

酶的扩散控制反应速率的研究

——方向因素与力场因素

周 国 城 江 寿 平

(中国科学院上海生物化学研究所溶液构象组)

摘 要

酶是一种生物催化剂,它的催化效率要比通常的催化剂高 10^7-10^{13} 倍。随着快速反应动力学的深入研究,近年来发现:一些酶与底物结合反应的速率,比按通常理论所算得的结合速率最大限度还要大一个数量级,出现了底物分子还没有扩散到酶的活性中心处就会起反应的悖谬。

针对这个问题,本文探讨了方向因素与力场因素在扩散控制反应过程中的作用,推出了一个新的计算酶的扩散控制反应速率的公式,为酶和中性底物的结合速率提供了新的最大限度,从而解释了上述曾被认为是难以解释的实验现象。此外,值得注意的是:新公式还反映了酶活性中心以外的大蛋白体与扩散控制反应速率间的关系,这也就说明了大蛋白体对酶的催化速率是起着重要作用的。

一、问题的提出

随着酶的作用原理的深入研究,最近面临着一个尖锐的问题,即如何来解释这样的现象:在有些酶与底物的相互作用中,实验所得的二级反应速度常数 k ,比按通常的扩散控制反应理论计算出来的最大限度还要大一个数量级。例如,碳酸在碳酸酐酶的作用下,进行脱水反应就是一个例子。在碳酸与碳酸酐酶结合的反应中^[1],按实验所得的二级反应速度常数 k 是 1.5×10^{10} 升/克分子·秒,而按通常的扩散控制反应速率的公式来计算,其二级反应速度常数的最大限度仅有 10^9 升/克分子·秒的数量级。果真如此的话,扩散控制反应的规律就不再成立,底物分子还没有扩散到酶的活性中心处就会起反应。

虽然,Alberty 和 Hammes^[2] 曾将酶和底物在溶液中的反应,看作是带电离子间的反应(例如,就象他们在处理延胡索酸酶与延胡索酸盐在溶液中的反应那样),将它们间的静电 Coulomb 力考虑进去,用 Debye^[3] 理论来进行修正,以提高按扩散控制反应理论计算出来的二级反应速度常数的最大限度。但是,对碳酸酐酶与 H_2CO_3 的反应却不能这样做。因为 Koenig 和 Brown^[1] 最近通过分析核弛豫速率数据,以及应用微观可逆性原理和从动力学方面的考虑,论证了在碳酸酐酶催化 H_2CO_3 的脱水反应中,底物 H_2CO_3 是作为中性分子与酶作用的。因

此就不能象 Alberty 和 Hammes 那样,将静电 Coulomb 力考虑进去,用 Debye 理论来进行修正。

但值得注意的是,正如 Koenig 和 Brown^[1]所指出的,如果把酶分子的整个表面都当作活性部位,则按通常的扩散控制反应速率的公式来计算,所得的二级反应速度常数的最大限度,也可达到 10^{10} 升/克分子·秒的数量级,即与实验所得的数量级基本一致。于是,很自然地就出现了这样一些问题:这究竟是一种巧合呢,还是有其内在的联系?如果催化反应仅在酶的活性中心进行的话,又如何来理解实验所得的碳酸酐酶与 H_2CO_3 的二级反应速度常数高达 10^{10} 升/克分子·秒的现象呢?为了确保如此快地进行反应,底物是如何扩散到酶的活性中心的呢?活性中心以外的大蛋白体,在这个过程中究竟起何作用?本文将对这些问题进行讨论。

二、方向因素

化学动力学中,在处理溶液中溶质分子的化学反应时,通常是用 Smoluchowski^[4]的扩散控制反应理论来估计二级反应速度常数所可能达到的最大限度的。按照 Smoluchowski 理论,在溶液中两个溶质分子起化学反应的首要条件是:起反应的分子必须通过扩散,穿过溶剂分子而彼此相遇¹⁾。Arrhenius 指出,不是每次相遇都能起反应,还要受到活化能的限制,相遇次数只是给出了反应次数的最大限度(对应活化能趋于零的情况)。因此,估计二级反应速度常数最大限度 k_{lim} 问题,就归结为求出两种起反应的溶质分子间扩散相遇的频率是多少的问题。

Smoluchowski 是这样推出这个相遇频率公式的。设反应物 A 的一个分子周围,分布有另一种反应物 B 的分子(见图 1)。由于在 A 分子周围, B 分子有一浓度梯度,根据 Fick 扩散定律,有扩散方程:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c, \quad (1)$$

式中 ∇^2 是 Laplace 算子, c 是 B 分子在空间的浓度分布, D 是扩散系数(考虑到 A 分子也进行扩散运动,一般将 D 看作为 A 分子的扩散系数与 B 分子的扩散系数之和^[6])。通常用扩散理论来计算反应速度常数的最大限度 k_{lim} ,只需要考虑定态的扩散方程就可以了。此时方程(1)变为:

$$\Delta c = 0. \quad (2)$$

图 1 $R_0 = R_A + R_B$ 是 A 分子与 B 分子起反应的距离

Smoluchowski 假定了 B 分子与 A 分子球表面上任一点相接触就起反应,因此给出了边界条件:

$$c|_{r=R_0} = 0. \quad (3)$$

而在离 A 分子较远的地方, B 分子的浓度等于溶液中的浓度 c_0 ,即

$$c|_{r \rightarrow \infty} = c_0. \quad (4)$$

对应这样边界条件的方程(2),就成了球形对称的扩散问题了。其解为:

