 DOI: https://doi.org/10.12349/tie.v3i8.11548

Structural Characteristics and Catalytic Mechanism of Enzyme Active Sites

Haidong Yu

Huangshan University, Huangshan, Anhui, 245041, China

Abstract

enzymes have catalytic properties far beyond ordinary chemical reactions, and their core is based on the unique spatial structure of active centers and multiple catalytic mechanisms. In this paper, the four structural characteristics of active center topology, functional groups, hydrophobic low dielectric microenvironment and dynamic conformation are systematically reviewed, and four basic catalytic pathways, namely proximity orientation, acid-base, covalent and metal ions, are explained; The new catalytic theories, such as pre organization effect and quantum tunneling, are reviewed. The freeze-thaw electron microscopy, scanning electron microscopy, scanning electron microscopy and scanning electron microscopy are introduced XFEL、 The research and development progress and existing bottlenecks of artificial metalloenzyme and deep learning de novo enzyme were summarized. Relevant research can not only reveal the underlying laws of life molecules, but also provide theoretical support for enzyme engineering transformation and the development of new biocatalysts. Although interdisciplinary research and development promote the development of artificial enzymes, the problem of dynamic regulation and reproduction of active centers remains to be solved. Subsequent fine-scale analysis and theoretical model optimization will help the development of green synthesis, biomedicine and other fields.

Keywords

enzyme active center; catalytic mechanism; induced fit; covalent catalysis

酶活性中心的结构特征及其催化机制研究

于海东

黄山学院，中国 · 安徽 黄山 245041

摘　要

酶具备远超普通化学反应的催化性能，核心依托活性中心独特空间结构与多元催化机制。本文系统梳理活性中心拓扑构型、功能基团、疏水低介电微环境及动态构象四大结构特征，阐释邻近定向、酸碱、共价、金属离子四类基础催化路径；综述预组织效应、量子隧穿等新型催化理论，介绍冷冻电镜、XFEL、多尺度模拟等前沿表征技术，总结人工金属酶、深度学习从头设计酶的研发进展与现存瓶颈。相关研究既能揭示生命分子运行底层规律，也为酶工程改造、新型生物催化剂开发提供理论支撑，多学科交叉虽推动人工酶研发，但活性中心动态调控复刻难题仍待突破，后续精细尺度解析与理论模型优化将助力绿色合成、生物医药等领域发展。

关键词

酶活性中心；催化机制；诱导契合；共价催化

1 引言

酶是生物体内最高效的分子催化剂，酶的催化效率一般比相应的非酶促反应高出几个数量级，酶的这种高效性来自于酶的活性中心精密的结构设计以及独特的催化机制。酶活性中心是指酶分子中能够与底物直接结合并催化底物发生化学反应的区域，一般由几个在空间结构上相互靠近的氨基酸残基组成，这些残基在一级结构上相距很远，甚至在不同的肽链上，通过肽链的盘绕折叠而在三维空间中形成功能性结构域[1]。近些年来，由于结构生物学技术的突破性发展，特别是冷冻电镜技术的成熟应用以及 X 射线自由电子激光技术的不断发展，使得研究人员可以对酶活性中心的动态结构变化进行原子分辨率的解析，从而揭示出许多传统静态结构所不能观测到的催化细节。深入认识酶活性中心的结构特点及其催化作用，既对认识生命活动的分子本质有重大意义，又给人工酶的设计、酶工程的改良以及新型生物催化剂的研制给予理论引领。

【作者简介】于海东（1979–），男，硕士，讲师，从事生物技术专业，细胞生物学，生物化学研究。

2 酶活性中心的结构特征

2.1 活性中心的空间构型与拓扑特征

酶发挥催化作用的关键部位为活性中心，活性中心由

少量氨基酸残基组成，在整个蛋白中所占比例很小，但是却起着底物识别和化学反应加速的作用。从空间拓扑上看，活性中心大多凹陷在蛋白表面，形成裂缝或者口袋结构，密闭空间可以隔绝游离水分子，口袋轮廓也为底物特异性识别提供结构基础。胰凝乳蛋白酶的催化三联体就是典型，相关氨基酸在线性肽链上位置分散，依靠多肽折叠在空间聚拢形成功能单元。与此同时，2025 年中子晶体学相关研究也补充了 β - 葡萄糖苷酶催化中心不是静态的，催化和调控残基侧链会发生位移、水分子同步重排，充分证明活性中心在催化过程中不断发生结构重塑。

