

## 微量热法研究单底物酶促反应的热力学和动力学性质及过渡态的分析

望天志\* 李卫萍\*\* 刘 义

万洪文\*\* 吴鼎泉 屈松生

(武汉大学化学系 武汉 430072)

(\*\*华中师范大学化学系 武汉 430070)

**摘要** 用 LKB-2107 型微量热系统,测定了漆酶催化氧化 3,4-二羟基苯甲醛、邻甲氧基酚、邻苯三酚、3,4,5-三羟基苯甲酸反应的热谱图,利用热谱图计算了米氏常数( $K_m$ )、反应速率常数( $k_2$ )和热力学参数( $\Delta_r H_m$ ,  $\Delta G_0$ ,  $\Delta G_T^\ddagger$ ,  $E_a$ ,  $\Delta S_T^\ddagger$ ).并应用过渡态理论对其催化过程进行了分析.结果表明:稳定过渡态结构有利于酶促反应,酶-底物在反应物时相互作用仅仅是降低酶的催化效率.提出两种可能提高酶催化效率的方法.由活化熵( $\Delta S_T^\ddagger$ ) $<0$  得出酶-底物在过渡态的结构较酶-底物复合物的结构更为有序.

**关键词** 漆酶,微量热法,动力学,热力学,过渡态

微量热法是热化学研究中的重要手段之一,它曾对热化学的发展起过重要作用,近年来,它在细胞生物学、生物化学等方面得到了广泛的应用.已经证明<sup>[1~4]</sup>,微量热法可以用于酶促反应的研究.

漆酶是一种重要的含铜氧化酶,能与邻、对二酚、胺类底物反应<sup>[5]</sup>,其活性中心是 4 个紧密相连的铜原子,根据其光学性质的差异,可将铜原子分为三类,一个 I 型铜,一个 II 型铜和两个紧密相连的 III 型铜.近几十年来,主要研究漆酶的结构,催化氧化机理及活性中心铜的作用<sup>[6,7]</sup>.然而,很少有研究其热、动力学性质及利用过渡态理论分析其催化氧化过程的报道.本文用微量热法研究漆酶催化氧化 3,4-二羟基苯甲醛、邻甲氧基酚、邻苯三酚、3,4,5-三羟基苯甲酸反应的动力学参数( $K_m$ ,  $k_2$ )和热力学参数( $\Delta_r H_m$ ,  $\Delta G_0$ ,  $\Delta G_T^\ddagger$ ,  $E_a$ ,  $\Delta S_T^\ddagger$ ).在这四种底物中,我们选择了一种单酚和三种不同取代基的二酚类化合物,以寻求漆酶催化氧化单酚、二酚以及不同取代基二酚类底物的热、动力学性质的差异.在不同的温度条件下,测定了漆酶催化氧化 3,4,5-三羟基苯甲酸反应的热、动力参数,指出温度对漆酶催化氧化 3,4,5-三羟基苯甲酸热、动力学参数的影响.首次应用过渡态理论,从能量变化的角度,对其催化过程进行了分析,得出稳定过渡态结构有利于酶促反应.酶-底物在反应物时相互作用仅仅是降低酶的催化能力.提出两种可能提高酶催化效率的方法.由活化熵( $\Delta S_T^\ddagger$ ) $<0$  得出酶-底物在过渡态的结构较酶-底物复合物的结构更为有序.

\* 男,28岁,博士研究生

收稿日期:1996-12-17,国家自然科学基金(93105094)资助课题

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

在所有的溶液制备中,均使用二次蒸馏水,用分析纯的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  配制成  $\text{pH}=7.4$  的缓冲溶液,纯化的固体漆酶由武汉大学资源化学研究所提供,用缓冲溶液配制成一定浓度的溶液置于冰箱中备用.

底物:3,4-二羟基苯甲醛为化学纯、邻甲氧基酚为化学纯、邻苯三酚为化学纯、3,4,5-三羟基苯甲酸为分析纯,用缓冲溶液配制成一定浓度的溶液,通氮气除去其中溶解的氧气后备用.

### 1.2 仪器

反应是在 LKB-2107Batch 型微量热计中进行,有关仪器的结构、原理和操作方法见文献[8].

## 2 结果和讨论

### 2.1 摩尔反应焓的测定

用微量热法测定化学反应的摩尔反应焓是利用热谱图的总面积( $A$ )和仪器的标定常数( $K$ ),由下式求出

$$Q_r = KA \quad (1)$$

对于单底物酶促反应的摩尔反应焓用下式计算<sup>[8]</sup>

$$\Delta_r H_m = -Q_r/n_s \quad (2)$$

式中  $\Delta_r H_m$  表示摩尔反应焓,  $n_s$  为底物总的物质的量.