$$c(r) = c_0 \left(1 - \frac{R_0}{r}\right). \quad (5)$$

根据 Fick 定律,有扩散流密度,

$$\mathbf{i} = -D \nabla c, \quad (6)$$

1) Fowler^[5] 首先将溶液中溶质分子的这种碰撞用“相遇”一词来描述。

式中 ∇ 是 Hamilton 算子, 单位时间里, B 分子流到 A 分子球表面上的总数为:

$$I = \iint_{S_{R_0}} (-D\nabla c)_{r=R_0} \cdot d\mathbf{s}, \quad (7)$$

上式面积分是在半径为 R_0 的整个球面上进行的。将 (5) 式中的 c 代入 (7) 式, 得

$$I = 4\pi DR_0 c_0, \quad (8)$$

因此

$$k_{lim} = 4\pi DR_0. \quad (9)$$

(9) 式在估计荧光熄灭的速率上是很有效的^[7-9]。有关这方面的理论, 后来又被 Sveshnikoff^[10], Collins^[11], Collins 和 Kimball^[6,12] 所发展。

但是, 当用 (9) 式来估计酶与底物相互作用的 k_{lim} 时, 出现了这样的问题。虽然酶与底物都可近似地看作是球形的^[2], 但并不能用一球形对称的扩散图象 (象图 1 那样) 来描绘。因为酶的活性中心通常是分布在酶分子球表面的一小区域上¹⁾, 底物只有与活性中心相接触时才起反应, 故底物分子的浓度只有在活性中心的表面上²⁾才等于零, 而在活性中心之外的大蛋白质体表面上并不等于零, 即使活化能等于零也不会如此。为此, Alberty 和 Hammes^[2] 提出了半球扩散的图象。他们假定, 活性中心分布在酶分子一凸出的小半球上 (见图 2), 底物只有在和这个活性半球相接触时才起反应。因此, 活性部位的表面积为:

$$S_{\theta_0} = 2\pi r_0^2, \quad (10)$$

式中 r_0 是活性半球的半径与底物分子半径之和。他们进一步假定, 扩散仍然是球形对称的, 但对称中心不是酶分子的中心而是活性半球的中心, 因此 (9) 式中的 R_0 应该用 r_0 来代替, 并且取其一半的结果。即他们提出

$$k_{lim} = 2\pi Dr_0. \quad (11)$$

至今一般的研究论文中, 都是用这个公式来估计酶与底物相互作用的二级反应速度常数的最大限度的^[1,13,14]。

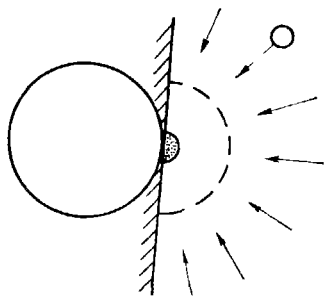


图 2 半球扩散图
(画有黑点部分是活性半球)

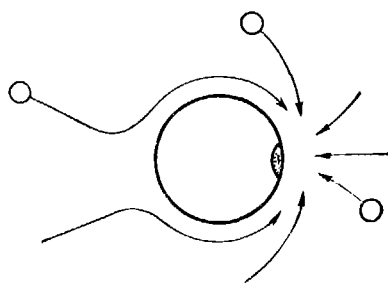


图 3 将刚性墙去掉后的扩散图
(画有黑点部分是酶的活性中心)

应该注意, 在 Alberty-Hammes 的半球扩散图象中, 人为地引入了一道刚性墙 (见图 2), 它将刚性墙左边的底物分子在浓度梯度作用下扩散到活性中心处的效应全给撇除在外了; 若把

- 1) 更真实地讲, 活性中心通常只有一部分在酶分子表面上或者全部处于一种凹进去的分子裂隙 (crevice) 之中。关于这种情况我们已在其他文章中作了进一步的考虑。
- 2) 以后, 除特别注明外, 凡是讲到“酶分子表面”, 均指酶分子半径加上底物分子半径所画球面的表面。

这道客观上并不存在的刚性墙去掉,使反应体系回复到原来的面貌(见图3)¹⁾,又应该如何来考虑这部分粒子流的效应呢?将出现怎样的扩散图象呢?要回答这些问题,必须把方向因素考虑进去,解非球形对称的扩散方程。

三、力场因素

关于酶与底物相互作用进行扩散反应,除了要考虑方向因素外,还必须考虑力场因素。一般讲,在扩散过程中,酶与底物间有如下两种力场的作用:

1. Coulomb 力场。其相互作用位能函数为:

$$U_{\text{Coulomb}} = \frac{Z_E Z_S e^2}{\epsilon r}, \quad (12)$$

式中 e 是电子电荷, Z_E , Z_S 分别是酶与底物的电荷数, ϵ 是介电常数。

2. Van der Waals 力场。这虽然是一种短程力,但在我们现在的情况下,由于涉及到底物分子扩散到与酶分子相接触的全过程,故这种短程力不容忽视。其作用位能的函数形式我们在后面处理具体问题再讨论。现在,我们先设它为:

$$U_{\text{van}} = U_{\text{van}}(r), \quad (13)$$

式中 r 是酶分子中心与底物分子中心间的距离。

因此,酶与底物间的相互作用位能一般可表示成

$$U = U_{\text{Coulomb}} + U_{\text{van}}. \quad (14)$$

若底物是中性分子(例如碳酸酐酶的底物),则不存在 Coulomb 位能,只有 Van der Waals 位能。

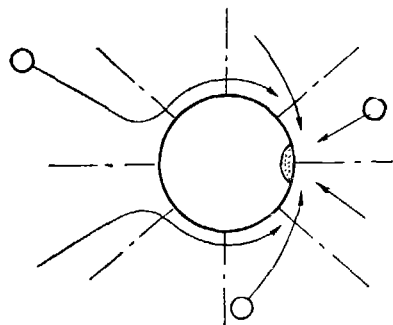


图 4

考虑了方向因素与力场因素后的扩散图
(点划线是酶与底物的作用力线)

