板的模板理论与事实有很大的矛盾,因此从其他事实引出一个假定,即酶不是原来就以一种与底物互补的形状存在,只是在受到底物的相互作用(诱导)时才形成互补形状的。这种“诱导-契合”理论假设在催化时酶的最终形状是由底物决定的,因此酶是揉曲可塑的。关于蛋白质在小分子的影响下确实改变形状的证据,最初是通过化学研究得到的,后来借助先进的物理学技术,尤其是 X-射线衍射方法,上述假设已完全得到证实。

蛋白质揉曲性的发现并不意味着所有蛋白质都是可揉曲的,或者这种揉曲性是不受限制的。相反有的蛋白质甚至很硬,这就可以用“锁与钥匙”的假说来解释。酶的揉曲性是蛋白质的一个很重要特征。从蛋白质的揉曲性概念可得到这样一个推论:那些不参与化学反应的小分子能够通过改变酶的形状协助一个有缺陷的分子使其催化活性。象底物那样地起作用。相反地一些称为抑制剂的分子能把揉曲性的酶的活化性的形状扭变掉,使酶的催化功能团或结合功能团离散,其中任何一种情况都能生成一种无活性的形状。故一个本身不参与反应的调节剂分子能够通过改变酶的形状而控制其活性。它能通过形成正确的形状而使酶开始作用,或通过形成不正确的形状而终止其活性(图 12-10)。

另外在考察上述调节酶的酶-底物反应速率曲线时,也发现了与一般酶的酶-底物反应速率曲线不同的特点。通常酶反应速

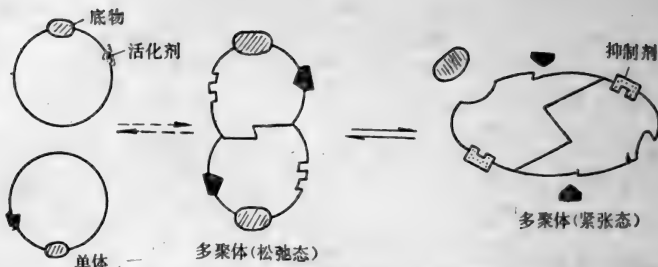


图 12-10 调节酶系统的工作模型。

所有别位分子中调节的变化可以想象是由两种状态之间的来回变更而产生的。多聚体是由许多单位构成的(图中表示两个单位),多聚体与底物(还可能和活化剂)结合呈松弛态,而起催化作用;当多聚体与抑制剂结合时,呈紧张状态,这时酶失去对底物的敏感性而呈抑制状态。某一种信号的结合能促使平衡倾向于这边或那边,但还是保持分子的对称性。

率随底物浓度的增加而增加,双曲线是这种反应速度曲线的特点,这种双曲线反映了底物和酶反应的第一步是底物结合在酶的特殊位点上,当底物浓度增加时,有限的酶分子的这种特殊位点越来越多地被底物所占有。几乎所有的位点被底物占有时,反应速率不再上升,曲线趋平,因而整个曲线呈现出双曲线的形状。但是具有调节功能的酶并不准确按照这种情况表现为双曲线型,它们的曲线常常是S-型的。

具有S-型特点的酶-底物反应速率曲线是具有多亚基聚体构型的调节酶的共同特点。当观察到调节酶的这种饱和曲线时,人们早已注意到具有多亚基结构的人的血红蛋白和氧结合的饱和曲线的特点了(图 12-11)。血红蛋白是结构基本相似的四个单亚基的聚合体($\alpha\alpha\beta\beta$)。其功能在于每个亚基都能与一个氧分子结合。在肺和组织之间传递氧,功能与血红蛋白一致,但结构仅是与血红蛋白的一个亚基相当的肌红蛋白(存在于肌肉)的氧结合曲线却是简单的双曲线形式,从而最早地说明亚基之间的相互作用可以改变形状,从而影响功能。从血红蛋白的S-型结合曲线可以看出,第一个亚基与氧结合以后,可以改变整个分子的构型,增加了其余亚基对于氧的亲合力。而第二及第三亚基与氧结

合后同样增加分子内其余亚基的亲合力。恰如在氧分子之间为了使它们都能和载体结合而起着一种协同作用一样。因此氧起着自身结合作用的调节信号的作用。

同样，协同作用也可能是许多调节酶的结合活性S-型曲线的关键。苏氨酸脱氨酶亦具有这样的特性(图12-12)。这特性的生理功能同样是明显的。假如在细胞中作为这种酶的底物的苏氨酸降低到一个极低的水平，细胞就不能合成蛋白质，所以缺乏苏氨酸时，细胞制造L-异亮氨酸就是白白浪费。因此苏氨酸不足时，另一种氨基酸L-异亮氨酸的合成将会被细胞这种十分经济的控制体系所终止。换句话说，除非苏氨酸增加到阈值浓度以上，否则苏氨酸脱氨酶不被活化，也不合成L-异亮氨酸。在这种情况下，苏氨酸既是底物，又是反应的活化剂，它起着调节信号的作用。另一方面，L-异亮氨酸对苏氨酸脱氨酶的反馈抑制作用的双曲线特点表明，调节信号L-异亮氨酸的浓度在阈值以上时才能显示出来。

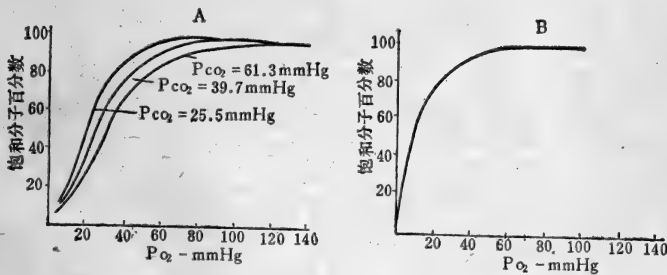


图 12-11 血红蛋白和肌红蛋白与氧的结合曲线

A为血红蛋白与氧结合的曲线，呈S-型。说明当氧和四个亚基的一部分结合后，对氧的亲合力有所增加；B，肌红蛋白为一单肽链，相当于血红蛋白的一个亚基，它和氧结合的曲线表现为体现质量作用的双曲线。

关于具有多亚基四级结构的调节酶功能的另一个很好的例子是大肠杆菌的天冬氨酸转氨甲酰基酶 (aspartate transcarbamoylase)

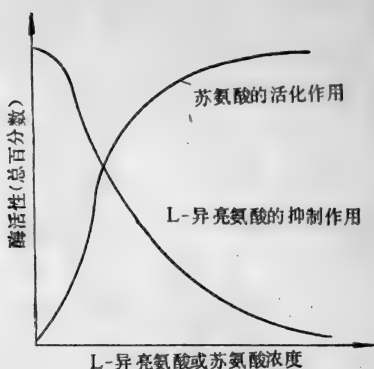


图 12-12 异亮氨酸和苏氨酸对苏氨酸脱氨酶活性的影响

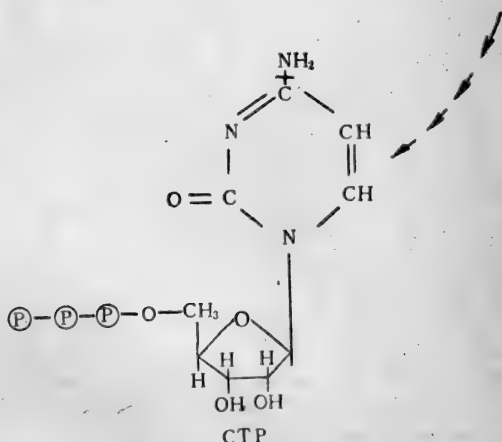
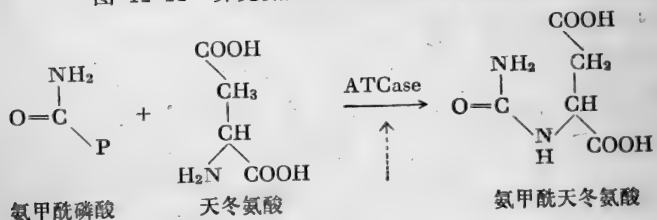


图 12-13 大肠杆菌中嘧啶合成途径末端产物 CTP 对天冬氨酸氨甲酰转移酶（催化氨甲酰磷酸与天冬氨酸缩合成氨甲酰天冬氨酸）的反馈抑制图解。

Lase, ATCase), 这是嘧啶核苷酸合成的第一个酶。

ATCase 的活性能被其代谢途径的末端产物之一胞嘧啶核苷三磷酸(GTP)所抑制 (不是全部) (见图 12-13)。

ATCase 的性质见图 12-14, 该酶已被分离并纯化相当纯度, 其沉降常数是 11.8 S, 分子量接近 300000 道尔顿。它可以进一步解离成 5.8 S 和 2.8 S 的两种组成成分。5.8 S 部分具有催化活性, 而 2.8 S 部分能够与 GTP 结合。当 5.8 S 亚基与 2.8 S 部分分离时, GTP 就不能抑制酶的催化活性, 但是当这两部分重新组合时, 则酶的催化活性重又对 GTP 表现出敏感来。

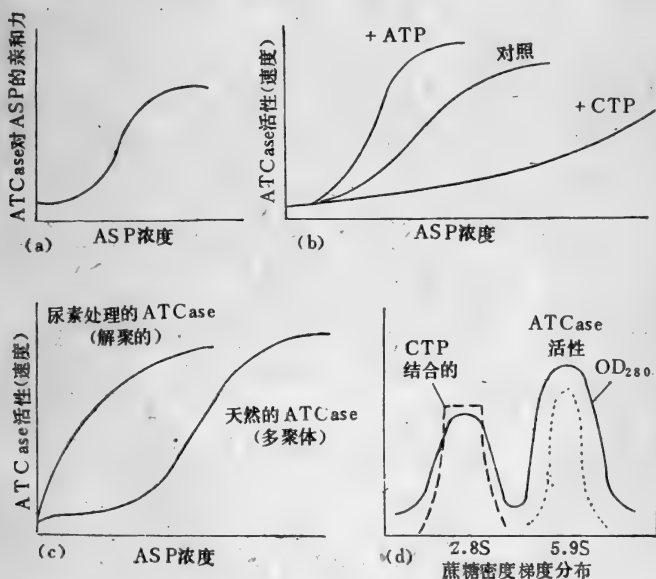


图 12-14 天冬氨酸转氨甲酰基酶(ATCase)的性质

(a) 天冬氨酸(ASP)是ATCase底物之一。由S型曲线表明, 随ASP浓度增长, ATCase的亲合力协作性地增长。(b)象对ATCase的亲合力一样, ASP增长, ATCase的活性增长, CTP抑制ATCase活性, 但不能全部; ATP增加其活性。(c)天然状态ATCase反应速度曲线呈S型, 表明有协同性, 而解聚了的酶的反应速度曲线呈双曲线型。(d)密度梯度离心分离出催化活性的亚基及与CTP结合的调节亚基两部分。

具有催化活性的 5.8 S 部分是每个单体的分子量为 35000 道尔顿的三聚体，其中每个单体具有一个与底物结合的（催化）位点；与 GTP 结合的 2.8 S 部分是每个单体的分子量为 17000 道尔顿的二聚体，每个单体结合一个 GTP 分子。完整的 ATCase 是一个杂合多聚体 (hetero multimer)，蛋白质的约 65% 是 5.8 S 部分，约 35% 是 2.8 S 部分，这和下列的单体——低聚体的关系相符合（参见图 11-15）。

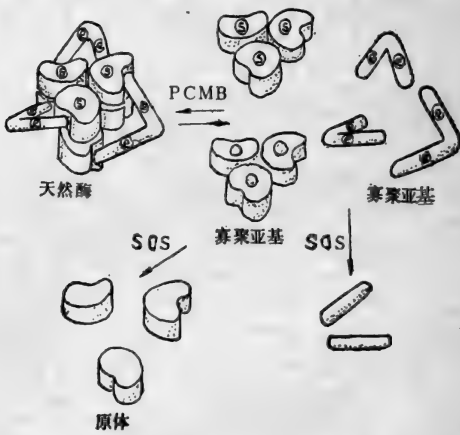
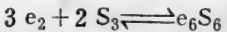


图 12-15 ATCase 的解聚

这里 e 是调节单体（或叫调节亚基），S 是催化单体（或称催化亚基），而 e₆S₆ 是天然的天冬氨酸转氨甲酰基酶（图 12-15）。在天然的 ATCase 中，结合抑制剂和底物的位置是不重迭的。也即位于蛋白质的分别不同的部位上，GTP 的调节作用不是 GTP 对活性位点的直接影响所造成的，而是 GTP 结合到 e 亚基上，这信号通过 e 多肽链传递到 s 亚基，然后影响到活性位点。也就是 GTP 的调节作用是由于 ATCase 的四级结构的间接作用。（参见图 12-16）。