2.2 活性中心的必需基团及其功能分工

依靠独特的空间骨架，活性中心依靠两种必需基团配合完成催化全过程，分别为结合基团和催化基团。结合基团通过氢键、疏水作用等非共价作用力固定底物，决定酶的识别专一性；催化基团直接参与化学键的断裂和生成，降低反应活化能 [2]。丝氨酸、组氨酸等七种氨基酸是构成功能位点的主流残基，侧链可以承担亲核进攻、质子传递等多重作用，许多残基还具有结合、催化双重功能，组氨酸咪唑基就是代表。除氨基酸残基外，辅酶也是活性中心的重要组分，NAD^+、磷酸吡哆醛分别参与氧化还原、转氨反应的电子和共价中间体的形成。

2.3 活性中心的疏水微环境与低介电效应

除了功能基团排布之外，活性中心独有的疏水低介电微环境也是提高催化效率的重要因素，该区域的介电常数只有 2-4，远低于水环境。低介电性质可以从三个方面来改善反应条件，增强基团间的静电作用力、消除水分子对电荷的屏蔽作用、调节氨基酸的解离常数以适应中性反应，乙酰乙酸脱羧酶赖氨酸 pK_a 偏移直观地体现了这种作用。在此基础上，2025 年胸腺嘧啶 DNA 糖基化酶研究完善了微环境理论，酶内部 DNA 扭曲骨架形成定向内电场，活化水分子完成糖苷键裂解，说明蛋白内源电场也是微环境调控催化的重要组成部分。

2.4 活性中心的动态构象与构象选择

基于微环境、基团、空间构型的静态认知，学界逐渐更新了活性中心构象相关理论，推翻了传统的刚性“锁钥学说”。诱导契合理论最早提出底物结合会带动酶结构形变匹配底物，构象选择假说进一步完善了这个逻辑，酶本身就存在多种构象，底物会促使平衡向适配构型偏移。2025 年分子动力学模拟对比发现，专一酶只有最优催化构象，广谱酶有多个适配构象；脯氨酸利用酶 A 的离子对门动态开合也证明了活性中心远程构象的波动会直接调控底物释放，动态结构贯穿整个催化循环。

3 酶催化反应的基本机制

3.1 邻近定向效应与底物形变

邻近定向效应属于酶催化效率提高的基础机制之一。溶液中双分子反应，反应物分子要经过随机碰撞才能相遇，每次碰撞都有正确的反应取向的概率很小。酶活性中心通过结合基团把底物分子固定在催化基团附近，使有效底物浓度大大增加，同时保证反应基团有正确的空间取向，把分子间反应转化为分子内反应的过程。理论估算表明，邻近定向效应可以使反应速率提高 100 倍到 10^{11} 倍。与邻近效应相伴的是底物形变效应，即酶与底物结合时，酶分子发生构象调整，底物分子也发生扭曲变形，使其更接近过渡态结构 [3]。溶菌酶催化细菌细胞壁多糖水解时，底物中的 N- 乙酰胞壁酸糖环从稳定的椅式构象被诱导成能量较高的半椅式构象，使糖苷键稳定性降低，键能减弱，从而降低了反应活化能。底物形变同酶活性中心的空间约束存在联系，活性中心结构对反应路径的精确控制也由此体现出来。