在  $25^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=7.4$  条件下,漆酶催化氧化 3,4-二羟基苯甲醛、邻甲氧基酚、邻苯三酚、3,4,5-三羟基苯甲酸的摩尔反应焓见表 1.

表 1 漆酶催化氧化四种底物的热、动力学参数  
( $\Delta_r H_m, K_m, k_2, \Delta G_0, \Delta G_T^\neq$ )

底物	3,4-二羟基苯甲醛	邻甲氧基酚	邻苯三酚	3,4,5-三羟基苯甲酸
<sup>a)</sup> $-\Delta_r H_m/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$321.99 \pm 3.40$	$47.71 \pm 0.54$	$349.70 \pm 3.61$	$330.69 \pm 3.07$
<sup>b)</sup> $K_m \times 10^4/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$148.3 \pm 0.7$	$966.6 \pm 3.8$	$7.266 \pm 0.160$	$69.20 \pm 1.36$
<sup>b)</sup> $k_2/\text{s}^{-1}$	$4.657 \pm 0.175$	$4.439 \pm 0.065$	$7.909 \pm 0.186$	$2.950 \pm 0.031$
$-\Delta G_0/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	10.44	5.791	17.91	12.33
$\Delta G_T^\neq/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	69.21	69.33	67.90	70.34

<sup>a)</sup> 5 次实验的平均值, <sup>b)</sup> 三组实验的平均值.

由表 1 可知,漆酶催化氧化 3,4-二羟基苯甲醛、邻苯三酚、3,4,5-三羟基苯甲酸摩尔反应焓的差别不大,说明取代基的差异不是影响摩尔反应焓的主要原因,而对于邻甲氧基酚而言,由于是单酚类的底物,与其它三种二酚类底物相比较,其摩尔反应焓较小,羟基的数目是影响摩尔反应焓的主要因素.

### 2.2 米氏常数的测定

对于单底物酶促反应,放热速率  $\Omega$  与反应速率  $v$  之间存在下式关系<sup>[1]</sup>,

$$\Omega = -\Delta_r H_m \cdot V_c \cdot \nu \quad (3)$$

最大放热速率表示为:

$$\Omega_{\max} = -\Delta_r H_m \cdot V_c \cdot \nu_{\max} \quad (4)$$

式中  $V_c$  表示反应体系中溶液的体积.

对于符合米氏机理的单底物酶促反应米氏常数的测定可根据下式:

$$1/\nu_0 = 1/\nu_{\max} + (K_m/\nu_{\max}) \cdot (1/[S_0]) \quad (5)$$

将(4)式代入(5)式,可得到:

$$1/\Omega_0 = 1/\Omega_{\max} + (K_m/\Omega_{\max}) \cdot (1/[S_0]) \quad (6)$$

初始放热速率  $\Omega_0$  可以通过解析反应的热谱图来求出,根据(6)式,按 Lineweaver - Burk 双倒数作图法,将  $1/\Omega_0$  对底物的初始浓度的倒数  $1/[S_0]$  作图,可求出米氏常数和最大放热速率常数  $\Omega_{\max}$  [8]. 表 1 是三组试验的平均值. 由表 1 可知,漆酶催化氧化四种底物的米氏常数不相同,其顺序为:邻甲氧基酚 > 3,4-二羟基苯甲醛 > 3,4,5-三羟基苯甲酸 > 邻苯三酚,米氏常数的大小反映了漆酶与底物的结合程度,米氏常数越小,说明漆酶与底物结合越强,四种底物与漆酶结合能力的大小与上述顺序相反. 由此说明漆酶与邻苯三酚结合能力最强,与单酚化合物邻甲氧基酚结合能力最弱.

### 2.3 反应速率常数的计算

对于符合米氏机理的单底物酶促反应.

$$\nu_{\max} = k_2 [E_0] \quad (7)$$

由(4)式和(7)式可得:

$$\nu_{\max} = -\Omega_{\max} / \Delta_r H_m \cdot V_c = k_2 [E_0] \quad (8)$$

利用(8)式和最大反应放热速率  $\Omega_{\max}$ , 计算出  $k_2$  的值, 计算结果见表 2. 在计算中, 取漆酶分子量为  $1.2 \times 10^5$  [9], 溶液的体积为 6.0 mL.