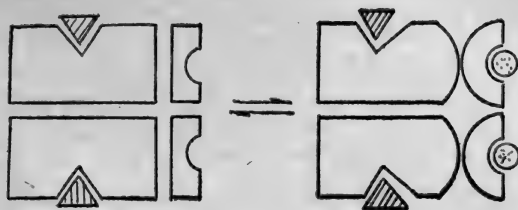


图 12-16 由调节亚基与催化亚基构成的杂合多聚体调节酶的变构抑制现象示意图

表示由两个亚基组成的酶分子其活性部位恰和底物（由三角形代表）契合。较小亚基缺乏和底物结合的部位，但却能和最终产物（圆形代表）结合，使此亚基结构发生变化，转而导致催化亚基变形，使不能和底物契合。这样酶的功能受到它所催化的反应的最终产物的抑制。

除此之外，多亚基酶调节催化活性的方式是多种多样的，如 NADase（裂解 NAD 酶类）及色氨酸合成酶等，但其调节作用的机制尚不十分清楚，不过可肯定的是也都与酶蛋白的变构现象有关。

关于对调节酶的认识，可以总括起来表述为：① 调节酶一般在该代谢产物的第一步或处于代谢途径的分枝点上，并受最终产物的强烈抑制或者一般地还受其第一步反应的底物的活化；② 所以调节酶一般是变构蛋白，具多亚基的四级结构；③ 中间产物不影响调节酶的活力；④ 调节酶后面的酶的活性对最终产物是不敏感的。

如何认识一个酶是否是调节酶，在离体的条件下则可根据① 酶反应速度曲线和底物浓度的关系曲线是双曲线还是 S-型的，调节酶应是 S-型的；② 经汞化合物（如 PGMB），脲等蛋白质多聚体解离因素处理后，调节酶即失去调节功能，但一般并不丧失其催化活性。可用两点来判断。

六、分枝合成途径的反馈调节模式

(一) 酶活性的反馈抑制路线

象前面已经提到的由苏氨酸合成 L-异亮氨酸或是由 ATP 加 PRPP 开始合成组氨酸的途径那样不分枝的合成体系, 末端产物 (L-异亮氨酸或组氨酸) 作为反馈抑制第一步反应的酶的活性或起到整个合成途径有关酶的合成的阻遏作用的信号, 已充分地满足了控制系统的需要。但是这种不分枝合成途径可能只是在局部上看来是这样, 而在整体上可能是一个分枝合成途径的一个分枝。所以, 许多合成途径具有两个或更多个末端产物。在这种情形中, 末端产物的反馈抑制作用要比简单的不分枝的合成途径复杂。一个分枝合成途径例如产生两个氨基酸(图 12-17), 显然一个氨基酸(如 E) 的过剩抑制了这个途径的催化第一步反应的酶 b 的活性将同时阻止另一个末端产物氨基酸(如 G) 的继续合成。换句话说, 假如培养基中外源的氨基酸 E 的存在, 将同时阻止氨基酸 G 的内源性合成, 那么生长将停止。事实上, 各末端产物对分枝合成途径的各自的特异的合成途径的第一个酶行使着反馈控制的功能, 这样, 氨基酸 E 过剩控制酶 d, 该单一途径的第一个酶。同样氨基酸 G 过剩, 将控制酶 f 的活性。多个末端产物对催化合成过程的公共步骤(即 $A \rightarrow B \rightarrow C$) 的第一个酶 b 的控制, 在微生物中已发现一系列不同的反馈控制机制, 这些机制既保证了对整个合成途径的有效控制, 又不致发生代谢调节控制上的混乱。所以下面所讨论的是分枝合成途径公共途径调节酶的反馈抑制的模式和实例。

1. 同功酶

同功酶是指以两种或更多种形式出现的但是催化同一反应的酶。如图 12-18 所示。酶 1 和酶 2 是都能催化 $A \rightarrow B$ 反应的同功酶。酶 1 特异地受末端产物 E 的反馈抑制, 而酶 2 特异地受另一个末端产物 G 的反馈抑制。当产物 E 过剩时, 它仅抑制对其敏

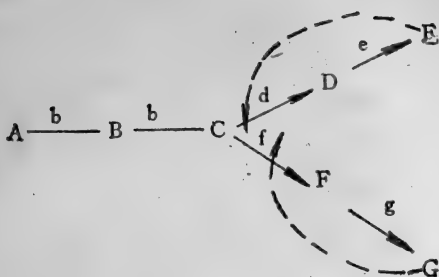


图 12-17 分枝的代谢途径

感的酶 1 的活性，而酶 2 继续催化由 A → B 的反应，同时为了防止由 B 和 C 继续合成 E，在分枝点上有第二个反馈控制步骤受末端产物 E 的控制，而 A 可以顺利地由 B、G 经 F 到 G 进行合成。从而使 E 的过量既控制了不继续合成 E 又不干扰 G 的合成。显然，相反的情形亦是如此。

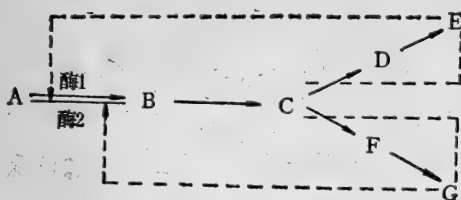


图 12-18 同功酶的反馈控制

对一些生物合成途径，同功酶形式是一种有效的调节控制模式。在大肠杆菌中利用天冬氨酸合成赖氨酸、蛋氨酸和苏氨酸及异亮氨酸的高度分枝的合成途径中就有三种天冬氨酸激酶和两种高丝氨酸脱氢酶的活性，分别受不同的末端产物反馈抑制(图12-19)。

不但如此在上述途径中，天冬氨酸激酶 I 和高丝氨酸脱氢酶 I 实际上是一个酶催化的，即是一个能够催化两种不同反应的酶，

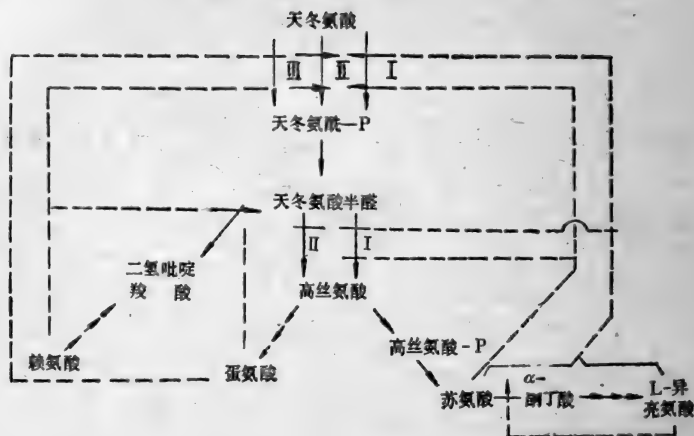


图 12-19 大肠杆菌天冬氨酸族氨基酸合成代谢的调节控制

称作双功能酶，天冬氨酸 II 和高丝氨酸脱氢酶 II 则是另一个双功能酶。

同功酶的实例很多，例如，大肠杆菌及产气气杆菌的芳香族氨基酸合成途径，亦是同功酶起重要调节功能的例子。而且，这种精心调节方式不仅限于合成途径，在分解途径及合成与分解的共同途径的有关酶都有可能以同功酶起调节作用。

2. 顺序反馈抑制(sequential feedback inhibition)

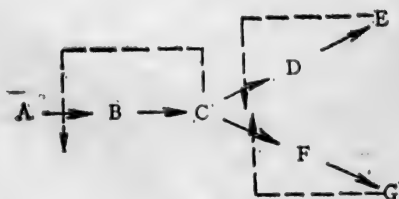


图 12-20 顺序反馈控制模式图

图 12-20 所表示的是末端产物控制的另一种模式，枯草杆菌的芳香族氨基酸的生物合成是基于上述控制模式的。这个机制中催化第一个公共步骤的酶是单一的酶，它对末端产物中的任何一个的反馈控制都不敏感，因为这一步骤是受一中间产物（化合物 G）的反馈控制的。此外，这个分枝途径的第一个发散步骤 $G \rightarrow D$ 及 $G \rightarrow F$ 的反应分别受各自的末端产物 E 及 G 的反馈控制。当 E 及 G 都达到过剩时，中间产物 G 就可能积累，从而使 G 达到能够起到反馈抑制公共步骤 1 的浓度而使整个反应停止。

如图 12-21 所示，色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸合成的开始发散

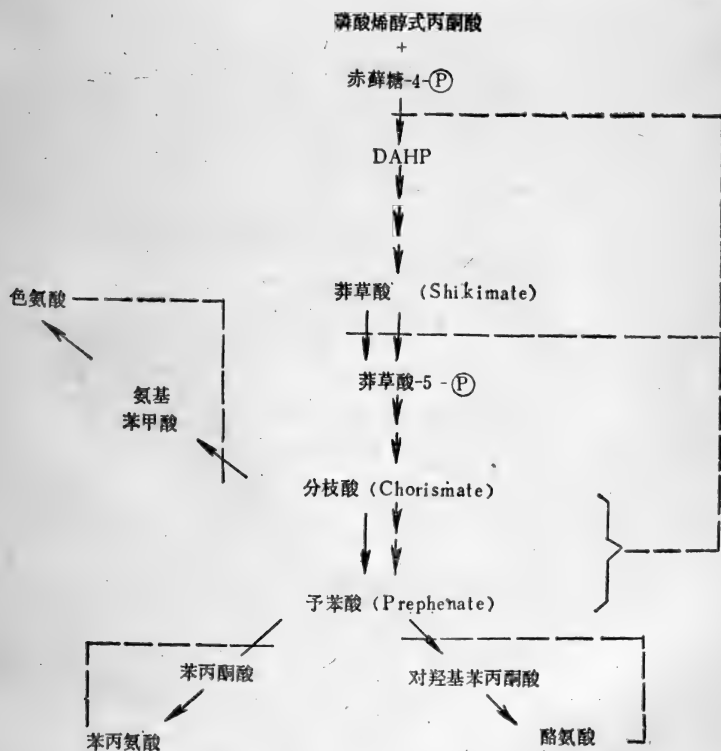


图 12-21 枯草杆菌的芳香族氨基酸合成的顺序反馈控制

的步骤被各自的末端产物所反馈抑制，导致处于平衡的分枝酸和予苯酸混合物的积累。这两个中间物又转而抑制整个合成途径的第一个公共反应步骤。枯草杆菌的这一顺序反馈控制机制还以分枝酸变位酶及莽草酸激酶两种同功酶的形式加以补充。变位酶不被反馈抑制，但是它们的合成能被阻遏。相反莽草酸激酶能被分枝酸和予苯酸所抑制。

3. 协同反馈控制 (concerted feedback inhibition)

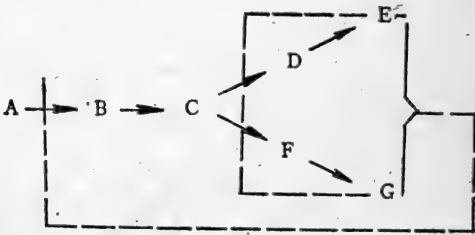


图 12-22 协同反馈抑制模式

协同反馈抑制亦称多价反馈抑制 (multi valent feedback inhibition)，见图 12-22。因为在途径中末端产物的任何一个都不能单独影响起始的公共反应步骤，但是当两者同时过剩时，它们合作共同作用于起始步骤的酶。如图所示，当补充以发散步骤被各自的末端产物所反馈控制这样的方式之后，这种机制保证了分枝合成途径的有效的调节控制。这样的例子可见于 *Rhodospseudomonas capsulata* 和多粘杆菌的天冬氨酸族氨基酸的合成。特别是应用于赖氨酸或苏氨酸发酵生产的谷氨酸棒杆菌亦是这种反馈抑制起主要的调节作用(图 12-23)。

4. 积累反馈抑制 (cumulative feedback inhibition)

与协同反馈抑制机制不同，在积累反馈抑制 (图 12-24) 中，每一最终产物能够单独地抑制共同步骤的第一个酶，这酶对所有末端产物都有别位结合的位置，但是只是部分地抑制，甚至在高

