

底物中的硅原子对酶反应的影响*

宗敏华 程 潜

(华南理工大学生物工程系 广州 510641)

关键词 有机硅化合物, 马肝醇脱氢酶, 脂肪酶

分类号 Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(1999)01-0120-23

在酶工程学的研究史上,人们一方面不断地研制开发新的酶种;一方面利用固定化、酶分子改造和修饰等技术来提高酶的活性和稳定性;另一方面,则不断地开拓酶的新用途。酶催化非天然化合物的生物合成和转化(正是这一方面研究的新进展)。由于有机硅化合物在有机合成,尤其是不对称合成中占有较重要的地位^[1],并且,近年来的研究表明,许多有机硅化合物具有特殊的生物学活性,其作为药物,较其碳结构类似物有更强的药效、更高的选择性及更低的毒性^[2],酶催化有机硅化合物的生物合成与转化成为该领域的研究热点。作者曾报道过醇脱氢酶及脂肪酶能催化有机硅烷醇的脱氢及酯化反应^[3-5]。本文通过对比研究酶催化有机硅烷醇及其碳结构类似物的脱氢、酯化及转酯反应,探讨底物中的硅原子对酶催化反应的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

马肝醇脱氢酶(HLADH), *Candida cylindracea* 脂肪酶(CCL)购自 Sigma 公司。Lipozyme 为来源于 *Mucor miehei* 并固定化于大孔阴离子交换树脂的脂肪酶,由丹麦 Novo 公司赠送。三甲基硅烷基甲醇、2,2-二甲基丙醇、2-三甲基硅烷基乙醇、3,3-二甲基丁醇、(±)-1-三甲基硅烷基乙醇、(±)-3,3-二甲基-2-丁醇、(±)-2,2-二甲基-3-戊醇、(±)-4,4-二甲基-2-戊醇购自 Aldrich 公司;(±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇、(±)-2-三甲基硅烷基-1-丙醇、(±)-2,3,3-三甲基-1-丁醇、(±)-1-三甲基硅烷基-2-丙醇由日本京都大学田中渥夫教授赠送。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 水相 HLADH 催化脱氢反应活性:将含有 5% 四氢呋喃、15mmol/L 底物、0.588mmol/L NAD⁺ 的 3.3 mL Tris 缓冲液(50mmol/L, pH8.8)在 30℃ 下恒温 3min 后加入 0.1mL 酶液(1mg/mL)。迅速用岛津 MPS-200 紫外分光光度计测其在 340nm 处的吸光度增加速度,并据此计算酶催化反应的初速度 [$\Delta\epsilon = 6.22 \times 10^{-3} (\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]。

1.2.2 水相 HLADH 催化脱氢反应动力学:将 3.3mL 含有 1.2mmol/L NAD⁺, 1% 四氢呋喃和不同浓度底物的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH8.8)在 30℃ 恒温 3min 后,加入 0.4ml HLADH(3.4U/mL),迅速用分光光度法测反应初速度,作双倒数图得 K_m 和 V_{max} 。

1.2.3 水/有机溶剂两相系统中 HLADH 催化脱氢反应:将含有 10mmol/L 有机硅烷醇或其碳结构类似物的 10mL 正己烷与含有 10IU HLADH, 20mmol/L α -酮戊二酸(二钠盐)、20mmol/L 醋酸铵、20IU 谷氨酸脱氢酶(GDH)的 10mL Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH8.8)混合,30℃ 恒温搅拌 30min 后,加入

* 国家自然科学基金资助项目(No. 29206039)和广东省自然科学基金资助项目(No. 950267)。

收稿日期:1998-01-23, 修回日期:1998-10-10。

0.2 μ mol NAD⁺ 于水相,继续于 30℃ 恒温搅拌,定时取样供气相色谱分析用。

1.2.4 脂肪酶催化酯化反应: 在 50ml 带塞三角瓶中装入 10mL 含有 10mmol/L 有机硅烷醇或其碳结构类似物、10mmol/L 戊酸的水饱和正辛烷,加 5 μ L 正十五烷(内标)、50mg CCL 或 Lipozyme 于其中,在 35℃,120r/min 水浴振荡,定时取 0.1mL 反应液供气相色谱分析用。

表 1 底物中的硅原子对 HLADH 催化醇脱氢反应初速度的影响

Substrate	Relative activity/%	Relative position of(OH) ⁻ from silicon atom
Ethanol	100	—
Trimethylsilyl methanol	0	α -位
2,2-Dimethylpropanol	75	
2-Trimethylsilylethanol	209	β -位
3,3-Dimethylbutanol	146	
(\pm)-1-Trimethylsilyl-2-propanol	106	β -位
(\pm)-4,4-Dimethyl-2-pentanol	61	