若将方向因素与力场因素一起考虑,底物与酶相互作用进行扩散反应的图象应该是:

1. 由于在酶分子活性中心表面上底物浓度等于零,故底物分子在浓度梯度作用下,四面八方非球形对称地向活性中心进行扩散。

2. 底物分子在浓度梯度作用下进行扩散的同时,还受到底物与酶之间的分子力(若底物是带电离子的话,还包括 Coulomb 力)的作用(见图4)。若这个作用力是相吸引的话,将会增快底物流向酶分子的速度;反之,若作用力是相斥的话,则会减慢底物流向酶分子的速度。因此,按照我们的图象,问题就归结为解一个在有心力场作用下,进行非球形对称的扩散方程。

这个方程的边界条件是:只有在酶分子的活性中心表面上,底物的浓度才等于零;而在大蛋白质表面上,由于没有反应源,故底物分子流沿这层表面的法向分量等于零。

四、数学物理处理

设活性部位在酶分子球表面上占有一圆弧面(见图5),此圆弧面的面积为:

1) 注意,在图3中为了使模型更接近真实情况,我们没有象图2那样,把活性中心画成一个凸出的半球,而把它画成分布在酶分子球面上的一小圆弧面。当然,它们的表面积是相等的。

$$S_{\theta_a} = \int_0^{\theta_a} \int_0^{2\pi} R_0^2 \sin \theta d\theta d\varphi = 4\pi R_0^2 \sin^2 \frac{\theta_a}{2}. \quad (15)$$

它所对应的立体角为:

$$\Omega_{\theta_a} = 4\pi \sin^2 \frac{\theta_a}{2}. \quad (16)$$

现在,我们先假定酶分子固定不动,在溶液中运动的底物分子受三种力的作用:

1. 酶与底物间的作用力为 $-\nabla U$.

2. 底物分子在溶剂中运动所遇到的阻力为 $-\rho_s \frac{d\mathbf{r}}{dt}$. ρ_s

是底物分子在给定溶剂中运动的摩擦系数. 在 Stokes 定律可适用的情况下, $\rho_s = 6\pi\eta R_s$. η 是粘滞系数, R_s 是底物分子的半径.

3. 涨落很快、引起底物分子无规则运动的力 $\mathbf{F}$. 这部分力是由于它受到溶剂分子和其它底物分子的碰撞引起的.

根据牛顿定律,有运动方程

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = -\nabla U - \rho_s \frac{d\mathbf{r}}{dt} + \mathbf{F}. \quad (17)$$

由于我们现在考虑的是底物分子的扩散行为,故应该用统计平均的方法来处理. 将方程 (17) 对大群粒子求平均,即把大群粒子的方程相加,然后用粒子数除. 我们用符号 $\langle \rangle$ 表示对大群粒子的平均,得

$$m \frac{d^2 \langle \mathbf{r} \rangle}{dt^2} = -\nabla U - \rho_s \frac{d\langle \mathbf{r} \rangle}{dt} + \langle \mathbf{F} \rangle. \quad (18)$$

在我们所考虑的问题中, m 一般在 10^{-21} — 10^{-22} 克的数量级,而 ρ_s 在 10^{-8} — 10^{-9} 达因·秒/厘米的数量级,故方程 (18) 中的 $m \frac{d^2 \langle \mathbf{r} \rangle}{dt^2}$ 完全可以略去(关于这一点的数学证明见附录),于是有

$$\frac{d\langle \mathbf{r} \rangle}{dt} = -\frac{1}{\rho_s} \nabla U + \frac{1}{\rho_s} \langle \mathbf{F} \rangle, \quad (19)$$

粒子流密度

$$\mathbf{i} = c \frac{d\langle \mathbf{r} \rangle}{dt} = -\frac{c}{\rho_s} \nabla U + \frac{c}{\rho_s} \langle \mathbf{F} \rangle, \quad (20)$$

式中 c 是底物分子的浓度.

另一方面,我们可以用这样的方法来给出 $\langle \mathbf{F} \rangle$ 的表达式. 当底物分子与酶分子间不存在力场作用时,即 $\nabla U = 0$ 时,底物分子的运动应服从 Fick 扩散定律,即

$$\mathbf{i} = -D_s \nabla c = \frac{c}{\rho_s} \langle \mathbf{F} \rangle. \quad (21)$$

又根据爱因斯坦^[15]的 Brown 运动理论,有

$$D = \frac{kT}{\rho}, \quad (22)$$

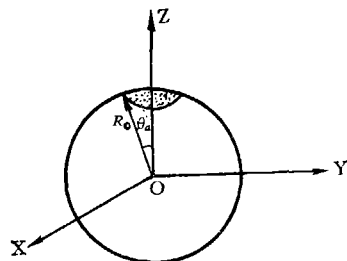


图 5 $R_0 = R_E + R_S$ 是酶分子半径与底物分子半径之和

式中 D 是 Brown 粒子的扩散系数, k 是 Boltzmann 常数, T 是绝对温度, ρ 是 Brown 粒子在溶剂中运动的摩擦系数。对照 (21), (22) 两式, 得

$$\langle \mathbf{F} \rangle = - \frac{kT}{c} \nabla c. \quad (23)$$

因此, $\langle \mathbf{F} \rangle$ 事实上就是扩散力。将它代入 (20) 式, 得

$$\mathbf{i} = - \left[\frac{c}{\rho_s} \nabla U + \frac{kT}{\rho_s} \nabla c \right]. \quad (24)$$