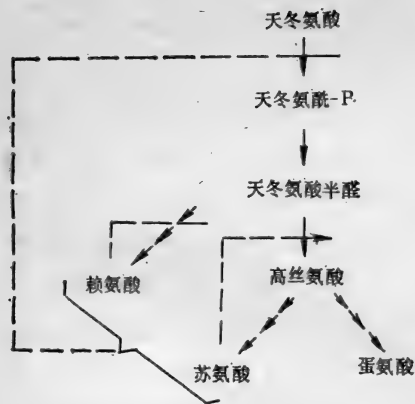


图 12-23 谷氨酸棒杆菌中天冬氨酸族氨基酸的协同反馈抑制

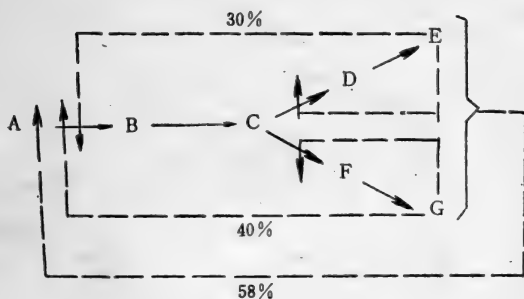


图 12-24 积累反馈抑制模式图

浓度存在时也如此。并且各最终产物的抑制作用互不影响。所以几个最终产物同时存在时，它们的抑制作用是积累性的。如图 12-24 所示，E 和 G 分别单独抑制第一个酶的活力的 30% 和 40%，那么 E 和 G 同时过剩存在时则抑制 $30\% + (1 - 30\%) \times 40\% = 58\%$ ，58% 的数值同样也可由 $40\% + (1 - 40\%) \times 30\% = 58\%$ 计算而得。

积累反馈抑制最早在大肠杆菌的谷氨酰胺合成酶的活性的调

节中观察到，谷氨酰胺在氮代谢中占有中心的地位，在许多细菌中谷氨酰胺是合成其他许多产物包括 AMP、CTP、氨基葡萄糖-6-P、组氨酸和氨甲酰磷酸等的氨基的来源(图 12-25)，此外 α -氨基可由转氨酶作用合成各种其他氨基酸，所以谷氨酰胺合成酶的活性被以该酶催化的反应为起始公共步骤的大量化合物所控制。除此之外，还观察到丙氨酸、甘氨酸单独亦对谷氨酰胺合成酶的活性有抑制作用，并参与积累性的反馈抑制作用。现已证实，这些化合物各自都在谷氨酰胺酶分子表面有特定的结合位置，当这些化合物同时存在时，该酶的活性几乎全部被抑制。

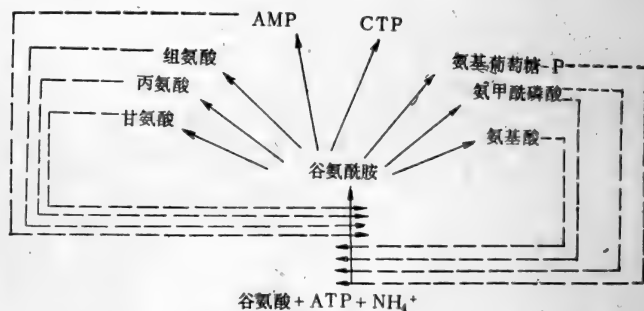


图 12-25 大肠杆菌谷氨酰胺合成酶的积累性反馈抑制

5. 增效性反馈抑制(synergistic feedback inhibition)

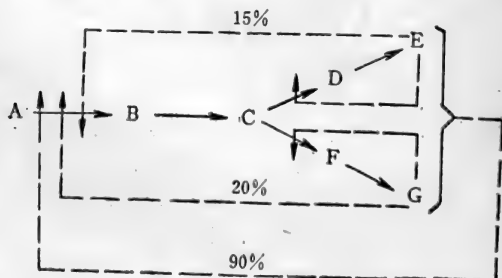


图 12-26 增效性反馈抑制模式

图 12-26 是一种既不同于协同反馈抑制，又不同于积累反馈抑制的模式。当各自的末端产物单独存在时，对公共反应步骤的第一个酶的抑制作用是轻微的，但当 E、G 两个末端产物同时存在时，其既不能使第一个共同步骤的酶全部抑制，但抑制的程度又超过上例积累性反馈抑制所显示的程度。

这类增效抑制作用首先在 6-氨基和 6-酮基的嘌呤核苷酸的生物合成的调节中观察到。两类核苷酸各自能够抑制谷氨酰胺磷酸核糖焦磷酸氨基转移酶的活性，这是催化合成嘌呤核苷酸的第一个酶。资料表明这个别位酶包含有分别与这两类嘌呤核苷酸结合的位点。6-酮基的嘌呤核苷酸的混合物 (GMP + IMP; GMP + GPP) 或含有 6-氨基的嘌呤核苷酸的混合物 (AMP + APP) 不能产生有效的抑制作用。但是 6-氨基和 6-酮基的嘌呤核苷酸的混合物 (GMP + AMP 或 AMP + IMP) 则引起强烈抑制。在地衣杆菌 (*Bacillus lichiniiformis*) 中谷氨酰胺合成酶亦表现为增效性抑制作用。

6. 活化和抑制的联合作用 (combined activation and inhibition)

有时，一些反应的中间产物将转入两个完全独立的代谢途径，这样的情况可用氨甲酰磷酸这样一个既是精氨酸合成又是嘧啶核苷酸合成的共同中间产物来说明 (图 12-27)。在大肠杆菌中，这个中间产物是由氨甲酰磷酸合成酶催化的，它被嘧啶途径的代谢物 UMP 别位地抑制，又能被精氨酸途径的中间产物鸟氨酸所别位地活化。假如培养基中所利用的嘧啶得到供应，细胞内 UMP 的量增高，那么氨甲酰磷酸合成酶受抑制，结果由于氨甲酰磷酸的不足而造成鸟氨酸的积累，转而活化这个酶，这样合成的氨甲酰磷酸能够用来转化成精氨酸。相反，假如精氨酸过剩，N-乙酰谷氨酸合成酶将被精氨酸反馈抑制，结果细胞内鸟氨酸浓度下降，氨甲酰磷酸合成酶的活性将下降。

(二) 分枝合成途径中末端产物的反馈阻遏作用

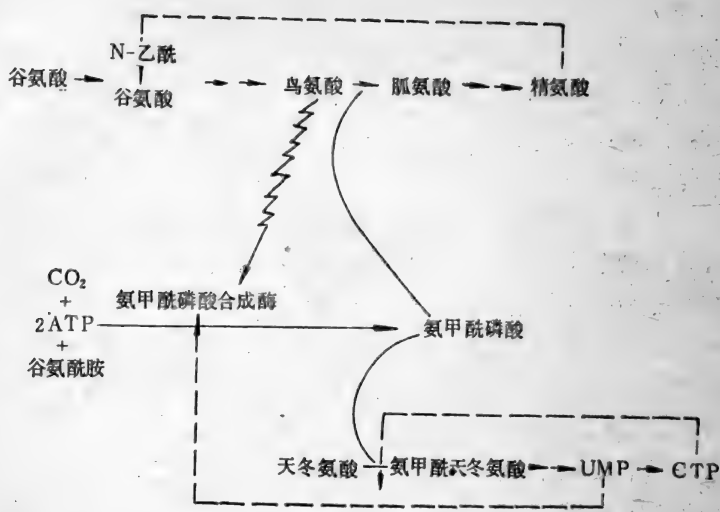


图 12-27 大肠杆菌氨甲酰磷酸合成酶活性的调节
 ———→ 抑制作用 ~~~~~→ 活化作用

分枝合成途径中酶合成的阻遏作用象反馈抑制一样，其机制是复杂多样的。例如大肠杆菌的氨甲酰磷酸合成酶的合成，被精氨酸或被胞嘧啶核苷三磷酸(CTP)部分地阻遏，然而当这两者同时存在时，其合成完全被阻遏。这样，这个关键的别位酶受两个末端产物独立地调节，但发现这两个末端产物的任何一个对氨甲酰磷酸合成酶没有抑制效应。

在同功酶的情形中，受各自末端产物反馈抑制的酶的合成，同样受各自的末端产物反馈阻遏(见表 12-2)。

表 12-2 大肠杆菌天门冬氨酸激酶的调节

酶	阻遏作用效应物	别位抑制作用效应物
天冬氨酸激酶 I	苏氨酸 + 异亮氨酸	苏氨酸
天冬氨酸激酶 II	蛋氨酸	—
天冬氨酸激酶 III	赖氨酸	赖氨酸

从以上不同反馈抑制的讨论可以看出生物体细胞分枝合成途径(或与分解途径)中调节问题的复杂性方面,方式是多样的,有关最终产物与调节酶(这里主要指公共途径的第一个酶)相互作用机制亦是复杂的。即使是生产菌株,有许多细节尚然不是清楚的。

了解各工业微生物代谢途径具体的反馈调节线路,以便设计和筛选具体的抗反馈调节突变种是极为重要的理论指导方面。

七、微生物中几种效应的调节控制解释

(一) 糖代谢的调节与巴斯德效应

首先是葡萄糖,其次是脂肪酸几乎是一切生物能量和细胞构造物质的主要来源,所以糖代谢和脂肪代谢是代谢的枢纽,是提供细胞能源和碳源的根本途径。图 12-28 所示是糖代谢和脂肪代谢的过程调节控制主要环节。可以看出,糖代谢和脂肪代谢是协调的。糖能转化成脂肪,而脂肪酸(乙酰 CoA)亦能控制糖的分解代谢。糖代谢(包括脂肪酸代谢)并没有特定的或真正的代谢末端产物,在某种意义上来说,却可将 ATP 视为其唯一的末端产物。而 ATP 又是生物体一切需能反应的直接推动者,所以 ATP 的产生与消耗是不断发生的。一个生物体的能量储备情况可从 ATP、AMP 这些物质的消长情况来衡量。能荷(energy charge)的概念即是生物细胞中 ATP-ADP-AMP 系统中可供利用的高能磷酸键的量度,它等于 $([ATP] + 1/2[ADP]) / ([AMP] + [ADP] + [ATP])$ 。假如腺苷酸全部以 ATP 的形式存在,其值等于“1”,假如全部以 AMP 形式存在,其值等于“0”。生物体细胞中糖代谢和脂肪代谢是主要产能过程,其中间产物如柠檬酸乙酰 CoA 等亦能起一定的调节剂的作用,但在调节控制中起决定作用的调节剂是 ATP, AMP 等反映能荷的物质, ATP 对产能过程起着反馈抑制的作用, AMP 则起着活化的作用。

糖酵解是糖代谢的主要途径,酵解过程本身要生成 ATP,

因而是生物体细胞在无氧条件下提供能量的主要途径。同时酵解途径又是在有氧条件下以呼吸的方式获取能量的必经途径之一。体细胞由丙酮酸经三羧酸循环可以获取更多的能量。因此从能量利用来说糖酵解是一个需要控制的过程。生物体这种自身调节控制酵解过程的主要表现即是上一世纪已被观察到的现象——巴斯德效应。

巴斯德在研究酵母菌的酒精发酵时，发现在有氧的条件下，

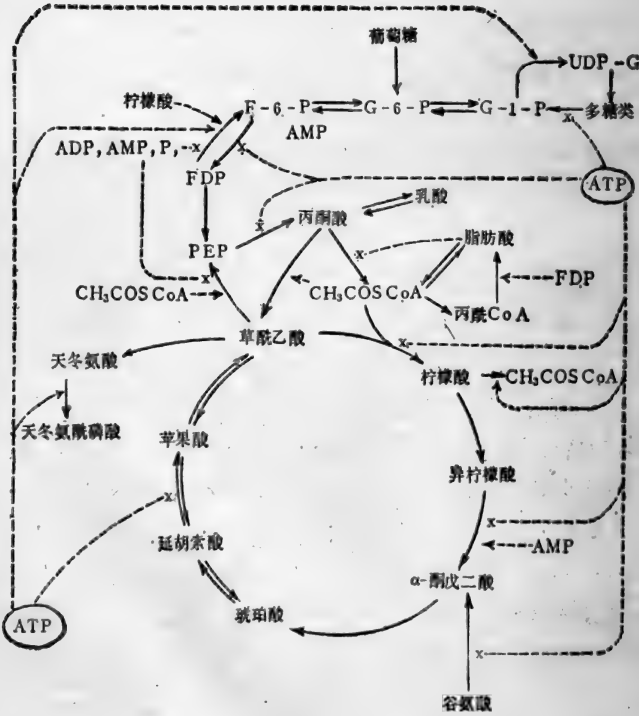


图 12-28 主要生能代谢的能荷调节作用
 ----> 促进, 活化
 ----x 抑制

由于进行呼吸作用酒精的产量大大降低，糖的消耗速度在单位时间内也减慢，这种呼吸抑制发酵的作用后人称之为巴斯德效应。巴斯德效应只在兼性嫌气微生物中才能发生，而且几乎一切兼性嫌气的微生物中都能观察到这种效应对代谢的影响，包括谷氨酸棒杆菌的谷氨酸发酵。