由实验结果可知, 漆酶催化氧化四种底物的反应速率常数的大小差异不大, 说明取代基的差异及单酚、二酚并不是影响反应速率的主要原因.

### 2.4 结合能和活化自由能的计算

结合能和活化自由能可分别按下面两式计算 [10]

$$\Delta G_0 = -RT \ln(1/K_m) \quad (9)$$

$$\Delta G_T^\ddagger = -RT \ln(k_2 h / k_b T) \quad (10)$$

式中  $k_b$  为波尔兹曼常数,  $h$  为普朗克常数,  $K_m$  和  $k_2$  为分别为米氏常数和反应速率常数.  $T$  是温度, 漆酶催化氧化 3,4-二羟基苯甲醛、邻甲氧基酚、邻苯三酚、3,4,5-三羟基苯甲酸的结合能和活化自由能的计算结果见表 1.

### 2.5 温度对酶促反应的影响

按上述方法处理, 在不同的温度, pH=7.4 条件下, 测定了漆酶催化氧化 3,4,5-三羟基苯甲酸的米氏常数、反应速率常数、结合能和活化自由能. 结果见表 2.

表 2 漆酶催化氧化 3,4,5-三羟基苯甲酸的  $K_m, k_2, \Delta G_0, \Delta G_T^\ddagger$  的值

T/K	$^a) K_m \times 10^3 / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$^a) k_2 / \text{s}^{-1}$	$-\Delta G_0 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta G_T^\ddagger / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S_T^\ddagger / \text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
295.15	$9.531 \pm 0.021$	$2.053 \pm 0.024$	11.42	70.50	-36.15
298.15	$6.920 \pm 0.136$	$2.950 \pm 0.031$	12.33	70.34	-35.25
303.15	$4.720 \pm 0.066$	$3.915 \pm 0.068$	13.50	70.84	-36.22
308.15	$4.169 \pm 0.199$	$6.033 \pm 0.080$	14.04	70.95	-36.09

a) 三组实验的平均值.

由表 2 可知,在实验的温度范围内,随着温度的升高,米氏常数( $K_m$ )逐渐减小,表明漆酶与底物结合得越紧.随着温度的升高,反应速率常数( $k_2$ )逐渐增大.活化自由能( $\Delta G_T^\ddagger$ )基本上与温度变化无关.

## 2.6 活化能和活化熵

对于单底物的酶促反应,可用下式表示



式中, E 表示酶, S 表示底物, ES 表示酶-底物复合物, P 表示产物.

在(11)式中,酶-底物复合物分解成产物和酶是速控步骤,可用以表示反应的速率.在酶促反应中,酶-底物复合物分解成产物和酶经历了一个过渡态,可利用过渡态理论来分析.由过渡态理论可给出:

$$k_2 = (RT/Nh) \exp(\Delta S_T^\ddagger/R) \cdot \exp(-E_a/RT) \quad (12)$$

$$\Delta G_T^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S_T^\ddagger = E_a - T\Delta S_T^\ddagger \quad (13)$$

只要测定了  $k_2$  和  $E_a$ , 就可以计算出酶促反应的活化熵  $\Delta S_T^\ddagger$ .

利用  $k_2$  和  $T$  的值,根据 Arrhenius 公式

$$\ln k_2 = -E_a/RT + A \quad (14)$$

进行线性回归可得到  $\ln k_2 = -7.197 \times 10^3 + 25.14$  由此可得到  $E_a = 59.83 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

根据(13)式计算不同温度下的活化熵见表 2.

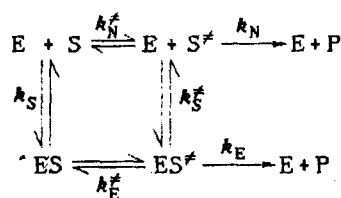


图 1 酶促反应与非酶促反应的示意图

从表 2 可知,在不同的温度下测定的活化熵( $\Delta S_T^\ddagger$ )均为负值,从热力学的角度来看,熵的减少表示分子混乱度降低.由此可以说明反应过程中,酶-底物过渡态的结合较酶-底物复合物更为有序.活化熵( $\Delta S_T^\ddagger$ )基本上不随温度的变化而变化.由  $\Delta S_T^\ddagger$  为负值可知,酶-底物形成过渡态较酶-底物复合物的结构更为有序.我们可以通过比较酶促反应和非酶促反应来理解.酶与单底物反应如下<sup>[11]</sup>.