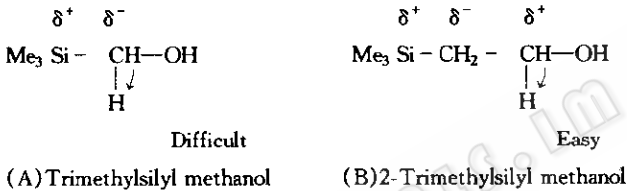


图 1 底物中硅原子对 HLADH 催化醇脱氢反应影响示意图

0.2mm;C-R7A 数字处理机;分析条件:气化室温度:250℃,检测室温度:250℃,柱温:80℃ 维持 2min 后,20℃/min 升温至 180℃;载气:氮气,流速:60mL/min;分流:1:100;进样量:0.5 μ L。

2 结果和讨论

2.1 对水相 HLADH 催化脱氢反应的影响

底物中的硅原子对水相 HLADH 催化有机硅烷醇及其碳结构类似物的脱氢反应的影响如表 1 所示。

可见,底物中的硅原子对反应初速度的影响因其与 OH⁻ 基的相对位置不同而异。由于硅原子的由负性较碳原子低,它能稳定其 α -位碳原子的负电荷及 β -位碳原子的正电荷^[6],三甲基硅烷基甲醇的碳原子周围的电子密度高于其碳结构类似物,这就使得 HLADH 催化的醇脱氢反应过程的第一步—H⁻ 脱离碳原子的难度更大,故 HLADH 不能催化三甲基硅烷基甲醇的脱氢,尽管其碳结构类似物 2,2-二甲基丙醇是 HLADH 的

1.2.5 脂肪酶催化转酯反应: 在 50mL 带塞三角瓶中装入 10mL 含有 10mmol/L 有机硅烷醇或其碳结构类似物、10mmol/L 丁酸正戊酯的水饱和正辛烷,加 5 μ L 正十五烷(内标)、50mg CCL 或 Lipozyme 于其中,在 35℃,120r/min 水浴振荡,定时取 0.1mL 反应液供气相色谱分析用。

1.2.6 酶催化转酯反应动力学参数测定: 在脂肪酶及丁酸正戊酯过量的条件下,测定对应于不同醇浓度的转酯反应初速度,作双倒数图,并据此得出酯过量时的反应动力学参数。

1.2.7 气相色谱分析: 仪器:日本岛津 GC-14B 气相色谱仪;PEG-20 极性毛细管柱,柱长 25m,柱径

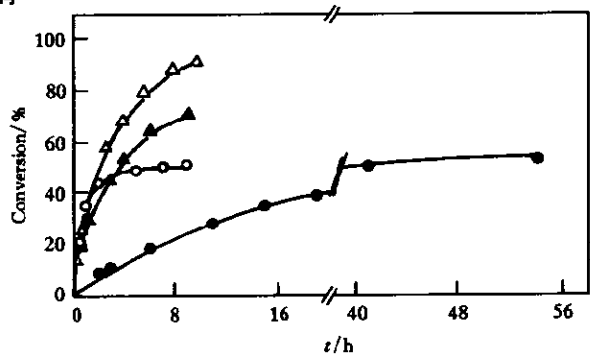


图 2 水/有机溶剂两相系统中 HLADH 催化脱氢反应的过程曲线

●, 4,4-dimethyl-2-pentanol; ○, 1-trimethylsilyl-2-propanol;
▲, 2,3,3-trimethyl-1-butanol; △, 2-trimethylsilyl-1-propanol

良好底物。反之,与 3,3-二甲基丁醇相比, H⁻ 更易于从 2-三甲基硅烷基乙醇的 β-碳原子脱离,故 HLADH 催化 2-三甲基硅烷基乙醇的脱氢速度大大高于其碳结构类似物 3,3-二甲基丁醇(图 1)。

2.2 对两液相系统中 HLADH 催化脱氢反应的影响

底物中的硅原子对水/有机溶剂两相系统中 HLADH 催化脱氢反应有较大的影响(图 2)。

对所研究的两组底物,硅原子的存在均使反应加速。因为 OH⁻ 基均位于 Si 原子的 β 位,同时,三甲基硅烷基的疏水性大于特丁基^[7],这就使得有机硅烷醇与疏水性酶活性中心之间的亲和力大于其碳结构类似物(表 2)。

表 2 HLADH 催化脱氢反应的动力学参数

Substrate	$K_m/(mmol/L)$	$V_{max}/(\mu mol/min)$
(±)-1-Trimethylsilyl-2-propanol	2.92	0.461
(±)-4,4-Dimethyl-2-pentanol	15.70	0.055
(±)-2-Trimethylsilyl-1-propanol	4.62	0.329
(±)-2,3,3-Trimethyl-1-butanol	7.45	0.462