类似 Umberger 和 LaMer^[7] 的处理, 考虑到酶分子的运动效应¹⁾, 可将 (24) 式写成:

$$\mathbf{i} = - \left[\left(\frac{1}{\rho_s} + \frac{1}{\rho_E} \right) c \nabla U + kT \left(\frac{1}{\rho_s} + \frac{1}{\rho_E} \right) \nabla c \right], \quad (25)$$

式中 ρ_E 是酶分子在溶剂中运动的摩擦系数。

现在, 我们作变换, 令

$$c^* = c e^{U/kT}. \quad (26)$$

代入 (25) 式, 得粒子流密度

$$\mathbf{i} = - D e^{-U/kT} \nabla c^*, \quad (27)$$

式中 $D = D_s + D_E$ 。一般讲 D_E 比 D_s 小得多。

于是, 在有力场时, 底物分子的定态扩散方程为:

$$0 = \frac{\partial c}{\partial t} = - \nabla \cdot \mathbf{i} = D \nabla \cdot (e^{-U/kT} \nabla c^*),$$

即

$$\nabla \cdot (e^{-U/kT} \nabla c^*) = 0. \quad (28)$$

根据前面的分析, 其边界条件是(见图 5):

$$\begin{cases} c(R_0, \theta) = 0 & (\text{当 } 0 \leq \theta < \theta_a), \\ \left(\mathbf{i} \cdot \frac{\mathbf{r}}{r} \right)_{r=R_0} = 0 & (\text{当 } \theta_a < \theta \leq \pi), \\ c(r, \theta)|_{r \rightarrow \infty} = c_0. \end{cases} \quad (29)$$

由 (26), (27) 式, 并注意到 $U(r)|_{r \rightarrow \infty} = 0$, 可把上面的边界条件进一步写成:

$$\begin{cases} c^*(R_0, \theta) = 0 & (\text{当 } 0 \leq \theta < \theta_a), \\ \left. \frac{\partial c^*(r, \theta)}{\partial r} \right|_{r=R_0} = 0 & (\text{当 } \theta_a < \theta \leq \pi), \end{cases} \quad (30)$$

$$c^*(r, \theta)|_{r \rightarrow \infty} = c_0. \quad (31)$$

将方程 (28) 写成球坐标形式:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial}{\partial r} c^* \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin \theta \frac{\partial}{\partial \theta} c^* \right) - \frac{1}{kT} \left(\frac{\partial}{\partial r} c^* \right) \left(\frac{\partial U}{\partial r} \right) = 0. \quad (32)$$

用分离变量法, 得

$$c^*(r, \theta) = \sum_{l=0}^{\infty} R_l(r) P_l(\cos \theta), \quad (33)$$

1) 但要注意, 我们这里也和 Alberty-Hammes^[13] 的处理一样, 忽略掉酶分子转动的效应。

式中 $P_l(\cos\theta)$ 是 Legendre 多项式, $R_l(r)$ 是方程

$$\frac{d^2 R_l}{dr^2} + \left(\frac{2}{r} - \frac{1}{kT} \frac{dU}{dr} \right) \frac{dR_l}{dr} = \frac{l(l+1)}{r^2} R_l \quad (l = 0, 1, 2, \dots) \quad (34)$$

的解。当 $l = 0$ 时, 方程 (34) 的解为:

$$R_0 = A_0 - B_0 \int_r^\infty \frac{e^{U/kT}}{r^2} dr, \quad (35)$$

A_0, B_0 是待定常数。再考虑 $l \neq 0$ 的情况。由于 $r \rightarrow \infty$ 时, 方程 (34) 中的 $\frac{1}{kT} \frac{dU}{dr} \frac{dR_l}{dr}$ 比起其它几项来要小得多, 故当 $r \rightarrow \infty$ 时, 方程 (34) 的解接近于方程

$$\frac{d^2 \tilde{R}_l}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{d\tilde{R}_l}{dr} = \frac{l(l+1)}{r^2} \tilde{R}_l \quad (36)$$

的解。后者的解是

$$\tilde{R}_l = \tilde{A}_l r^l + \tilde{B}_l \frac{1}{r^{l+1}}. \quad (37)$$

考虑到边界条件 (31), 方程 (34) 的解 (当 $l \neq 0$ 时) 的渐近形式应该是:

$$R_l(r)|_{r \rightarrow \infty} \sim \frac{1}{r^{l+1}}, \quad (38)$$

由此同时定出 $A_0 = c_0$ 。于是, (33) 式可写成:

$$c^*(r, \theta) = c_0 - B_0 \int_r^\infty \frac{e^{U/kT}}{r^2} dr + \sum_{l=1}^{\infty} R_l(r) P_l(\cos\theta). \quad (39)$$

根据 (27) 式, 单位时间扩散到酶分子活性中心的底物分子数是:

$$I = \iint_{S_{\theta_a}} (\mathbf{i})_{r=R_0} \cdot d\mathbf{s} = \iint_{S_{\theta_a}} (-D e^{-U/kT} \nabla c^*)_{r=R_0} \cdot d\mathbf{s}.$$

上面的积分仅在酶的活性表面 S_{θ_a} 上进行, 但由于边界条件 (30) 式, 我们可把积分扩展至整个酶分子球面 S_{R_0} , 即

$$I = \iint_{S_{R_0}} (-D e^{-U/kT} \nabla c^*)_{r=R_0} \cdot d\mathbf{s}. \quad (40)$$