关于巴斯德效应的解释是长期以来试图解决的问题。例如开始人们认为是氧直接抑制了酒精发酵的酶系统，因此使酒精发酵的速度降低。但是在加呼吸抑制剂（如 KCN）或氧化磷酸化解偶联剂（如 DNP）时即使有氧存在，发酵作用仍照常进行，糖的利用并不降低，这就有力地驳斥了氧抑制的说法。

其后的解释认为是细胞浆和线粒体之间 ADP 磷酸化作用相互影响的结果。在糖酵解和有氧氧化中都有 ADP 的磷酸化生成 ATP 的作用。但是酵解过程中 ADP 的磷酸化是底物水平磷酸化，与酵解过程一样是在细胞浆中进行的。而线粒体是细胞呼吸的重要场所，氧化磷酸化作用亦在线粒体上进行。因此当氧气供应充足时，线粒体对 ADP 及 P_i 的亲合力更大，而且耗量更大，抢先利用了 ADP 和 P_i 。这样便削弱了细胞浆中 ADP 的磷酸化作用从而抑制了糖酵解的过程。线粒体内氧化磷酸化的结果生成很多 ATP，按理应加强酵解过程第一步——葡萄糖的磷酸化。实际上则相反，在糖的有氧氧化加强时，葡萄糖的摄取也降低。为什么会出这种矛盾现象呢？认为是隔离作用的结果。因为氧化磷酸化生成的 ATP 在线粒体而葡萄糖的磷酸化在细胞浆内无法供应后者。因此呼吸作用的结果不仅无丙酮酸（乳酸或乙醇）的积累而且葡萄糖的磷酸化亦减慢，葡萄糖的摄取亦降低。

从氧化磷酸化作用及隔离效应方面来考虑似乎对巴斯德效应取得了比较合理的解释，并由加入 P_i 的方法亦取得了解除巴斯德效应的效果。其实这种解释也是不能满意的。素有生物电池之称的线粒体积聚的 ATP 难道不能提供细胞浆需能反应的需要，需知生物合成过程绝大多数是在细胞浆中进行的，包括蛋白质的

合成。

只有在代谢调节控制概念确立及其主要的调节控制机制被阐明之后,巴斯德效应才得到合理的解释。如前所述,ATP是糖的彻底氧化过程的对细胞唯一可以利用的末端产物(CO_2 虽亦利用,但总是排出),所以对酵解过程的控制实际是末端产物ATP的反馈控制作用,由对酵解过程的控制而达到对整个糖的代谢的控制。现已清楚糖酵解过程中的果糖磷酸激酶是一个关键酶,此酶催化 $\text{F-6-P} \rightarrow \text{F-1-6-P}$ 的反应。此酶的活性受ATP的反馈抑制,而这种抑制作用又为AMP、ADP、 P_i 等所解除。因此不论糖酵解的底物是葡萄糖,糖元,或半乳糖,果糖磷酸激酶总是控制着整个糖代谢过程。至于呼吸作用造成葡萄糖磷酸化作用的降低则是由于果糖激酶的活性受ATP抑制从而使F-6-P和G-6-P积累,由G-6-P对葡萄糖激酶的抑制所造成的。

此外腺嘌呤核苷酸在细胞内由于一种酶的催化而处于平衡状态。



因此当ATP浓度高时,AMP的浓度就大大降低。在ATP供应充分的条件下,AMP的浓度是低的,细胞这时能够利用由简单的前体合成糖类,从而储存其底物。当ATP浓度下降时,而AMP浓度上升,这时从能量利用角度应使糖的合成抑制。对糖的合成具有专一性反应的是将1,6-二磷酸果糖水解成果糖-6-磷酸,此酶称果糖二磷酸酶,发现这个酶是受AMP强烈抑制的。

(二)二次生长现象与可诱导体系的阻遏——葡萄糖效应

Gale(一九四二年)以及Monod(一九四二,一九四七年)等在研究大肠杆菌对各种不同混合碳源的利用时发现了二次生长(*diauxie*)现象。当以葡萄糖或其他单一的碳源培养大肠杆菌,菌的生长表现为正常的生长单一曲线。如以葡萄糖和另一碳源如山梨糖醇作混合碳源时,则出现二次生长现象(图12-29),这说明葡萄糖的存在可以阻遏分解山梨糖醇的酶的生成,只有当葡萄糖被用

完之后,才能利用山梨糖醇而生长。其中间停止生长阶段,可以解释为诱导酶的生成时期。这种现象在微生物中广泛存在,被称作“葡萄糖效应”,但是一系列证据表明所谓葡萄糖效应(即葡萄糖阻遏诱导酶合成的效应)并不是由于葡萄糖本身而是由于葡萄糖分解过程产生的一种或多种分解物的作用。显著的理由可从这种效应不只限于葡萄糖,而是在其他不同糖类的利用上也都有类似的现象,一种优先被利用的糖类的分解产物阻遏利用另一物质的分解酶类的产生。

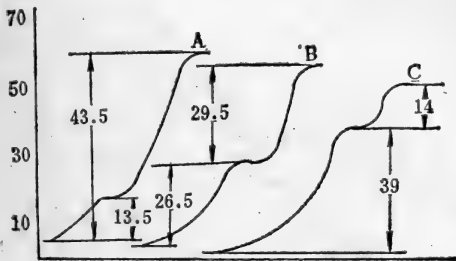


图 12-29 大肠杆菌在含有不同浓度葡萄糖和山梨糖醇的合成培养基中所表现的二次生长现象
 A—葡萄糖 50 γ /ml, 山梨糖醇 150 γ /ml
 B—葡萄糖 100 γ /ml, 山梨糖醇 100 γ /ml
 C—葡萄糖 150 γ /ml, 山梨糖醇 50 γ /ml

曲线中的数字代表每次的生长量。

到目前为止,关于这种分解物阻遏的机制还没有完全明确地确立起来。但是自从发现 cAMP (环-AMP) 分子及其在生物调节中的广泛作用以后,似乎肯定这种分解物阻遏的调节作用与 cAMP 有关。cAMP 在高等生物激素调节作用中起的第二信使的作用。不久前遗传上证明 cAMP 在大肠杆菌的许多诱导酶的合成是必要的。这个结论的证据来自不能合成 cAMP 的突变体。这种突变种不能在乳糖、半乳糖上生长,而且也不能在其他一些

糖上生长。而添加 cAMP 后则恢复了在所有这些糖上的生长能力(表 12-3)。

表 12-3 分解物阻遏作用与 cAMP 的关系

添 加 物	lacmRNA 相对合成速度	lecmRNA 相对浓度	β -半乳糖苷酶 相对合成速度
—	7	4	1
IPTG*	100	100	100
IPTG+葡萄糖	12	10	15
IPTG+葡萄糖+cAMP	119	82	130

* IPTG: 异丙基 β -D-硫代半乳糖苷。

cAMP 不是一个诱导物质, 它不同于诱导物在于通常诱导物对操纵子是特异的, 而cAMP则作用于许多操纵子。cAMP 刺激 B-半乳糖苷 m-RNA 是由于增加了转录作用的起始频率。cAMP 作为酶合成的激活剂的机制的模式(图 12-30)。cAMP 不是直接作用于操纵子的发动子位置, 而是与另一个中间物——cAMP 受体蛋白(cAMP receptor protein)形成复合物, 然后这个复合物再作用于发动子 DNA。

关于 cAMP 在细胞内浓度的调节机制仍然不清楚它是由 ATP 形成的细胞内 cAMP 的浓度与 ATP 的浓度显示相反方向的变化, 因此生长在快速利用的物质上的细胞 cAMP 浓度是低的, 而生长在缓慢利用的物质上时, cAMP 浓度则上升。改变 cAMP 浓度的可能途径有: 第一种方法是最直接的, 即抑制或激活 cAMP 磷酸二酯酶。第二种控制方法仅在细菌中发现 cAMP 能由细胞内向细胞外培养基输出; 这第三种方法是通过控制腺苷酸环化酶的活性。在大肠杆菌中, 葡萄糖代谢物阻遏腺苷酸环化酶的活性从而降低 cAMP 的浓度, 许多正常的细胞代谢物已知是抑制腺苷酸环化酶活性的, 而其他一些则起增强其活性的作用。

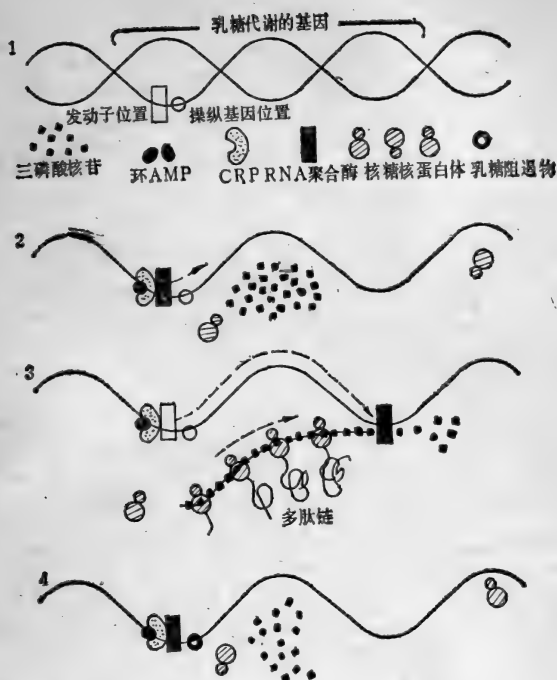


图12-30 cAMP 与乳糖操纵子转录的关系

图 12-30 表明大肠杆菌的无细胞系统中发生的一系列过程 1 培养基给予 RNA 聚合酶，三磷酸核苷，蛋白质 GRP (可逆地与 cAMP 结合) 和乳糖代谢的基因，当 GRP 和 cAMP 的复合物激活乳糖操纵子起点处的发动子位置时，转录准备开始；2 RNA 聚合酶结合到发动子位置上准备以正确的顺序把三磷酸核苷连接起来转录开始；3 转录进行，核糖核蛋白体结合到转录中的 mRNA 上开始组合乳糖代谢的酶；4 如果另一种蛋白质乳糖阻遏蛋白结合到操纵基因位置(在无诱导物存在的条件下)，那么尽管 GRP-cAMP 复合物可以激活起始作用，RNase 亦可以结合到发动子位置但是由于阻遏物阻止 RNA 聚合酶与转录的起始点接触所以

转录仍然不能进行。

分解物阻遏作用在抗菌素发酵的调节控制中有重要意义，许多抗菌素发酵中存在着明显不同的阶段，快速生长的阶段和抗菌素产生的合成阶段。不少抗菌素只在合成阶段产生。生长阶段的特点是菌体的快速生长中就包括多种营养料的平衡的吸收和利用，与此同时中间代谢产物的积累很少。当营养料中任何一种，如易利用的糖，氮或磷消耗到一定程度时即成为限制因素，从而使生长速度减慢；同时菌体内某些中间产物迅速积累，原有酶活力的下降以及新酶的出现等导致生理阶段的转变。抗菌素发酵中，在生长停止，合成阶段开始，新酶出现的例子很多。例如青霉素发酵中，转酰酶活力的上升和青霉素合成能力的出现相联系。又如链霉素合成中转脒基反应以及杆菌肽放线菌素等的合成中，关键的合成酶也都在生长末期出现。上述合成阶段新酶的出现以及抗菌素的产生，在很多情况下都和快速利用的碳源如葡萄糖的消耗密切相联系着。例如青霉素发酵以乳糖和葡萄糖为碳源时，只有后者消耗完了，前者利用时才有青霉素产生。显然碳源的缓慢利用是合成青霉素的关键，因为不加乳糖而将葡萄糖流加也可以提高抗菌素的产量。除青霉素外，应用混合碳源以提高产量的发酵很多，例如放线菌素应用葡萄糖加半乳糖，头孢霉素应用葡萄糖和蔗糖，核黄素应用葡萄糖和麦芽糖。在混合碳源发酵中，缓慢利用碳源的优越性不是由于任何合成前体的形成。现在比较一致的观点是葡萄糖分解产物的存在，阻遏了次生物质的合成酶的生成从而抑制了抗菌素的产生。显然抗菌素发酵两个生理阶段的存在大都是由于葡萄糖的分解物阻遏所引起，阻遏解除后，合成阶段才能开始。在少数情况下，葡萄糖对产物合成的不利影响可能是分解物抑制作用。