在图 1 中,  $k_N^\ddagger$  表示 S 形成  $S^\ddagger$  的平衡常数,  $k_E$  表示酶促反应速率常数,  $k_N$  表示非酶促反应速率常数,  $k_s$  表示 E + S 形成 ES 酶-底物复合物平衡常数,  $k_E^\ddagger$  是 ES 形成  $ES^\ddagger$  的平衡常数,  $k_s^\ddagger$  是  $S^\ddagger$  结合到酶上形成  $ES^\ddagger$  的理论平衡常数.从图 1 中可得到下式.

$$k_s \cdot k_E^\ddagger = k_N^\ddagger \cdot k_s^\ddagger \quad (15)$$

因  $k_E \gg k_N$  则  $k_E^\ddagger \gg k_N^\ddagger$

从(15)式可知

$$k_s^\ddagger \gg k_s \quad (16)$$

$k_s^\ddagger \gg k_s$  说明酶结合过渡态比结合底物强得多.因此从理论上说明了酶促反应活化熵小于零的正确性,同时也可以说明酶对过渡态的专一性最强.因此可合成一些酶的“过渡态类似物”,这种物质应该是结构上类似于酶促反应中底物在过渡态时的结构,并且是一个稳定的化合物,这种物质很牢固地结合到酶分子上,是酶最好抑制剂.

## 3 过渡态的分析

测定酶及酶与底物作用的结构,对于分析酶促反应的作用机制非常重要.酶-底物复合物的结构可通过快速反应技术测定,但其过渡态的结构由于存在的时间短(半衰期为  $10^{-13}$  s)<sup>[12]</sup>,目前的技术还很难达到.

在酶促反应中,分析过渡态的结构对酶促反应机理的研究极其重要.过渡态结构的几何构型和电荷分布为酶-底物相互作用提供基本信息,并且分析过渡态的结构对抑制剂的设计提供理论依据.因此,我们从能量变化的角度来考察过渡态.在 pH=7.4, 298.15K 条件下,漆酶催化氧化四种底物的结合能均为负值表示漆酶与底物结合,自由能降低,降低值为  $\Delta G_0$ ,由酶-底物复合物转化为产物的过程中要克服较高的能垒,越过过渡态,其能量升高,其升高值为活化自由能  $\Delta G_T^\ddagger$ ,其能量变化示意图见图 2.

由图 2 可知,酶促反应的反应速率与反应过程中自由能的最高点(TS)与最低点(ES)之差有关<sup>[13]</sup>, (TS)与(ES)之差为活化自由能  $\Delta G_T^\ddagger$ ,  $\Delta G_T^\ddagger$  越小反应过程中需要克服的能垒越小,越有利于酶促反应.而  $\Delta G_0$  的大小与  $K_m$  有关,  $K_m$  表示酶与底物结合的程度,  $\Delta G_0$  越小, (TS)与(ES)之差越大,越不利于酶促反应的进行.酶-底物相结合仅仅是降低酶的催化能力.因此,要提高酶的催化效率,一方面降低酶与底物结合的程度,即增加  $\Delta G_0$  的值,另一方面增加酶-底物在过渡态时构象的稳定性,即降低酶-底物在过渡态的自由能,从而可增加酶的催化活性.分析酶-底物在过渡态(TS)时的自由能与酶-底物在反应产物(E+S)时自由能之差的大小,可以知道酶-底物在过渡态时的稳定程度.由表 3 可知 (TS)与 E+S 的自由能之差的大小顺序为:邻甲氧基酚

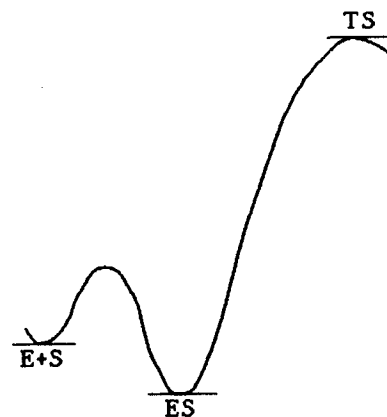


图 2 自由能变化示意图

E 表示漆酶, S 表示底物, TS 表示过渡态,  
ES 表示酶-底物复合物

>3,4-二羟基苯甲醛>3,4,5-三羟基苯甲酸>邻苯三酚,而过渡态的稳定程度与上述顺序相反.如果(TS)与(ES)的自由能降低的程度相同,则速率保持不变.这说明为什么邻苯三酚的结合能最大,而其反应速率常数并不比其它底物的反应速率小,反而比其它底物的反应速率常数稍大一点.酶-底物复合物和其在过渡态时的自由能的高低均与溶剂有关,可通过选择一定的溶剂,改变酶的构象,从而达到提高漆酶的催化效率. Khmel'nitsk 等<sup>[14]</sup>报道了在非水溶剂中,盐可明显增加酶的活性.目前,研究漆酶在非水溶剂中的催化反应已经引起人们的重视<sup>[15,16]</sup>.