将 (39) 式的 c^* 代入上积分, 利用 Legendre 多项式 $P_l(\cos\theta)$ 的正交性, 得

$$I = 4\pi D B_0. \quad (41)$$

定义

$$g = \lim_{\Delta r \rightarrow 0} \frac{\int_{R_0}^{R_0+\Delta r} \int_0^{2\pi} \int_{\theta_a}^{\pi} c(r, \theta) r^2 \sin\theta d\theta d\varphi dr}{c_0 \int_{R_0}^{R_0+\Delta r} \int_0^{2\pi} \int_{\theta_a}^{\pi} r^2 \sin\theta d\theta d\varphi dr} = \frac{\int_{\theta_a}^{\pi} c(R_0, \theta) \sin\theta d\theta}{2c_0 \cos^2 \frac{\theta_a}{2}}. \quad (42)$$

根据定义, g 的物理意义就是酶大蛋白体表面上底物分子的平均浓度与溶液中浓度之比, 以后就把它简称为界溶比。由 (26) 式和边界条件 (30), 我们还可把 g 写成:

$$g = \frac{e^{-U(R_0)/kT} \int_0^{\pi} c^*(R_0, \theta) \sin\theta d\theta}{2c_0 \cos^2 \frac{\theta_a}{2}}. \quad (43)$$

将 (39) 式的 c^* 代入 (43) 式, 再利用 Legendre 多项式 $P_l(\cos\theta)$ 的正交性, 得

$$g = \frac{e^{-U(R_0)/kT}}{c_0 \cos^2 \frac{\theta_a}{2}} \left[c_0 - B_0 \int_{R_0}^{\infty} \frac{e^{U(r)/kT}}{r^2} dr \right], \quad (44)$$

从上式得

$$B_0 = \frac{c_0 \left(1 - g e^{U(R_0)/kT} \cos^2 \frac{\theta_a}{2} \right)}{\int_{R_0}^{\infty} \frac{e^{U(r)/kT}}{r^2} dr}. \quad (45)$$

代入 (41) 式, 得

$$I = \frac{4\pi D c_0}{\int_{R_0}^{\infty} \frac{e^{U(r)/kT}}{r^2} dr} \left[1 - g e^{U(R_0)/kT} \cos^2 \frac{\theta_a}{2} \right]. \quad (46)$$

于是得

$$k_{lim} = \frac{4\pi D}{\int_{R_0}^{\infty} \frac{e^{U(r)/kT}}{r^2} dr} \left[1 - g e^{U(R_0)/kT} \cos^2 \frac{\theta_a}{2} \right]. \quad (47)$$

上面的公式是在分子数/厘米³浓度单位下推导出来的, 将其换到通常所用的克分子/升为浓度单位, 则得

$$k_{lim} = \frac{4\pi D N}{1000 \int_{R_0}^{\infty} \frac{e^{U(r)/kT}}{r^2} dr} \left[1 - g e^{U(R_0)/kT} \cos^2 \frac{\theta_a}{2} \right], \quad (48)$$

N 是 Avogadro 常数. 公式 (48) 中的界溶比 g 可以用电子计算机直接解方程 (28), 求出 $c^*(R_0, \theta)$ 的数值解, 然后代入 (43) 式而求得. 或者也可根据实验来估计出 g 的数量级. 一旦 g 的数值知道后, 我们就能按照 (48) 式, 比较精确地 (即在既考虑方向因素、又考虑力场因素的意义) 求得酶的扩散控制反应速率最大限度的值.

五、与实验结果比较

现将 (48) 式计算出来的结果与实验结果作一比较.

根据实验, 碳酸酐酶与 H_2CO_3 的二级反应速度常数 $k \sim 10^{10}$ 升/克分子·秒, 而按一般的公式计算, k_{lim} 只有 10^9 升/克分子·秒^[1,13,14] 的数量级, 难以说明实验现象. 现在我们用公式 (48) 来计算其 k_{lim} , 看看结果如何.

虽然 H_2CO_3 是中性底物^[1], 故 (48) 式中的位能项 $U(r)$ 中不存在 Coulomb 位能, 但仍具有

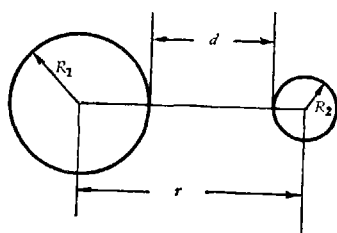


图6 $R_1 + R_2 = R_0$

Van der Waals 位能. Lifshitz^[16] 从介质中涨落电磁场的角度, 曾提出较严格的计算宏观 (这里宏观是指比原子尺度大的意义) 容体间的 Van der Waals 位能理论. 在这个基础上, 最近 Langbein^[17], Mitchell 和 Ninhan^[18] 计算了两球形大分子间的 Van der Waals 位能. 根据他们的计算, 两球形大分子 (或一个大分子与一个小分子) 间的 Van der Waals 位能可归结为 (见图 6):

$$U_{\text{van}}(r) \sim \begin{cases} \frac{1}{r - R_0} = \frac{1}{d} & (\text{当 } d < R_1, R_2 \text{ 时}), \\ \frac{1}{r^6} \sim \frac{1}{d^6} & (\text{当 } d \gg R_1, R_2 \text{ 时}). \end{cases} \quad (49)$$

Langbein^[17] 的计算还给出, 当两球形分子相接触, 即 $d = 0$ 时, $U_{\text{van}}(r) = U_{\text{van}}(R_0)$ 为有限值。事实上, $U_{\text{van}}(R_0)$ 就是两球形分子的 Van der Waals 结合位能。

对于一般蛋白质与中性小分子在溶液中的 Van der Waals 结合位能 $U_{\text{van}}(R_0)$ 大约等于 -6 千卡/克分子^[19]。因此, 在通常温度下,

$$\frac{U(R_0)}{kT} = \frac{U_{\text{van}}(R_0)}{kT} \sim \frac{-6 \text{ 千卡}}{NkT} = \frac{-6 \text{ 千卡}}{RT} \sim -10.$$