第三节 工业发酵是微生物代谢调节的措置过程

生物体细胞如何利用能量以及物质在细胞中转化（包括物质的分解和合成两方面）的复杂过程，经过了半个多世纪的努力已经确立下来了，成为所谓“代谢图谱”。在这一段时间里一直存在着一种模糊的观念，认为这些过程中必须有某些机制调节反应的速度。但只是设想每一过程以最大的可能速度进行着，而仅由酶浓度和原料供应作唯一控制因子。事实证明是不切实际的。在这些代谢途径还没有确立之前是不可能对调节代谢速率的机制进行研究的。但是，在这段时间里陆续积累了不少有关调节机制的线索。由于对各类生命物质的代谢途径和酶体系积累了较为完善的知识，代谢的研究进一步从定性转入定量、由分析转入综合，由个别过程的研究转入普通联系和相互制约的研究。从而对在上述诸种情况下发挥重要作用的重要调节机制已经弄清楚了。这些机制总结和比较于表 12-4。

应该指出，关于代谢调节十多年来，已经获得了丰富的知识，今后将会有重要而引人入胜的新知识的出现而丰富这一领域。揭示细胞的自身调节机制不仅在于揭穿生命之谜，而且在发酵生产和医学实践上有重大意义。在发酵生产中弄清楚发酵产物在菌体内的合成过程，有时会有助于提高产量。例如知道苯乙酸是青霉素合成的前体之一，在培养基中加入苯乙酸就可显著地提高青霉素产量。但加入前体的方法并不是到处都行得通的，例如在肌苷酸发酵中加入甘氨酸，谷氨酰胺，天冬氨酸等前体物质并不能提高肌苷酸产量。相反，有些不是前体物质却对发酵有很大影响，如培养基中加入腺嘌呤浓度过高，对肌苷或肌苷酸发酵有抑制作用，苏氨酸对赖氨酸发酵有抑制作用，淀粉对淀粉酶的合成有诱导作用等等。这些差别现在并不难理解。

表 12-4

细菌中主要的调节机制及实例

机 制	别位蛋白	效 应 物	别位蛋白的活性		生理效果
			单独存在时	与效应物结合后	
末端产物抑制作用 (嘧啶核苷酸的反馈控制)	途径的第一个酶 (天冬氨酸转氨甲酰基酶)	途径的末端产物 (CTP)	催化途径的第一步反应	与效应物结合后催化活性降低	调节小分子的合成 (CTP)
酶的诱导合成: 负的控制 (β -半乳糖苷酶的诱导)	阻遏物 (乳糖操纵子调节基因的产物)	诱导物 (乳糖、底物)	与 DNA 结合, 阻止酶的合成	不能与操纵基因结合, 酶的合成进行	酶的合成, 但当该底物在培养基中存在时进行
末端产物阻遏作用 (组氨酸合成所需的酶的阻遏)	阻遏物 (组氨酸操纵子调节基因的产物)	途径的末端产物 (组氨酸)	不能与 DNA 结合, 酶合成	与操纵基因结合, 酶合成受阻	调节组氨酸合成酶的生物合成
分解物阻遏作用 (β -半乳糖苷酶合成的葡萄糖阻遏作用)	CRP 蛋白	环 AMP	不能与发动子部位结合	与发动子部位结合刺激酶的合成	使细胞优先利用较好的碳源, 调节分解代谢速度
酶的诱导合成: 正的控制 (代谢阿拉伯糖的酶的诱导作用)	阻遏物-起始因子 (阿拉伯糖操纵子调节基因 C 的产物)	诱导物 (阿拉伯糖)	阻遏物形式, 结合于 DNA 的操纵基因, 使酶的合成受阻	活化因子形式, 结合于 DNA 起始位置, 酶合成	酶的合成仅在阿拉伯糖存在时才进行

在科学中, 发现新情况, 研究新问题, 建立新思想是十分重要的。

例如, 六十年代, 在有关金霉素合成机制和积累的研究中, 由于忽视了从代谢调节控制机制上来探讨问题而只是依据质量作用定律来看待生物化学反应的变化, 因此走了弯路。所以我们说在科学研究中不应当满足于一般的经验知识, 我们要勇于从实践中和科学的发展中吸取新的资料 and 选择有意义的思想方法。

五十年代开始, 生物化学家逐渐从研究中间代谢的过程转入

到研究代谢途径的调节和控制问题，这与控制论的思想方法明确运用于生物学的研究有关。其实微生物的发酵生产过程绝大多数是用各种方法打破微生物原有的代谢平衡，在使微生物代谢建立起新的平衡而又保证其适当生存的条件下，为人类积累某些必要的产品，是属于控制微生物代谢的一种措置过程。从而使古老的工业微生物发酵进入了一个新的历史阶段——代谢控制发酵。从六十年代开始，代谢调节控制在氨基酸核苷酸等发酵上的应用，已经看到了十分显著的效果，是生物化学研究领域理论指导实践，从而推动了生产发展的光辉例证。

突破微生物的自我调节控制机制，而使代谢产物积累的有效措置有三种，第一是应用营养缺陷型菌株。在这些缺陷型菌株中，由于合成途径中某一步骤发生缺陷，合成反应不能完成，最终产物不能积累从而解除了反馈调节作用而使中间产物积累或另一分枝途径的末端产物得到积累；第二选育抗反馈调节的突变菌株，因为这些菌株不再受正常反馈调节的影响，最终产物能够积累；第三种方法是改变细胞膜通透性，不使最终产物在细胞内积累而引起反馈调节的浓度(见图 12-2)。以上三种有关菌种的生理条件是十分重要的，是使氨基酸、核苷酸等微生物自身必需物质过度积累的成功的关键，是内因。此外，发酵的环境条件如 pH， NH_3 ，氧的供应，营养浓度的控制，表面活性剂的使用等亦都非常重要。

工业发酵已经迅速地由艺术进入了科学。新方法学的代表者 Demain 一九六六年曾恰当地描述过：“谁珍视微生物学的，生物化学的，以及最重要的是微生物和它的人工 (man-made) 环境之间的遗传关系，谁将获得报酬。”现在，在氨基酸，核苷酸等的发酵方面已经最明白不过地证实了他的描述。

第四节 代谢调节控制与育种

从氨基酸核苷酸等工业发酵的成功经验，可以清楚看到代谢调节控制的理论能为遗传育种指明进攻的方向。这些新型发酵工业所使用的育种以及饰选的方法也都与以往所使用的菌种及常规饰选方法根本不同。由于首先明确了有关代谢途径中反馈调节的存在，所以可以由代谢调节控制的理论指导，选育所需的特定遗传类型的突变菌株，这种微生物突破了自身的调节机制，在积累人们所需代谢产物方面是合乎要求的。

一、减低末端产物浓度营养缺陷型及其在生产上的应用

所谓营养缺陷型(auxotrophic type, X^-)是指原菌株因基因突变(一般为合成途径的某一单一结构基因突变)致使合成途径出现某种缺陷，造成微生物必需的某种营养物质不能自身合成的突变型。这是一种减低或消除末端产物以解除反馈控制的措施。例如用于简单代谢途径的鸟氨酸或瓜氨酸积累，以及分枝代谢途径的IMP或XMP的积累，这些都是中间产物；也有用于分枝代谢途径末端产物积累的，如苏氨酸，赖氨酸，缬氨酸等。营养缺陷型突变菌株常以所需营养物质的头三个字母表示，如蛋氨酸缺陷型表示为 met^- ，而相应的野生型则表示为 met^+ 。

营养缺陷型的饰选一般都要经过诱变剂处理，淘汰野生型， X^- 的检出和 X^- 的具体营养要求的鉴定。在饰选中一般要使用三种培养基，分别是：只能满足野生型生长要求的合成培养基，叫做基本培养基(M.M.)；为满足特定 X^- 需要在M.M.培养基基础上补加了某种营养物质的培养基叫补充培养基(S.M.)；而将能满足各种不同 X^- 营养要求的培养基叫做完全培养基(G.M.)。不同菌具有不同营养要求，因而基本培养基也各不同，例如大肠杆

菌的M.M.只含有葡萄糖和几种无机盐,而短小芽孢杆菌的M.M.为葡萄糖,无机盐和生物素。一般使用这三种培养基即能完成特定营养缺陷型的筛选与检出任务。经诱变处理后的培养物分离在完全培养基中,待长出菌落后将它印影(或逐个检出)在基本培养基上,观察在完全培养基中能够生长,而在基本培养基中不能生长者可能为营养缺陷型,选出这种菌落进一步由补充培养基确证和检定是哪一种营养缺陷型。

1. 鸟氨酸发酵

利用精氨酸营养缺陷型 arg^- 实现鸟氨酸的积累是利用营养缺陷型菌株发酵生产的第一个氨基酸。严格说来能使鸟氨酸积累的应称瓜氨酸营养缺陷型(cit^-)(图 12-31)。

鸟氨酸是精氨酸合成途径的中间产物。在这个简单的合成途径中终产物精氨酸对 N-乙酰谷氨酸-5-磷酸转移酶(催化 N-乙酰谷氨酸生成 N-乙酰-谷氨酰磷酸)有反馈抑制作用。这个菌株的瓜氨酸缺陷型(鸟氨酸转氨甲酰基酶的基因突变)失去了合成瓜氨酸的能力,因此精氨酸不会积累,这就解除了精氨酸对 N-乙酰谷氨酸-5-磷酸转移酶的反馈抑制,只要供给少量精氨酸以控制生长,即能积累大量鸟氨酸。

2. 肌苷(IR)与肌苷酸(IMP)发酵

嘌呤核苷酸的生物合成是一个分枝的途径(图 12-32),由磷酸核糖焦磷酸(PRPP)在 PRPP 转酰胺酶催化下,转化成磷酸核糖胺(PRA)开始到 IMP 产生是嘌呤核苷酸合成的公共步骤,然后开始分枝,在产胺短杆菌中形成单向分枝合成途径,而在枯草杆菌中,由于存在着 AMP 脱氢酶和 GMP 合成酶(XMP 氨化酶)的存在,所以形成闭合的环形分枝合成途径,AMP 和 GMP 可以通过中间产物 IMP 而相互转化。在嘌呤核苷酸的合成途径中,由于 AMP 和 GMP 都对起始步骤的 PRPP 转酰胺酶有反馈抑制作用,所以细胞内中间产物 IMP 含量不可能很高。不能用这样的菌株生产肌苷酸。根据图 12-32 所示反馈调节机制可以确定,如

果选育一个 AMP 分枝的第一个酶琥珀酸腺苷酸 (SAMP) 合成酶永远失活的菌株 (Ade^-), 那么 IMP 就可能积累。理由是 PRPP 转酰胺酶被解除了 AMP 对它的反馈抑制, 并且由于 GMP 对其自身的分枝途径的第一个酶 IMP 脱氢酶有反馈抑制作用, 所以 GMP 不会过度的合成。由于 AMP 与 GMP 对其公共途径第一步的酶的反馈抑制存在着某种协作的机制, 即使 GMP 对核酶的反馈抑制不能完全解除, 也不可能造成很大程度的抑制作用, 所以选育 Ade^- 营养缺陷型是有利于 IMP 的积累的。相反, 选育鸟嘌呤缺陷型 (gua^-) 则不能达到有效积累 IMP 的目的。

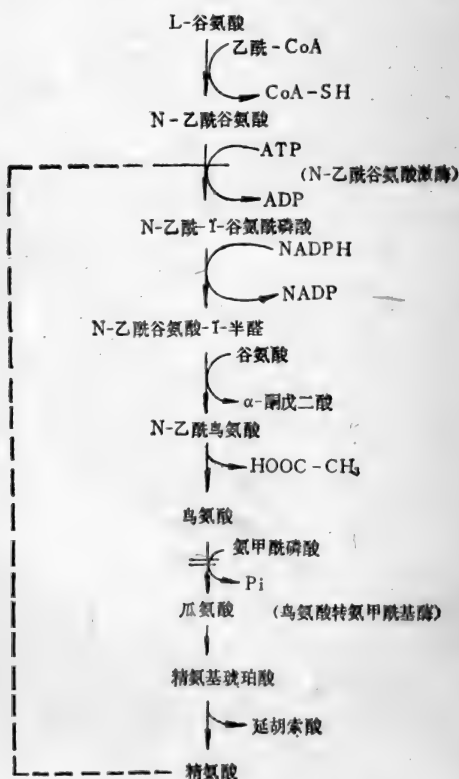


图 12-31 精氨酸生物合成途径及反馈抑制 (谷氨酸棒杆菌)

由于枯草杆菌具有较强的磷酸二酯酶活性，所以该菌一般用于肌苷发酵。而产氨短杆菌积累 IMP 一般首先在体外积累次黄嘌呤，然后在分段合成（补救合成）酶的催化下重新合成 IMP。