表 3 漆酶催化氧化四种底物过渡态时的自由能与基态时的自由能之差

底物	3,4-二羟基苯甲醛	邻甲氧基酚	邻苯三酚	3,4,5-三羟基苯甲酸
$(\Delta G_T^\ddagger + \Delta G_0) / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	58.77	63.54	49.99	58.01

分析酶-底物过渡态结构将对药物和酶抑制剂的合成提供理论指导.

## References

- 1 Liu Jing - Song, Zeng Xian - Cheng, Deng Yu, Tian An - Min, *Acta Chimica Sinica*, **1994**, *52*, 767 (in Chinese).
- 2 J. K. Grime, K. Lockhar, B. Tan, *Anal. Chim. Acta*, **1977**, *91*, 243.
- 3 K. Bohmhammel, R. Hüttel, K. Pritzkat, G. Wolf, *Thermochim. Acta*, **1993**, *217*, 8.
- 4 M. Kurvits, E. Sümer, *Thermochimica Acta*, **1986**, *103*, 279.
- 5 J. D. Clemmer, B. L. Gilliland, R. D. Bartsch, R. A. Holwerd, *Biochim. Biophys. Acta*, **1979**, *568*, 307.
- 6 J. L. Cole, D. P. Bollou, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 8544.
- 7 P. A. Clark, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 1108.
- 8 Wu Dingquan, Mei Fuming, Qu Songsheng, *Thermochim. Acta*, **1990**, *167*, 203.
- 9 Du Yu - Min, *Chinese Chemical Society*, **1986**, *1*(1), 1 (in Chinese).
- 10 A. Fersht, "Enzyme structure and mechanism", 2nd Edn., W. H. Freeman, New York, **1985**, p. 311.
- 11 V. L. Schramm, B. A. Horensteins, P. C. Kline, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 18259.
- 12 W. Richard, *Acc. Chem. Res.*, **1972**, *5*, 10.
- 13 F. M. Menger, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 5368.
- 14 Yurii L. Khmel'nitsk, A. V. Levashov, N. L. Klyachko, K. Martinek, *Enzyme Microb. Technol.*, **1988**, *10*, 710.
- 15 K. Martinek, Iliya V. Berezin, Yurii L. Khmel'nitsk, N. L. Klyachko, A. V. Levashov, *Collection Czechoslovak Chem. Commun.*, **1987**, *52*, 2589.
- 16 Yurii L. Khmel'nitsk, H. Sphabie, D. S. Welch, J. S. Dorick, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 2647.

## Studies on Single - Substrate Enzyme - Catalyzed Reactions and Analysis of Transition State by Microcalorimetry

WANG Tian - Zhi\*    LI Wei - Ping\*\*    LIU Yi    WAN Hong - Wen\*\*

WU Ding - Quan    QU Song - Sheng

(Department of Chemistry Wuhan University, Wuhan, 430072)

(\*\* Department of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan, 430070)

**Abstract** The reactions between laccase and different substrates (3,4 - dihydroxybenzaldehyde, guaiacol, pyrogallol, gallic acid) have been studied by LKB - 2107 batch microcalorimetry system. The Michaelis constant ( $K_m$ ), the rate constant ( $k_2$ ) and thermodynamic parameters ( $\Delta_r H_m$ ,  $\Delta G_0$ ,  $\Delta G_T^\ddagger$ ,  $E_a$ ,  $\Delta S_T^\ddagger$ ) have been determined. The process of the reactions have been analyzed by using the transition state theory. The results show that formation of an enzyme - substrate complex is "anticatalytic". The entire and sole source of catalytic power is the stabilization of transition state; reactant - state interactions are by nature inhibitory and only waste catalytic power. The activation entropy ( $\Delta S_T^\ddagger < 0$ ) indicated that enzyme - transition structure is bound more tightly than enzyme - substrate complex.

**Keywords** laccase, microcalorimetry, thermodynamic, kinetic, transition state