3.2 酸碱催化机制

酸碱催化是酶催化反应中最普遍的机制类型，几乎所有的酶促反应都包含质子转移的过程。酶活性中心可以提供广义酸（质子供体）和广义碱（质子受体）功能基团，这些基团主要来自于天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、半胱氨酸、酪氨酸和赖氨酸等残基的侧链。组氨酸的咪唑基 pK_a 值接近生理 pH（约 6.0-7.0），在质子化和去质子化之间有良好的平衡，质子转移速率非常快，是最有效的生物催化酸碱基团。酸碱催化分为一般酸碱催化和特殊酸碱催化两种，一般酸碱催化是质子供体或质子受体与底物直接质子转移，特殊酸碱催化是 H^+ 或者 OH^- 对反应的催化作用。酶活性中心中多个酸碱基团会协同工作，形成电荷中继网络，胰凝乳蛋白酶的催化三联体中，Asp102 通过氢键稳定 His57 的咪唑基，使其成为更强的广义碱，从而从 Ser195 的羟基上抽走质子，生成高反应活性的醇盐离子。多元酸碱协同机制大大提高了催化效率，研究表明将酸和碱催化基团集中到同一个分子上（α - 羟基吡啶），催化速度比单独使用酸或碱提高约 7000 倍。

3.3 共价催化机制

共价催化是指酶活性中心的亲核基团或者亲电基团与底物形成瞬态共价中间体，从而改变反应路径、降低活化能的催化机制。与共价催化相对的是非共价催化，非共价催化只用非共价相互作用稳定过渡态。共价催化的核心优势就是形成共价中间体，把一步高能垒反应分解成多步低能垒反应，绕过直接反应路径上的高能量过渡态。酶活性中心常见的亲核基团有丝氨酸的羟基、半胱氨酸的巯基、组氨酸的咪唑基、赖氨酸的氨基、天冬氨酸 / 谷氨酸的羧基等。这些基团攻击底物的亲电中心，形成酰基 - 酶、磷酸 - 酶或者糖基 - 酶等共价中间体。2024 年对 GH3 家族 β - 葡萄糖苷酶 Bgl3B 的研究通过 X 射线晶体学直接观察到了共价中间体，底物葡萄糖的 C1 原子与保守催化亲核残基 Asp264 的 O δ 1 基团共价结合，质谱分析也证实了糖基化 Asp264 中间体的存在，Glu525 被证实为反应的广义酸碱催化剂。该研究给共价催化机制赋予了直接的结构证据。共价催化的另一个重

要实例就是丝氨酸蛋白酶家族，其催化循环中形成酰基 - 丝氨酸中间体，该中间体的水解是反应的限速步骤，通过快速淬灭实验可以观察到典型的 " 爆发 " 动力学特征。

3.4 金属离子催化机制

约三分之一的已知酶需要金属离子参与才能表现出催化活性。金属离子在活性中心中起着多种作用，它既可以作为路易斯酸来稳定负电荷或者极化底物键，也可以通过氧化还原反应传递电子，还可以通过配位作用定向固定底物分子，还可以作为桥联离子连接酶和底物。根据金属离子与蛋白质结合的紧密程度，可以将金属酶分为金属酶（金属离子与酶紧密结合）和金属激活酶（金属离子与酶松散结合）两大类。活性中心中金属离子一般和氨基酸残基（组氨酸咪唑基、天冬氨酸 / 谷氨酸羧基、半胱氨酸巯基）以及水分子形成配位复合物，配位几何构型（四面体、八面体）影响催化性能。以碳酸酐酶为例，它的活性中心有三个组氨酸残基和一个水分子与之配位，形成四面体构型，Zn^{2+} 的 Lewis 酸性使配位水分子的 pK_a 从 14 降到约 7，大大促进了 OH^- 对 CO_2 的亲核攻击。2024 年有关非血红素铁酶的研究又拓宽了金属离子催化的应用范围，该类酶可以催化不对称烯烃三氟甲基双官能团化反应，利用生物催化产生三氟甲基自由基，为有机氟化学提供了一种新的酶催化方法。