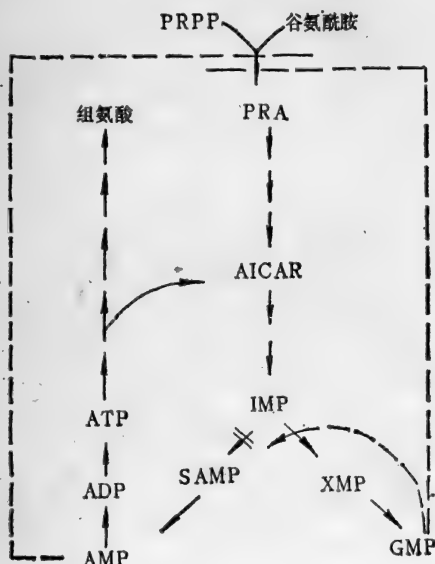


图 12-32 枯草杆菌嘌呤核苷酸合成及反馈控制

3. 赖氨酸发酵

以上两例是通过代谢流的阻塞，消除末端产物的反馈控制达到中间产物积累。另外在分枝合成途径中，由于多个末端产物之一单独存在都不可能对公共合成途径的关键酶实现全部的反馈抑制或阻遏。微生物以各种机制解决代谢调节中局部与整个的关系（见第二节反馈调节线路）这是问题的一方面，另一方面恰好可以利用这种机制选用营养缺陷型菌株用阻塞代谢流的方法，造成一

个或两个末端产物合成的缺陷而使另外的末端产物得到积累。其中最典型的例子是用高丝氨酸营养缺陷型 (Hser^-) 或苏氨酸营养缺陷型 (thr^-) 菌株而达到赖氨酸的积累。这一高度分枝的合成途径在大肠杆菌中, 公共途径第一个酶天冬氨酸激酶是分别受三个末端产物控制的三个同功酶, 这样的调节模式用作发酵生产情况比较复杂。谷氨酸棒杆菌的天冬氨酸激酶是单一酶, 并且受赖氨酸和苏氨酸的协同反馈抑制 (图 12-33)。所以, 选用高丝氨酸营养缺陷型突变菌株在限量补充高丝氨酸的条件下既可全部解除了苏氨酸, 蛋氨酸异亮氨酸及赖氨酸对公共途径的反馈控制作用, 又使天冬氨酸半醛这个中间产物全部转入赖氨酸的合成。所以这样的调节机制是比同功酶线路更有利于赖氨酸的积累。谷氨酸棒杆菌的苏氨酸营养缺陷型同样能很好积累赖氨酸, 但实际上产量要比用 Hser^- 的低得多。

和赖氨酸结构类似的硫赖氨酸 [$\text{S}-(\alpha\text{-氨基乙基})\text{-L-半胱氨酸}$] (AEC) 对细菌表现出微弱的毒性, 在苏氨酸存在时, 其毒性显著加强, 赖氨酸存在时则抑制作用减弱。在苏氨酸存在时, 以谷氨酸产生菌作为亲株选育对硫赖氨酸具有抗性的突变株, 该抗性菌株的天冬氨酸激酶不再受赖氨酸和苏氨酸的协同反馈抑制, 和上述营养缺陷型一样, 可以积累大量赖氨酸。如由黄色短杆菌选育出的两株 AEC^r 菌株 FA-1-36, FA-3-1U 一般条件下产酸为 30 克/升。

二、抗代谢物类似物突变种的筛选与应用

用降低末端产物浓度的方法来促进某中间产物的积累 (如上例 1、2) 或用降低一个或两个末端产物的浓度来达到另一个终产物的积累 (如上例 3)。但是, 在一个单一的代谢途径中, 希望要得到的产物就是终产物本身 (例如精氨酸), 用以上方法就达不到的目的, 也就往往不能选用营养缺陷型方法。

选用抗代谢物类似物变异菌株是应用代谢调节控制理论于育

种及发酵生产的另一个途径。在多数情况下，与营养缺陷型的饰选相配合，是“定向”选育高产菌株的有效方法。一般说来，在分枝合成途径中仅用抗性突变往往难以达到高产，首先必需选取合适的营养缺陷型，同时，又选取具有一定抗性突变的菌株产量将会大幅度地提高。

所谓抗代谢物类似物突变即是对反馈抑制不敏感或对酶的合成的反馈阻遏有抗性，或两者兼而有之。前者一般发生在调节酶的结构基因突变，后者则是由于调节基因突变操纵基因突变所致。可诱导酶体系由于调节基因突变或操纵基因突变，致使在无需诱导物存在酶就能被合成的突变叫做组成性突变 (Constitutive

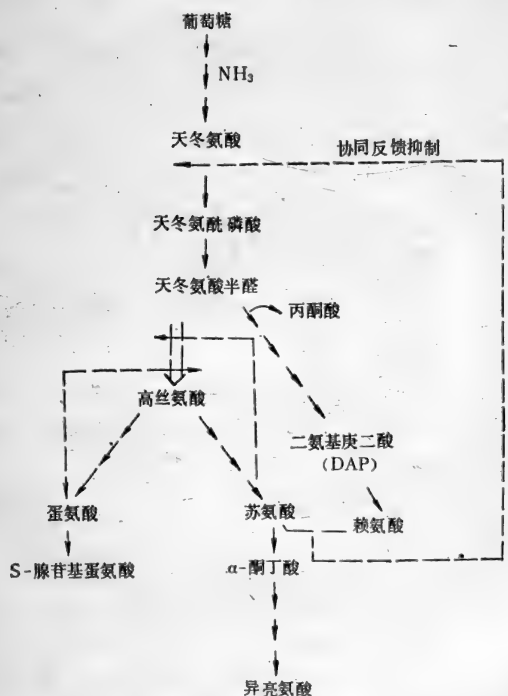


图 12-33 谷氨酸棒杆菌的反馈调节线路，用高丝氨酸缺陷型(Hser⁻)积累赖氨酸

mutation)。

抗性突变的筛选方法最常使用的是梯度平板法。把一定浓度的代谢物类似物加入培养基中制成梯度平板，将大量的经过诱变处理的菌液涂布在梯度平板上，如果抑制剂浓度合适，经过培养就会出现这样的图象：一侧为抑制剂浓度太低，不足以抑制微生物生长的部分；另一侧浓度过高，全部微生物被抑制的部分；中间出现的个别菌落便是抗性突变型菌落。挑选出作进一步的纯化和经济性状的测定。

另外在筛选抗反馈抑制的菌种时往往用营养缺陷型的回复突变的方法，遗传学上把野生型突变成突变型叫做正向突变，而把由突变型突变为野生型称为回复突变。就回复突变的机制来说不尽相同，但在回复突变中原突变基因真正回复原状的并不多，多数是通过突变(在别的位点又发生突变)使变异了的多肽链再次改变为具有部分活性的双重突变型多肽。它们往往具有半野生型表现型或称为渗漏突变型(Leaky mutant)以 X^2 表示。这种突变型在代谢上也起到汇流和消除反馈抑制或阻遏的作用。如高丝氨酸缺陷型生产赖氨酸，这一缺陷型不仅起到汇流的作用，而且也消除了反馈抑制和阻遏。工业生产上如以回复突变的方法选育出高丝氨酸渗漏缺陷型，则生产上可不加高丝氨酸也能得到同样的效果。

渗漏的选育是把大量的营养缺陷型菌株接种在基本培养基上，选取生长特别缓慢而且特别小的菌落，尚可是回复突变的同一型渗漏缺陷型。

1. 精氨酸发酵

由于精氨酸是单一的不分枝合成途径的末端产物(参见图12-31)，由营养缺陷型方法无法积累精氨酸，所以只能借助于精氨酸代谢调节发生了缺陷的菌株，即用抗代谢物类似物的方法，选育抗 L-精氨酸结构类似物的突变菌株抗 D-精氨酸，抗精氨酸氧脞酸盐 Ile^+ 等。日本的中山，好田等以谷氨酸棒杆菌 KY 10150 (Ile^-) 作为出发菌株通过一系列选育得到了比较高产的精氨酸产

生菌,其中遗传特征为(Ile⁺,D-Ser⁻,D-Arg^r,D-Arg^{hx}^r)的突变菌株产精氨酸 19.6 毫克/毫升。最近有报道在一些谷氨酸产生菌株如黄色短杆菌,百合棒杆菌,嗜氨棒杆菌,石蜡节杆菌及酮戊二酸短杆菌经亚硝基胍诱变处理,以 L-精氨酸结构类似物作饰选因子,获得精氨酸的生产菌,最好的结果是黄色短杆菌的鸟嘌呤缺陷型的抗 α -噻唑丙氨酸(2-thiazole alanine 2-TA)的变异株。此变异株在含有 13%葡萄糖的培养基中,可以生产 34.8 毫克/毫升的 L-精氨酸,此外还可副产瓜氨酸。

2. 苏氨酸发酵

用来进行苏氨酸发酵的菌种通常为谷氨酸棒杆菌或黄色短杆菌。在选用 Lys⁻ 和 Met⁻ 的菌株中,由于苏氨酸对高丝氨酸脱氢酶有反馈抑制作用,因此大大降低了苏氨酸的积累。经诱变用 α -氨基-1-羟基戊酸(AHV)——苏氨酸结构类似物饰选得到抗 AHV 突变菌株,结果黄色短杆菌的 Lys⁻, Met⁻ + AHV^r 菌株大大提高了苏氨酸的积累能力。

第五节 细胞通透性的调节作用 及其在发酵工业上的意义

改变细胞膜的通透性以利于代谢产物在细胞外(培养基中)的积累有很重要的作用。我们知道,多数发酵产物是在微生物细胞内合成的,要经过细胞膜的通透性障壁才能排到培养基中。如果细胞膜的通透性很差,发酵产物出不来,在细胞内积累,无论是从反馈调节机制或是反应的质量作用定律来说都将影响它的进一步合成,无法提高产量。代谢产物如谷氨酸等如果在细胞内积累,还会进一步转化成其他产物,取得细胞内各种代谢物质的平衡。由此看来,细胞膜对代谢产物的通透性在发酵工业上是一个十分重要的问题,其效果是显著的、多方面的。

细胞的内环境与细胞的周围环境都是水溶性的,很难设想没

有细胞内外物理界面和渗透性障壁的情况下会表现细胞的组织和结构。这细胞内外环境的渗透性障壁即为细胞质膜，简称质膜或细胞膜。对于真核细胞(如高等动物)除细胞质膜外，还有各种包围各种细胞器的膜，如线粒体膜，内质网膜，溶酶体膜和核膜等，称为细胞内膜，各种细胞器的特征功能，严格地取决于这些膜所具有的特殊结构与功能。现代生物学的研究表明，生物膜体系是一切真核细胞的基本结构之一，而细胞质膜则是原核细胞(如细菌)的生命活动中心，其中许多功能在真核细胞中是由各种细胞内膜实行的。而对原核生物来说，此功能则在细胞质膜上进行。因此，可以说细胞的膜系统是与生命的本质相关的重要结构。

细胞质膜既是细胞与外界环境相隔离的界面，又是细胞同外界环境进行物质交换和信息交流的接触面。越来越多的事实证明，质膜绝不仅仅起到限定空间区域的作用，而且直接或简接地参与为维持生命所必需的重要代谢活动及其调节。

从本世纪三十年代起，就对细胞膜的结构不断提出各种假说、模型。目前最为广大科学工作者所赞同的，认为与当前所获得的实验结果一致的是所谓“脂质、球状蛋白质流动镶嵌模型”(图 12-34)。这学说认为细胞膜的结构是：在液态的脂质双层中镶嵌着可以移动的球状蛋白质。可是膜所以不溶于水，主要是它含有较多的脂质。因此膜显然是水溶性物质，如金属离子、糖、氨基酸等通透的一个“屏障”。细胞中脂质的最常见成分是脂肪酸，即链长达 16~20 双数碳原子的直链烃衍生物。各生物细胞中脂肪酸以酯的状态存在，形成酯的醇有三大类：① 甘油，酯化生成甘油三酯，即中性脂肪；② 磷酸甘油，酯化生成磷脂；③ 胆固醇酯化生成胆固醇酯。这三类酯有不同的不能相互取代的功能。脂质在很多组织及细胞中是选择性地集中在膜的部分。不同来源的膜的构象大致相同，可是它们的化学组成及复杂性却各不相同，很多细菌的膜只有一、二种脂质，而神经细胞和叶绿体都