它们间的作用力程大约是几个 $\text{\AA}$ 。故我们在计算过程中, 完全可以近似地认为, 碳酸酐酶与 H_2CO_3 的 Van der Waals 位能在几个 $\text{\AA}$ 的范围内就从 $U_{\text{van}}(R_0)$ 变到零, 即完全忽略掉两分子相距几个 $\text{\AA}$ 之外的 Van der Waals 引力效应, 当然更不必去考虑相距较远时 $U_{\text{van}}(r) \sim \frac{1}{r^6}$ 的效应¹⁾。

Van der Waals 位能确定之后, 我们就能用电子计算机, 直接由方程(28), 求出 $c(R_0, \theta) = e^{-U(R_0)/kT} c^*(R_0, \theta)$ 的数值来^[20]。对于碳酸酐酶, 按照

一般文献的资料, $R_0 = 20 \text{ \AA}$ ^[1, 13, 14], 活性部位的表面积[看(10)式] $S_{\theta_0} = 2\pi r_0^2 = 2\pi(5 \text{ \AA})^2$ ^[1, 13, 14], 于是, 由(15)式得 $\theta_0 = 2 \sin^{-1} \frac{1}{4\sqrt{2}} \approx 20^\circ$ 。这时, 计算机算

得的 $c(R_0, \theta)$ 值标明在图 7 上。再由(42)式, 得

$$g \approx 114.$$

将 $\frac{U(R_0)}{kT} \sim -10$, $g \sim 114$ 代入(48)式, 我们看到括号中第二项比起 1 来, 要小 2—3 个数量级, 完全可以略去。又因为 $U(r) = U_{\text{van}}(r)$ 在区间 $[R_0, \infty)$ 总小于或很快地趋于零。所以对碳酸酐酶, 我们有

$$k_{\text{lim}} \approx \frac{4\pi DN}{1000 \int_{R_0}^{\infty} \frac{e^{U(r)/kT} dr}{r^2}} \approx \frac{4\pi DNR_0}{1000}.$$

将 $D = 7.0 \times 10^{-6}$ 厘米²/秒^[1, 13, 14], $R_0 = 20 \text{ \AA}$ 代入上式, 得

$$k_{\text{lim}} \approx 10^{10} \text{ 升/克分子} \cdot \text{秒}.$$

从上面我们看到, 按(48)式计算出来的碳酸酐酶的 k_{lim} , 比按通常所用的公式^[1, 13, 14]计算出来的结果要大一个数量级, 而与实验所得的二级反应速度常数 k 同一个数量级。因此, (48)式不仅更真实地反映了酶与底物进行扩散反应的图象, 而且所得的结果也更令人满意, 它解释了过去一般的扩散控制反应公式所不能解释的现象。

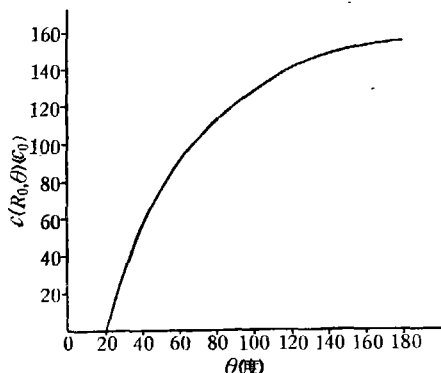


图 7 沿酶分子表面底物浓度分布曲线

1) 我们这样取近似, 显然把 Van der Waals 引力的效应考虑小了些。但若在这样的情况下, 算得的 k_{lim} 也能达到 10^{10} 升/克分子·秒的数量级, 则对解释实验结果只有起了加强的作用。

六、讨 论

1. 关于 θ_a . θ_a 是酶分子上活性部位表面积 S_{θ_a} 的最大偏角. 由 (15) 式我们看到, θ_a 的大小取决于酶分子的半径 R_0 与活性部位表面积 S_{θ_a} . 当 S_{θ_a} 固定时, θ_a 将随 R_0 的增大而减小. 因此对于各种不同的酶来讲, θ_a 一般也不一样.

当 $\theta_a = \pi$, 即整个酶分子表面都是活性中心时, 则不存在方向因素的问题, 这时由 (42) 式得

$$g = 0.$$

于是 (47) 式变为:

$$k_{\text{lim}} = \frac{4\pi D}{\int_{R_0}^{\infty} e^{U(r)/kT} \frac{dr}{r^2}}, \quad (50)$$

这与 Debye^[31] 公式完全一致; 又若酶分子与底物间不存在作用力即 $U(r) = 0$ 的话, 则公式 (47) 进一步简化为:

$$k_{\text{lim}} = 4\pi D R_0.$$

即与 Smoluchowski 公式完全一致.

因此, 公式 (47) 是包括了 Smoluchowski 公式与 Debye 公式在内的具有更一般意义的公式.

又当 $\theta_a = 0$, 即不存在活性中心时, 边界条件 (30) 变为

$$\left. \frac{\partial c^*(r, \theta)}{\partial r} \right|_{r=R_0} = 0 \quad (0 \leq \theta \leq \pi).$$

由此立刻可从 (39) 式得

$$c^*(r, \theta) = c_0.$$

再由 (43) 式得

$$g = e^{-U(R_0)/kT}.$$

将这个结果代到 (47) 式中, 得

$$k_{\text{lim}} = 0,$$

这是理所当然的.