2.3 对有机相脂肪酶催化酯化反应的影响

底物中的硅原子对不同来源的脂肪酶催化酯化反应速度的影响见表 3。本研究中的大多数有机硅烷醇较其碳结构类似物为脂肪酶更好的底物。底物中硅原子对酶催化酯化反应速度的影响还因脂肪酶来源的不同而有所不同,这是不同来源的脂肪酶的活性中心结构有一定的差异之故。

2.4 对有机相脂肪酶催化转酯反应的影响

与酶催化酯化反应相类似,大多数有机硅烷醇的反应性比其碳结构类似物强(表 4),这主要是因为有机硅烷醇的疏水性比其碳结构类似物大,对脂肪酶的活性中心有较大的亲和力。酯过量时,脂肪酶对(±)-1-三甲基硅烷基乙醇及其碳结构类似物(±)-3,3-二甲基-2-丁醇的 K_m 值(表 4)证明了以上假设的正确性。

表 3 底物中的硅原子对脂肪酶催化酯化反应转化率的影响

Substrate	C/ %	
	CCL	Lipozyme
2-Trimethylsilylethanol	85.0	86.3
3,3-Dimethylbutanol	83.8	86.6
(±)-1-Trimethylsilyl ethanol	49.8	27.0
(±)-3,3-Dimethyl-2-butanol	20.0	23.7
(±)-1-Trimethylsilyl-1-propanol	23.2	23.0
(±)-2,2-Dimethyl-3-pentanol	15.4	22.0
(±)-1-Trimethylsilyl-2-propanol	13.5	15.0
(±)-4,4-Dimethyl-2-pentanol	14.8	10.2

Reaction time: 72h

表 4 底物中硅原子对酶催化转酯反应转化率的影响

Substrate	C/ %	
	CCL	Lipozyme
2-Trimethylsilyl ethanol	45.1	60.1
3,3-Dimethyl butanol	46.8	42.2
(±)-1-Trimethylsilyl ethanol	35.4	34.0
(±)-3,3-Dimethyl-2-butanol	15.8	16.0
(±)-1-Trimethylsilyl-1-propanol	24.7	11.0
(±)-2,2-Dimethyl-3-entanol	14.7	10.0
(±)-1-Trimethylsilyl-2-propanol	18.1	10.1
(±)-4,4-Dimethyl-2-pentanol	13.1	4.5

Reaction time: 72h

表 5 酯过量时脂肪酶催化转酯反应的表现动力学参数

Substrate	CCL		Lipozyme	
	$K_m/(mmol/L)$	$V_{max}/(mmol/L \cdot h)$	$K_m/(mmol/L)$	$V_{max}/(mmol/L \cdot h)$
(±)-1-Trimethylsilylethanol	17.8	7.14	8.33	6.67
(±)-3,3-Dimethyl-2-butanol	33.3	9.09	29.4	8.33

底物中的硅原子不仅影响酶催化反应速度,而且也酶反应的立体选择性有显著的影响,作者将另撰文报道有关的研究结果。

参 考 文 献

- [1] I. Fleming. *Chem. Soc. Rev.*, 1981, 10:83~111.
- [2] R. Tacke, H. Zilch. *Endeavour*, 1986, 10:191~197.
- [3] T. Fukui, M. H. Zong, T. Kawamoto *et al.* *Appl. Microb. Biotechnol.*, 1992, 38:209~213.
- [4] A. Tanaka, T. Fukui, M. H. Zong *et al.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 672:431~435.
- [5] 邱树毅,姚汝华,宗敏华. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23:369~372.
- [6] E. Colvin. Butterworth, London:1981.
- [7] R. Fessenden, J. S. Fessenden. *Adv. Organomet. Chem.*, 1980, 16:275~299.

Effect of Silicon Atom in Substrates on Enzymatic Reactions*

Zong Minhua Cheng Qian

(*Biotechnology Dept. South China University of Technology, Guangzhou 510641*)

Abstract The effect of silicon atom in substrates on enzymatic reactions was examined by comparative study of HLADH-catalysed dehydrogenation and lipase-catalysed esterification and transesterification of organosilyl alcohols and their carbon analogues. The silicon atom in different substrates affects enzymatic reactions quite differently. The results obtained were interpreted on the basis of the characteristics of silicon atom.

Key words Organosilicon compounds, horse liver alcohol dehydrogenase, lipase

* Project Granted by Chinese national Natural Science Fund(No. 29206039)and Project Granted by Guangdong provincial Natural Science Fund(No. 950267)。