各有 20 种或更多种类型的脂质。

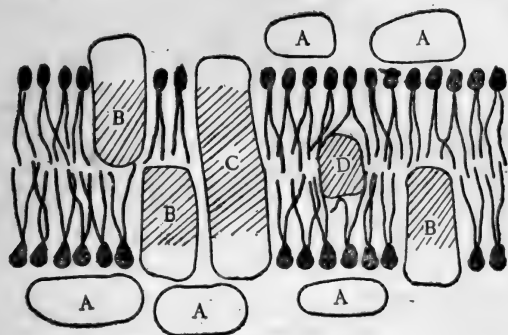


图 12-34 脂质、球状蛋白流动镶嵌模型

A—表面蛋白，以静电引力和离子键连接，易洗脱 B—蛋白疏水端与膜脂质端结合，亲水端外露 C—蛋白横跨整个膜双层，中间为疏水区 D—完全在疏水环境中，只能用有机溶剂溶出；斜线表示蛋白疏水部位

磷脂是细胞膜的普通成分，磷脂分子同时表现具有既能溶解于有机介质，又能在某种程度上溶解于水。它可以形成具有高度向性的微束结构。磷脂怎样影响细胞膜的稳定性，怎样决定通透性即怎样控制小分子透过膜障，都是很不清楚的问题。很可能这些分子的运转的特异性存在于膜脂蛋白的蛋白部分，但是磷脂通过对蛋白质空间结构的特定作用也可影响运转的选择性。

目前关于影响膜的流动性即膜的总的通透效果方面研究较多的是关于磷脂组成中脂肪酸的链长和饱和程度(图 12-35)。脂肪的性质和粘稠度(无论是液态的还是固态的)取决于链长(碳原子数)和不饱和程度(双键数)。主要由饱和脂肪酸构成的猪油和主要由不饱和脂肪酸构成的橄榄油可列为脂肪酸结构影响甘油三酯的物理性能的极端例子。双键的引入脂肪酸链所造成的主要影响是使熔点下降。硬脂酸在室温是固体，而油酸则为液体。变更脂肪酸的不饱和程度可认为是生物体用以调整细胞脂质的物理状态，

以使某些细胞组分得以维持恰当的物理性能，以适应环境温度的变化。很早就知道，生长在较冷的地带的植物种子，含油的不饱和度较高，这显然对于植物的生存有利。天然脂肪所含脂肪酸因来源不同而异，无论就链长或双键数来衡量，都是种类极为繁多的。例如仅就一种生物眼虫 (*euglena gracilis*) 来说就有 53 种不同脂肪酸，而这些脂肪酸的比例紧密地随着环境起变化。看来细胞在经受环境不断改变时往往采取变更脂肪酸模式的方法以谋求适应。

细胞质膜的重要功能之一是选择性的通透性。通过选择性的通透性，细胞能接受或拒绝，保留或排出某种物质。物质通过细胞膜的传送有三种方式：

(1) 被动传送又称简单扩散，溶质分子通过细胞膜并不与膜上分子发生反应，扩散速度决定于膜两边溶质的浓度梯度及溶质分子大小、电荷等性质，它不需要能量。

(2) 帮助扩散，又译作易化扩散。在这种扩散方式中，被传送的物质(也称底物)与膜中的载体蛋白(在膜中起传送剂功能的蛋白质)发生可逆的结合。载体蛋白(或与它底物的络合物在膜内外两面摆动。它在任何一面都可以结合或释放底物，因此传送的方向同样决定于浓度梯度。载体蛋白(或其与底物的络合物)摆动所需要的能量来自热能，或由于结合或释放底物时蛋白质分子的微小变形，并不与能量代谢偶联。

(3) 主动传送是一种溶质分子的逆浓度梯度的传送方式，在热力学上这是一种耗能的过程，一般认为它需要一个传送蛋白起主动传送作用。

以上是关于细胞膜的组成，膜的结构以及膜在物质传送过程中的方式。生物膜结构的复杂性，功能的多样性已吸引了许多生物学家、生物化学家、生物物理学家的注意。尽管六十年代以来已运用新技术和新方法，对膜的结构与功能进行了研究，并积累了大量数据，建立了许多模型，但生物膜的秘密并没有轻易地被

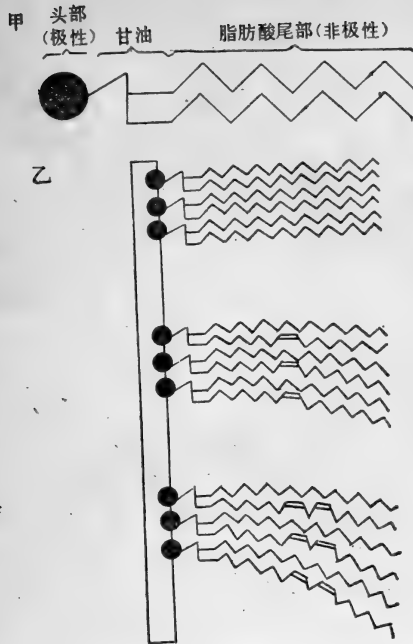


图 12-35 典型的膜类脂质结构

甲—示含磷酸盐、碱基等的亲水极性部分及脂肪酸尾部的疏水非极性部分
乙—脂肪酸成分的变化可以破坏生物膜有序堆放。示双键的引入使膜的流动性增加

揭露，它是当前生物科学的重大课题之一。今天对生物膜的认识与五十年代对“分子遗传学”的认识相仿，正处在重大突破的前夕。

细胞膜的作用在发酵工业上的重要意义是无庸置疑的，无论是原料的输入或代谢产物的排出，都将大大促进整个发酵过程和产物的体外积累，在发酵工业上对细胞膜的通透性问题引起注意并几乎成为焦点的是谷氨酸发酵，其后注意到产氨短杆菌的IMP发酵也有同样的问题。

关于谷氨酸发酵菌的细胞膜对谷氨酸的通透性、对谷氨酸发

醇产量的影响，主要是日本人做了大量工作。生物素添加量是谷氨酸发酵成功的关键很早就被认识。最初认为细胞内生物素的量控制着谷氨酸生物合成的途径。生物素丰富主要走 EMP 途径，只有在生物素亚适量的情形时，HDP 途径才能加强，而由于 HDP 途径能提供更多还原型辅酶 II (NADP-2H)，有利于 α -酮戊二酸还原氨基化。这种看法可能更多的是出于推测而缺少理论上和实验的依据。自从确定了由于生物素的添加量影响着细胞内外谷氨酸积累量的关系(见表 12-5)，以及油酸缺陷型的发现之后，这种观点才告放弃。油酸缺陷型的谷氨酸发酵菌株在限量添加油酸条件下，同样能使谷氨酸体外积累，并且提出了一系列细胞膜中饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸比例的分析资料，指出饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸比例大于 1 者，有利于谷氨酸的通透性，这时转而认为生物素有控制不饱和脂肪酸合成的作用。甚至认为添加含有高级饱和脂肪酸的表面活性剂的作用亦在于饱和脂肪酸对不饱和脂肪酸合成的生物素拮抗作用。

表 12-5 在不同水平生物素内生长的谷氨酸棒杆菌 № 541 的氨基酸组成*

	富含生物素的细胞 25 $\mu\text{g/l}$			生物素缺乏的细胞 25 $\mu\text{g/l}$		
	分泌于培养基的	细胞内游离的	组成于蛋白质的	分泌于培养基的	细胞内游离的	组成于蛋白质的
天冬氨酸	21	0	432	73	0	425
谷氨酸	85	49	569	115450	3	586
丙氨酸	254	32	802	1019	2	809
脯氨酸	28	0	161	73	0	130
亮氨酸	7	2	345	0	1	358

* 列举 5 种氨基酸，指在 24 小时培养时，1 克干细胞中氨基酸量及所分泌的量。

一九七〇年日本人将溶烷棒杆菌 № 314 经亚硝基胍处理获得甘油缺陷型 GL-21，由于 α -磷酸甘油脱氢酶的遗传缺陷致使

甘油不能合成。以正构石蜡为碳源时，限量添加甘油，细胞磷脂含量可降为亲株的 50% 以下，谷氨酸产量可达 72 毫克/毫升。甘油缺陷型菌株控制甘油亚适量，不论有否过量生物素、油酸、硫胺素，也不论是用醋酸，正构石蜡或糖质原料都能分泌大量谷氨酸。认为甘油缺陷型菌株在甘油限量条件下，不是由于谷氨酸生物合成系统的加强，也不是其他氨基酸生物合成系统受到抑制，而是由于细胞膜中与通透性直接有关的磷脂含量下降所引起的。由此可见，细胞内磷脂含量可以由添加甘油的量来调节，从而调节细胞膜的通透性。

谷氨酸发酵细胞膜通透性的控制因子大致可以分为两种类型：一是生物素、表面活性剂、高级饱和脂肪酸、油酸、甘油及其衍生物。这一类的作用最后都归结为控制（或从脂肪酸的角度，或从甘油的角度）磷脂的合成，细胞膜磷脂含量降低，利于细胞膜的通透性，细胞膜磷脂含量高，不利于通透性。另一类是青霉素的作用。青霉素的作用在于抑制细胞壁生物合成作用中的转肽作用，从而使细胞壁糖肽桥式联接的形成受到阻碍，使细胞壁完整合成受损，没有完整细胞壁保护的膜容易造成机械的损伤和经不起内部渗透压的压力，将造成膜的破坏，使氨基酸泄出细胞。

以上是关于谷氨酸发酵细胞膜通透性问题资料的概要总结。

从以上的讨论可以看出，尽管目前关于生物膜的研究还未取得根本的突破，但是已经积累了很多资料，建立了一些模型。但是就发酵工业细胞膜通透性问题研究最多的谷氨酸发酵来看，其工作未能与整个生物膜的研究联系起来。其工作也不能用当前有关生物膜研究的一些结论来作解释。可以提出的问题有：首先，目前建立起的生物膜的动态模式认为，影响膜的通透性的重要因素在于膜的流动性，而起决定作用的是磷脂结构中脂肪酸链的不饱和程度，磷脂脂肪酸不饱和程度高，膜的流动性好，通透输送能力强，因而物质交换迅速，代谢活跃。这是从脂肪酸的基本物理化学性质可以解释的，并为一些实际的材料所支持。这一点，与

谷氨酸通透性的早期研究特别强调膜内饱和脂肪酸比例高有利谷氨酸的通透是直接相矛盾的。第二，目前认为磷脂含量决定了细胞膜的谷氨酸的通透性，似乎与生物膜的动态模式相吻合，但是这种对膜流动性的磷脂含量决定作用的事实还未有其他生物材料的支持，也未见甘油起着膜组成的控制作用的其他报道。第三，目前一般认为生物体脂类的组成有种族的差别，有的简单，有的复杂，但就脂肪酸组成的比例来说，紧密地随着环境的改变而起变化，即细胞往往采取变更脂肪酸的模式的方法，以经受环境的不断变更。所以由油酸的控制从而控制磷脂的量是站不住脚的。第四，可以认为，谷氨酸的排出至少是一种易化扩散。而谷氨酸发酵中关于通透性问题的考虑似乎被看成一种简单扩散过程，特别是也看成象青霉素的作用那样，看作是一种简单的漏出过程。

锰离子(Mn^{++})在核苷酸细胞外积累中，对通透性的控制作用是膜的通透性问题在发酵上显示特出作用的另一个例子。但对其通透性机制的了解则与在谷氨酸发酵中的情形相似。在微生物中核苷酸无论在细胞外或细胞内，分段合成(salvage synthesis, 补救合成)方式是很普通的，对发酵也有实际意义。例如腺嘌呤缺陷型(ade^{-})或腺嘌呤渗漏型($adeI$)的菌株能过量合成IMP，但事实上在一般情形下，培养液中并不积累IMP而是次黄嘌呤(枯草杆菌则积累肌苷)。只有在 Mn^{++} 浓度限量的条件下，才在培养基液中获得IMP。经研究表明，这IMP是由细胞外分段合成方式形成的。所以可以看出，碱基及核苷在一般情形下，都是具有较好通透性的物质，而经磷酸化后，则易留在细胞内。 Mn^{++} 对产氨短杆菌的作用表现在(1) Mn^{++} 过量时细菌生长良好，呈正常小球菌形态， Mn^{++} 限量时，生长受到抑制，菌体呈不规则，伸展膨润状态。(2) Mn^{++} 过量时，R-5-P和PRPP以及PRPP激酶和核苷酸焦磷酸化酶留在菌体内，培养液中积累次黄嘌呤而不积累IMP， Mn^{++} 限量时，该分段合成酶及底物泄出细胞外，并在培养基中重新合成IMP。(3) Mn^{++} 限量时，菌体内脂肪