因此, 界溶比 g 是随 θ_a 的增大而减小的, k_{lim} 却随 θ_a 的增大而增大. 但计算机的计算结果表明^[20], 对于一定的作用位能 U , 当 θ_a 增大到某个范围, 即 $\theta_a > \Theta$ 后, g 值就减小到某一定的限度, 并使

$$g_{\theta_a > \Theta} \ll e^{-U(R_0)/kT}.$$

于是 (47) 式就可以写成:

$$k_{\text{lim}|\theta_a > \Theta} \approx \frac{4\pi D}{\int_{R_0}^{\infty} e^{U(r)/kT} \frac{dr}{r^2}}, \quad (51)$$

即当 $\theta_a > \Theta$ 后, k_{lim} 随 θ_a 的变化就可以忽略不计了¹⁾.

1) 注意: (51) 式虽然与 Debye 公式 (50) 在形式上一样, 但所描述的物理图象却完全不同 (除 $\theta_a = \pi$ 外). Debye 公式所描述的是球形对称扩散, 而 (51) 式所描述的仍然是非球形对称扩散. 按照 Debye 图象, $g = 0$. 而按照 (51) 式的图象, g 在 $\ll e^{-U(R_0)/kT}$ 的前提下, 仍可能 > 1 , 甚至还可能 $\gg 1$, 虽然这时活性部位的表面积 S_{θ_a} 较小, 但其附近底物分子的浓度梯度却较大, 这就产生了较大的扩散流密度, 使扩散总量 I 几乎与整个酶分子表面都是活性部位时差不多了.

Θ 的大小取决于分子引力的大小。计算机的计算结果进一步表明, 分子引力愈大, Θ 就愈小。而且这种情况是随引力场的增加而急剧变化的。这是由于底物分子流密度 i 是随作用位能 U 的指数形式变化的缘故(见 27 式)。图 8 标出了碳酸酐酶与底物的 Van der Waals 结合位能 $U_{\text{van}}(R_0)$ 分别取 -6 千卡/克分子, -4.2 千卡/克分子, -3 千卡/克分子和 0 (即没有力场)时, 计算得到 k_{lim} 随 θ_a 的变化曲线^[20]。从图 8 中可看到, 对 $U_{\text{van}}(R_0) = -6$ 千卡/克分子

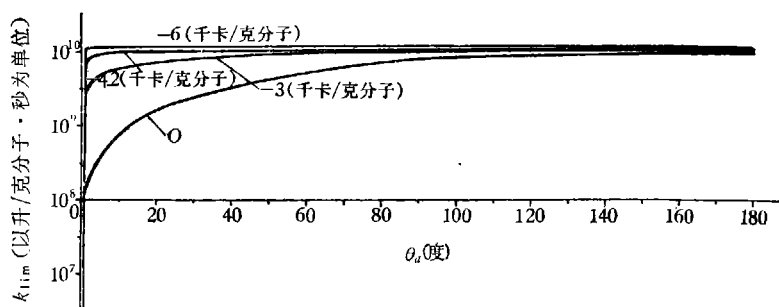


图 8 k_{lim} 随 θ_a 的变化曲线

子, 当 $\theta_a > \Theta \approx 1^\circ$ 时, k_{lim} 就几乎不随 θ_a 而变; 对 $U_{\text{van}}(R_0) = -4.2$ 千卡/克分子, 要 $\theta_a > \Theta \approx 10^\circ$ 时才这样; 对 $U_{\text{van}}(R_0) = -3$ 千卡/克分子, 却要 $\theta_a > \Theta \approx 58^\circ$ 时, k_{lim} 才几乎不随 θ_a 而变; 而对 $U_{\text{van}}(R_0) = 0$, k_{lim} 几乎一直随 θ_a 到 π 而变化。

换句话说, 对相当于碳酸酐酶这样大的酶分子, 当它与中性小底物的 $U_{\text{van}}(R_0) = -6$ 千卡/克分子时, 活性中心的表面积(见 15 式)只要取 $S_{\theta_a} > S_\Theta = 4\pi R_0^2 \sin^2 \frac{\Theta}{2} \approx 0.42 \text{ \AA}^2$, k_{lim} 就能达到 10^{10} 升/克分子·秒的数量级了; 当 $U_{\text{van}}(R_0) = -4.2$ 千卡/克分子时, 要 $S_{\theta_a} > S_\Theta \approx 38 \text{ \AA}^2$ 才这样; 当 $U_{\text{van}}(R_0) = -3$ 千卡/克分子时, 却要 $S_{\theta_a} > S_\Theta \approx 1182 \text{ \AA}^2$; 而当 $U_{\text{van}}(R_0) = 0$ 时, 几乎要整个酶分子表面都是活性中心, 即要 $S_{\theta_a} \approx 5000 \text{ \AA}^2$, k_{lim} 才能达到 10^{10} 升/克分子·秒的数量级。

2. 定义 R^* 为扩散控制等价反应球半径, 即

$$R^* = \frac{1}{\int_{R_0}^{\infty} e^{U(r)/kT} \frac{dr}{r^2}} \left[1 - g e^{U(R_0)/kT} \cos^2 \frac{\theta_a}{2} \right]. \quad (52)$$

代入 (47) 式, 得

$$k_{\text{lim}} = 4\pi D R^*. \quad (53)$$

这样, 在形式上就与 Smoluchowski 公式完全一致。这说明当存在方向因素与力场因素时, 若仍要用 Smoluchowski 公式的形式来计算 k_{lim} , 就不能象通常所采用的方法^[1, 2, 13, 14]那样, 简单地用酶的活性半球半径与底物分子半径之和 r_0 (见 (11) 式) 的一半来代入, 而应该用 (52) 式中所定义的扩散控制等价反应球半径 R^* 代进去。对于碳酸酐酶, 根据前面的计算, $\theta_a \approx 20^\circ$, 又从图 8 中我们看到, 只要它与底物的 Van der Waals 结合位能 $U_{\text{van}}(R_0)$ 超过 -4 千卡/克分子时, 条件 $\theta_a > \Theta$ 总可满足。因此, (52) 式括号内第二项可以略去。于是 R^* 就与酶分子球半径差不多, 甚至还大一些。这就解释了 Koenig 和 Brown^[1] 认为难以解释的为什么对碳酸酐酶和 H_2CO_3 的反应, 若用整个酶分子的球半径来计算, 所得的 k_{lim} 与实验所得的结果同一个