4 酶催化机制的现代理论进展与应用前景

4.1 活性中心预组织与过渡态稳定化理论

随着酶催化认识的不断深入，催化理论也从锁钥、诱导契合模型发展为预组织理论。该理论认为酶活性中心的催化基团在底物结合之前就已经有序地排列好，从而减少生成过渡态时的熵损耗，并且静电相互作用是稳定过渡态的主要驱动力。与之配套的近攻击构象理论说明预组织结构可以束缚底物到最优反应姿态，分支酸变位酶可以把对应自由能从 8kcal/mol 降到 0.6kcal/mol，直观地证明了它的催化增益。2025 年丝氨酸水解酶人工设计研究也证明了该机制的实用价值，用深度学习优化静电预组织状态，成功构建了催化效率对标天然酶的人工酶体系。

4.2 量子隧穿效应与动力学同位素效应

在确定了静电预组织等经典催化机制之后，学界又发现了量子隧穿这一特殊的催化途径，质子、氢负离子转移时可以直接穿过经典能垒，也可以解释反应中反常的动力学同位素效应。隧穿效率受供受体距离、势垒参数、蛋白振动耦合三者共同影响，活性中心持续的构象呼吸运动可以灵活调节隧穿间距，形成振动促隧穿机制，很好地解释了低温环境下酶仍然具有高效催化能力的现象。但是该效应只在少数酶体系中得到验证，它是否普遍作用于所有的酶促反应还存在争议，需要更多的实验和模拟研究来证明。

4.3 人工酶设计与酶工程改造

根据上述催化理论的完整认知，科研人员开始人工酶的开发工作，人工金属酶是目前主流方向，将金属催化剂嵌入蛋白支架中，兼顾高选择性和水相温和反应条件，已经应用于 CO_2 还原、烯烃复分解等非常规反应，优化关键集中在蛋白支架、金属锚定和第二配位层调控。2025 年深度学习技术实现丝氨酸水解酶从头设计，融合理论催化中心模型和多套算法，使人工酶性能得到突破。但是人工酶的活性远远不及进化天然酶，主要瓶颈就是复刻活性中心动态构象和远程静电调控网络。

4.4 酶催化机制研究的技术前沿

人工酶研发存在的诸多局限，也反过来促使观测和计算技术不断升级，多种前沿手段一起完善酶催化机理研究体系。冷冻电镜可以解析大型酶复合物，弥补了传统晶体学不能捕捉构象异质性的不足，2025 年 β - 葡萄糖苷酶研究就用该技术解析质子转移路径。计算上 QM/MM 多尺度模拟兼顾电子结构和蛋白环境，机器学习势函数支持长时间动力学模拟，实验观测和理论计算互相配合，完整解析活性中心动态催化全过程。

5 结语

酶活性中心是生命体系中最为精密的分子机器，对酶活性中心结构特征和催化机制的深入研究，既揭示了生命活动高效、特异的本质，又给人工催化剂的设计、酶工程改造提供丰富的灵感和理论依据。从经典的邻近定向、酸碱催化、共价催化到现代的预组织理论、量子隧穿效应，对酶催化机制的认识越来越深入。目前，由于结构生物学、计算化学、人工智能技术的交叉融合，研究人员正一步步地接近从头设计出具有天然酶效率的人工催化剂的宏伟目标。但是天然酶活性中心高度动态性、远程构象调控效应以及与溶剂环境复杂的相互作用，仍然是人工设计的难题。未来的研究要从更精细的时空尺度上解析活性中心的动态行为，发展可以精确预测构象变化和催化效率的理论模型，探索把天然酶催化原理拓展到非生物催化体系的新途径。酶活性中心研究不断深入，必将给绿色化学合成、生物医药开发、可持续能源转化等领域带来革命性的技术突破。

参考文献

[1] 方卉. 短乳杆菌谷氨酸脱羧酶活性中心关键位点的研究[D]. 浙江科技学院, 2019.

[2] 常新, 于晓梅, 傅志强. P450酶活性中心催化全氟烷基羧酸前体化合物的代谢转化路径研究[J]. 生态毒理学报, 2023, 18 (3): 55-67.

[3] 陈全亮, 周朝晖. 固氮酶活性中心研究五十年[J]. 大学化学, 2024, 39 (7): 287-293.