酸(如软脂酸及油酸)显著减少,这一点与生物素作用相似,主要影响细胞膜的合成,从而使结构改变,引起细胞膜通透性的改变,影响IMP及其他核苷酸的合成。

目前发酵工业上用的原料及工业用水都会有较多的 Mn^{++} ,因此如何消除 Mn^{++} 过量的影响是个大问题。据报道,发酵期间添加链霉素,丝裂霉素等抗菌素或阳离子表面活性剂如聚氧乙烯硬脂酰胺可解除 Mn^{++} 过量的影响,使R-5-P及分段合成有关酶渗出体外进行核苷酸的合成。

在弄清楚代谢途径的基础上,改变其他环境因素(如其他辅助因素,pH,通风溶氧量等等),以控制合成路线使之积累某些人们需要的产物,如甘油发酵,柠檬酸发酵等就是通过改变正常途径或改变酶活性而达到积累的例子。这在有关代谢各章都有提及,本章在于讨论典型的调节控制有关问题及机制,因之不再重复。

关于代谢调节控制问题,在理论上、实践上都已取得了重大成果,但在这一领域里显然还有待人们去进一步探索。毛主席教导我们:“人类总得不断总结经验,有所发现,有所发明,有所创造,有所前进”。我们不能等待自然界的恩赐,我们只能向自然界索取,同样我们要向微生物索取!科学的春天来到了,在工业发酵这一技术科学领域里,生物化学将更有所作为,发挥更大的作用。

专门名词简写代号

西文代号	西 文 名	中 文 名	汉字代号
A	Angstrom	埃 (波长单位)	
...
AA	Amino acid	氨基酸	
Ala	Alanine	丙氨酸	丙
Arg	Arginine	精氨酸	精
Asp	Aspartic acid	天冬氨酸	天
Asn	Asparagine	天冬酰胺	天-NH ₂
Cys	Cysteine	半胱氨酸	半胱
Glu	Glutamic acid	谷氨酸	谷
Gln	Glutamine	谷氨酰胺	谷-NH ₂
Gly	Glycine	甘氨酸	甘
His	Histidine	组氨酸	组
Hyp	Hydroxyproline	羟脯氨酸	羟
Ile	Isoleucine	异亮氨酸	异亮
Leu	Leucine	亮氨酸, 白氨酸	亮
Lys	Lysine	赖氨酸	赖
Met	Methionine	蛋氨酸, 甲硫氨酸	蛋
Orn	Ornithine	鸟氨酸	鸟
Phe	Phenylalanine	苯丙氨酸	苯
Pro	Proline	脯氨酸	脯
Ser	Serine	丝氨酸	丝
Thr	Threonine	苏氨酸	苏
Tryp	Tryptophane	色氨酸	色
Tyr	Tyrosine	酪氨酸	酪
Val	Valine	缬氨酸	缬
...			...

代 号	西 文 名	中 文 名
Co	Co-enzyme	辅酶
CoA, CoA-SH	Co-enzyme A	辅酶 A
Co I	Co-enzyme I (DPN, NAD)	辅酶 I (即 DPN, NAD)
Co II	Co-enzyme II (TPN, NADP)	辅酶 II (即 TPN, NADP)
FAD	Flavin adenine dinucleotide	黄素腺嘌呤二核苷酸
FADH ₂	Flavin adenine dinucleotide (reduced)	黄素腺嘌呤二核苷酸 (还原型)
FMN	Flavinmononucleotide	黄素单核苷酸
FH ₄ , THFA	Tetrahydrogen folic acid	四氢叶酸
L, L $\begin{matrix} \diagup S \\ \\ \diagdown S \end{matrix}$	Lipoic acid	6,8-二硫辛酸
LTPP	Lipothiamide pyrophosphate	硫辛酰焦磷酸硫胺素
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide (DPN, Co I)	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (即辅酶 I 或 DPN)
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide (TPN Co II)	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (即辅酶 II 或 TPN)
UDPG	uridine diphosphate glucose	尿苷二磷酸葡萄糖
TPP	thiamine pyrophosphate	辅羧酶 (或焦磷酸硫胺素)
...
DAHP	3-deoxy-D-arabo-heptonic acid-7-phosphate synthetase	3-脱氧 D-核糖庚糖-7-磷酸合成酶
DEAE	diethyl-amino-ethyl cellulose	二乙氨基纤维素
DNFB, FDNB	2,4-dinitrofluorobenzene	2,4-二硝基氟苯
DNP	dinitrophenyl	二硝基苯酚
DOPA	3,4-dihydroxy-phenyl alanine	3,4-二羟苯丙氨酸, 多巴

代 号	西 文 名	中 文 名
DON	6-diazo-5-oxo-norleucine	6-重氮-5-氧-正亮氨酸
E (酶学上用)	enzyme	酶
E ₀	normal oxidation-reduction electro-potential	当量氧化还原电位
ES	enzyme-substrate complex	中间产物 (指酶作用的)
EMP	Embden-Meyerhof-Par-nas pathway	E-M-P 三氏代谢途径
FP	flavin protein	黄素蛋白
FPP	farnesyl pyrophosphate	焦磷酸四甲基十一 (三) 烯酯
GSH	reduced glutathione	还原型谷胱甘肽
G-S-S-G	oxidized glutathione	氧化型谷胱甘肽
HG	hemoglobin	血红蛋白
HMG	β -Hydroxy- β -methyl-glutamic acid	β -羟- β -甲基谷氨酸
HMP	hexose monophosphate pathway	磷酸己糖途径
HMS	hexose-mono-phosphate shunt	磷酸己糖支路
I (酶学用)	inhibitor	抑制剂
I UPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	国际纯粹化学和应用化学协会
Km	Michaelis constant	米氏常数
LDH	Lactic dehydrogenase	乳酸脱氢酶
M (代谢上用)	metabolite	代谢物 (有底物的意义)
MA	cation exchange resin	阳离子交换树脂
MC	carboxymethyl	羧氧甲基
MVA	Mevalonic acid	3,5-二羟-3-甲基戊酸
NB	anion exchange resin	阴离子交换树脂
Nucleoside		核苷
A, Ado	adenosine	腺苷 (腺嘌呤核苷)
C, Cyd	cytidine	胞苷

代 号	西 文 名	中 文 名
G, Guo	guanosine	鸟苷
I, Ino	Inosine	次黄苷、肌苷
U, Urid	Uridine	尿苷
X, Xao	Xanthosine	黄苷
dA	2'-deoxyribosyl-adenosine	2'-脱氧腺苷 (d 表示脱)
dG	2'-deoxyribosyl guanosine	2'-脱氧鸟苷
dT	thymidine	胸苷
<u>Nucleotide</u>		<u>核苷酸</u>
AMP	adenosine-5'-monophosphate	*腺苷一磷酸、腺一磷
ADP	adenosine-5'-diphosphate	二磷酸腺苷、腺二磷
ATP	adenosine-5'-triphosphate	三磷酸腺苷、腺三磷
CMP	cytidine-5'-monophosphate	一磷酸胞苷、胞一磷
CDP	cytidine-5'-diphosphate	二磷酸胞苷、胞二磷
TMP	deoxythymidylic acid	脱氧胸苷酸

* 其他核苷酸同样可有多种名称，可以类推。

代 号	西 文 名	中 文 名
CTP	Cytidine-5'-triphosphate	胞苷三磷酸，胞三磷
GMP	Guanosine-5'-monophosphate	鸟苷一磷酸，鸟一磷
GDP	Guanosine-5'-diphosphate	鸟苷二磷酸，鸟二磷
GTP	Guanosine-5'-triphosphate	鸟苷三磷酸，鸟三磷
IMP	Inosine-5'-monophosphate	次黄苷酸
IDP	Inosine-5'-diphosphate	次黄苷二磷酸
ITP	Inosine-5'-triphosphate	次黄苷三磷酸

代 号	西 文 名	中 文 名
TMP	Thymidine-5'-monophosphate	胸苷一磷酸, 胸一磷
TDP	Thymidine-5'-diphosphate	胸苷二磷酸, 胸二磷
TTP	Thymidine-5'-triphosphate	胸苷三磷酸, 胸三磷
UMP	Uridine-5'-monophosphate	尿苷酸, 尿一磷
UDP	Uridine-5'-diphosphate	尿苷二磷酸, 尿二磷
UTP	Uridine-5'-triphosphate	尿苷三磷酸, 尿三磷
XMP	Xanthosine-5'-monophosphate	黄苷酸, 黄一磷
XDP	Xanthosine-5'-diphosphate	黄苷二磷酸, 黄二磷
XTP	Xanthosine-5'-triphosphate	黄苷三磷酸, 黄三磷
cAMP	cyclic AMP	3'5'环腺苷酸
dAMP	Desoxy AMP etc	脱氧一磷酸腺苷 (余类推)
...
Nucleic acid		核酸
DNA	Desoxyribo-nucleic acid	脱氧核糖核酸
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
mRNA	Messenger RNA	信息核糖核酸, 信息 RNA
tRNA	Transfer RNA	转移核糖核酸, 转移 RNA
r RNA	Ribosome-RNA	核蛋白体 RNA
...
P, Pi	Inorganic phosphate	无机磷酸或磷酸根
PP, PPi	Pyrophosphate	焦磷酸或焦磷酸根
PPP	Triphosphate	三磷酸
PC	Phosphocreatine	磷酸肌酸
PABA	Para-amino-benzoic acid	对氨基苯甲酸
pH	The negative log of hydrogen ion concentration	氢离子浓度指数

代 号	西 文 名	中 文 名
PRPP Or R5P-PP	5'-phospho-ribosyl-1,5-pyrophosphate	磷酸核糖焦磷酸
Rf	Rate of fractionation	层析率
S (蛋白质分离用)	Sedimentation constant unit	沉降系数, 漂浮单位
S (酶学上)	Substrate	底、物
SH-	Sulfhydryl-	巯基或硫氢基

主要参考材料

- 生物化学 (讲义) 北京大学编 (1975)
 生物化学 (讲义) 中山大学编 (1974)
 生物化学 (讲义) 复旦大学编 (1976)
 生物化学 (讲义) 四川大学编 (1975)
 生物化学 (讲义) 厦门大学编 (1975)
 生物化学 (讲义) 无锡轻工业学院 (1962)
 生物化学 (讲义) 武汉大学编 (1976)
 普通生物化学简明教程 南京大学郑集编
 微生物生理生化 (讲义) 厦门大学编
 微生物生理生化 (讲义) 辽宁大学编
 有机、生物化学 (讲义) 无锡轻工业学院编 (1975)
 有机、生物化学 (讲义) 广东化工学院编 (1974)
 高级生化 (讲义) 中国科学院生物化学研究所编 (1962)
 味精工艺学 (讲义) 天津轻工业学院编 (1977)
 细菌生理学 张宽厚主编 (1964)
 微生物学 俞大绂等编 (1965)
 酶学概论 鲁宝重编 (1964)
 生物化学导论 K·哈里森著, 严自正等译 (1975)
 细胞生理学与生物化学 麦克尔罗伊著 (杨松榆译)
 细胞生物学 安布罗斯, 上海实验生物所译



S0017364

- 核酸化学 D.O. 佐登著, 施嘉钟等译 (1965)
- 抗菌素的作用机制 田中信男 (抗菌素作用机制) (1977)
- 生活物质中的能量转变 H.A. 克莱勃斯等著, 殷蔚夷译 (1975)
- 生物化学动态 赵升浩等译 (1969)
- 生物学与人类的未来 亨德莱主编 上海生化所译
- 澱粉科学ハンドブック 二口二郎著 (1977)
- 现代の生化学 角户正夫等著 (1964)
- 现代の酵素化学 本郷和夫等编 (1975)
- 发酵と微生物 植村定治郎、相田浩编 (1971)
- Concepts of Molecular Genetics Dow O Woodward (1977)
- The Microbial World Roger V. Stanier (1976)
- The Enzyme Vol. I Paul D. Boyer (1970)
- Fermentation Advances D. Perlman (1969)
- Biochemistry Lehninger (1977)

收到日期 81年8月20日

58'173
111

011599

88.57 (60本)

2.15

58'173
111

011599

0409765

生物化学

81.8.20

借者单位

借者姓名

借出日期

还书日期

111
#

82.2.17

011599

· 已出版的教材 ·

微生物学	无锡轻工业学院等合编	2.20 元
陶瓷工艺学	西北轻工业学院等编	1.85 元
制浆造纸工艺学 (上册)	天津轻工业学院等合编	3.40 元
制浆造纸工艺学 (下册)	天津轻工业学院等合编	2.30 元

统一书号：15042·1557

定 价： 2.15 元