数量级, 而用活性半球半径来计算, 则所得的 k_{lim} 值要比实验结果小一个数量级的现象。换句话说, 对于碳酸酐酶, $R^* \sim R_0$ 可能是上述那种巧合现象的内在原因。

3. 值得指出, 在酶动力学的研究中, 在判断某种反应方式是否可能时, 有时把对应某种反应方式计算出来的 k_{lim} 值与实验所得的二级反应速度常数 k 进行比较, 以作为分析、判断这种反应方式是否可能的一种依据^[13, 14]。一般讲, 对应那种 k_{lim} 比实验所得的 k 还要小的反应方式, 总是毫无疑问地加以否定的。现在看来, 按照过去的公式计算, 是把 k_{lim} 值估计低了。因此, 若单凭这种原因而被否定的反应方式, 似应用 (48) 式来重新加以考虑。

4. 有趣的是, (48) 式中的 k_{lim} 除了与活性中心的大小 θ_a 有关外, 还与 R_0 , $U(r)$ 有关。而后者是直接与酶分子的大小、结构、性质有关的。这样, 活性中心的大小以及大蛋白体的大小、结构、性质与 k_{lim} 的关系, 在 (48) 式中就得到了全面的反映。这也就从酶的扩散控制反应速率的角度, 论证了酶分子活性中心以外的大蛋白体的大小、结构、性质对酶的催化速率是有影响的¹⁾。

附 录

这里我们来证明文章中 (18) 式化到 (19) 式时略去了 $m \frac{d^2 \langle \mathbf{r} \rangle}{dt^2}$ 项的合理性。

考虑方程

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -\rho \frac{dx}{dt} + f(t). \quad (1)$$

当 $m \ll \rho$ 时, 若解出的结果与方程

$$0 = -\rho \frac{dx}{dt} + f(t) \quad (2)$$

的解足够接近, 则在处理 (1) 式那种类型的方程时, 就完全可以近似地将 $m \frac{d^2 x}{dt^2}$ 项略去。

事实上, 若将方程 (1) 改写成

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + a^2 \frac{dx}{dt} = \frac{f(t)}{m}, \quad (3)$$

式中 $a^2 = \frac{\rho}{m}$, 则方程 (3) 的解为:

$$x = c_1 + c_2 e^{-a^2 t} + \int_0^t [1 - e^{-a^2(t-\tau)}] \frac{f(\tau)}{\rho} d\tau, \quad (4)$$

式中 c_1, c_2 是待定常数。

在我们的情况下, $m \sim 10^{-21}$, $\rho \sim 10^{-8}$, $\frac{\rho}{m} = a^2 \gg 1$ 。因此, 除初始时刻的一瞬间外, 一般地 (4) 式可足够近似地写为

$$x = c_1 + \int_0^t \frac{f(\tau)}{\rho} d\tau, \quad (5)$$

这也是方程 (2) 的解。所以, 当 $m \ll \rho$ 时, 方程 (1) 与方程 (2) 在足够近似的程度上是等价的。

1) 关于 k_{lim} , R^* , g 与 $U(r)$, R_0 , θ_a 之间定量关系的详细计算结果与讨论, 可参阅资料 [20]。

参 考 资 料

- [1] Koenig, S. H. & Brown, R. D., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69** (1972), 2422.
- [2] Alberty, R. A. & Hammes, G. G., *J. Phys. Chem.*, **62** (1958), 154.
- [3] Debye, P., *Trans. Electrochem. Soc.*, **82** (1942), 265.
- [4] Smoluchowski, M. V., *Z. Physik Chem.*, **92** (1917), 129.
- [5] Fowler, R. H. & Guggenheim, E. A., *Statistical Thermodynamics*, 1939, Cambridge University Press.
- [6] Collins, F. C. & Kimball, G. E., *J. Colloid Sci.*, **4** (1949), 425.
- [7] Umberger, J. Q. & LaMer, V. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **67** (1945), 1099.
- [8] Williamson, B. & LaMer, V. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **70** (1948), 717.
- [9] Hodges, K. C. & LaMer, V. K., *ibid.*, **70** (1948), 722.
- [10] Sveshnikoff, B., *Acta Physiochim. U.R.S.S.*, **3** (1935), 257.
- [11] Collins, F. C., *J. Colloid Sci.*, **5** (1950), 499.
- [12] Collins, F. C. & Kimball, G. E., *Ind. Eng. Chem.*, **41** (1949), 2551.
- [13] DeVoe, H. & Kistiakowsky, G. B., *J. Amer. Chem. Soc.*, **83** (1961), 274.
- [14] Kernohan, J. C., *Biochem. Biophys. Acta.*, **96** (1965), 304.
- [15] Einstein, A., *Ann. Phys.*, **19** (1906), 371.
- [16] Lifshitz, E. M., *Sov. Phys. JETP*, **2** (1956), 73.
- [17] Langbein, D., *Phys. Rev. B.*, **2** (1970), 3371.
- [18] Mitchell, D. J. & Ninham, B. W., *J. Chem. Phys.*, **56** (1972), 1117.
- [19] Neurath, H., *The Proteins*, II, 1964, Academic Press, New York, 282.
- [20] 李子才、周国城，酶——底物反应体系的特征参量与扩散控制反应速率间定量关系的研究，I. 中性底物，生物化学与生物物理学报，待发表。