

有机相中酶促有机硅烷醇的转酯^{*}

宗敏华 程 潜 林 影

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

摘要 在有机介质中, 脂肪酶 L-1754 可以催化非天然有机硅烷醇与脂肪酸酯的转酯反应. 反应介质、反应体系水活度和底物的结构对酶促转酯反应有显著的影响. 适宜的反应介质为正辛烷, 反应体系最适水活度为 0.55.

关键词 有机相, 脂肪酶, 有机硅烷醇, 转酯反应

学科分类号 Q556.1

酶促非天然化合物的合成是酶学研究领域的新发展. 具有 Si-C 结构的有机硅化合物是一类非天然的人工合成物质, 在有机合成方面占有非常重要的地位^[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, 比碳结构类似物有更佳的药效、更高的选择性和更小的毒性, 硅替换是药物设计的一条有效途径^[2]. 研究酶促有机硅化合物生物转化, 不但可提供酶识别非天然物质的有关信息, 丰富酶学理论, 拓展酶的应用范围, 而且为生物合成有可能成为高效低毒药物的有机硅化合物奠定基础. 90 年代初以来, 人们相继报道了醇脱氢酶及脂肪酶催化有机硅烷醇的脱氢和酯化^[3~8]. 迄今, 尚未见酶促有机硅化合物转酯的报道. 本文研究了有机相中脂肪酶 L-1754 催化有机硅烷醇与脂肪酸酯的转酯反应, 并就底物结构、有机溶剂特性、反应体系水活度等对该反应的影响进行了初步的探索.

1 材料和方法

1.1 材料

脂肪酶 L-1754, 来源于 *Candida cylindracea*, 购自 Sigma 公司; (±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇、(±)-1-三甲基硅烷基-2-丙醇, 日本京都大学田中研赠送; (±)-1-三甲基硅烷基乙醇、2-三甲基硅烷基乙醇购自 Aldrich 公司; 其他药品为市售分析纯.

1.2 方法

1.2.1 酶促反应: 在 50 ml 带塞三角瓶中装入 10 ml 含有 10 mmol/L 有机硅烷醇、10 mmol/L 脂肪酸酯的有机溶剂, 加 5 μl 正十五烷 (内标)、50 mg L-1754 于其中, 在 35℃, 120 r/min 水浴振荡, 定时取反应液供气相色谱仪分析用. 根据底物有机硅烷醇的减少计算酶促反应的转化率.

1.2.2 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 25 mmol/L, 柱径 0.2 mm; 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 2 min 后, 20℃/min 升温至 180℃; 载气: 氮气, 流速: 60 ml/min; 分流: 1:100; 进样量: 0.5 μl.

1.2.3 有机溶剂脱水: 用 3A 分子筛和无水氯化钙吸附除去有机溶剂中的水分得到脱水有机溶剂.

1.2.4 水活度控制: 用无机盐饱和溶液气相平衡法^[9]控制反应体系的水活度. 转酯反应前, 将酶冷冻干燥后, 与底物、反应介质一起置于密闭容器中, 与不同盐的饱和水溶液气相平衡 72 h, 使酶及反应介质的水活度与饱和盐水溶液的水活度相同.

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶促有机硅烷醇的转酯反应

在水饱和的正辛烷中, 脂肪酶 L-1754 催化 (±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇与丁酸乙酯的转酯反应过程曲线如图 1 所示. 可见, 该脂肪酶能够催化

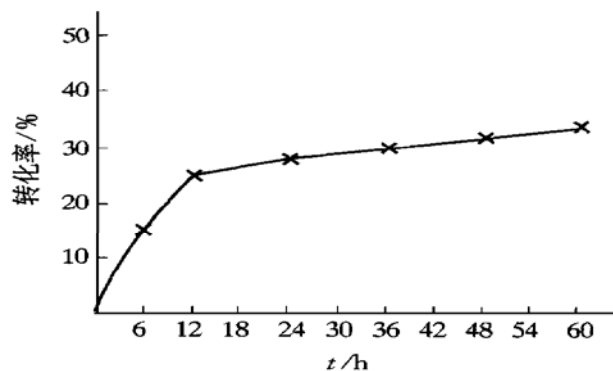


图 1 脂肪酶 L-1754 促 (±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇与丁酸乙酯的转酯反应过程曲线

^{*} 国家自然科学基金 (29206039) 及广东省自然科学基金资助项目 (950267).

收稿日期: 1998-01-23, 修回日期: 1998-06-29

有机硅烷醇与脂肪酸酯的转酯反应. 反应 6 h 内, 转化率随反应时间增加直线上升, 以后酶促反应速度下降, 到 48 h, 转化率达 32.0%.

2.2 有机溶剂特性对转酯反应的影响

酶是一种具有催化功能的蛋白质. 这种功能是肽链特定折叠, 或肽链具有构象的结果. 为了维持酶的活性构象, 必须在酶分子表面有一个水化层. 而有机溶剂往往会剥离酶分子表面的必需水化层, 导致酶分子直接与有机溶剂接触而变性、失活. 因亲水性溶剂比疏水性溶剂剥离水化层的能力要大, 一般认为, 当用疏水性溶剂作为反应介质时, 酶还可具较高的活性. Lanne 等用有机溶剂在正辛醇与水中的分配系数 (P) 的对数值 ($\lg P$) 来表示溶剂的疏水性^[8]. 本研究选用四种疏水性不同的溶剂作转酯反应介质 (溶剂的疏水性见表 1). 从图 2 可知, 随着溶剂疏水性的增大, 酶促反应转化率增大. L-1754 在亲水性最强的四氢呋喃中完全失活, 而在疏水性最强的正辛烷中表现出最强的催化活性.

表 1 溶剂的疏水性				
溶剂	四氢呋喃	甲苯	正己烷	正辛烷
$\lg P$	0.49	2.5	3.5	4.5

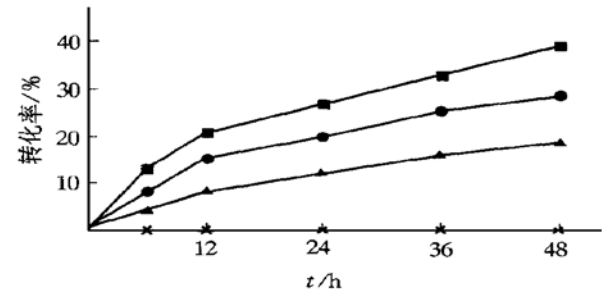


图 2 反应介质的疏水性对酶促转酯反应的影响
反应时间: 72 h; 底物: (±)-1-三甲基硅烷基乙醇, 丁酸正戊酯; 反应介质: 脱水有机溶剂. x—x: 四氢呋喃; ▲—▲: 甲苯; ●—●: 正己烷; ■—■: 正辛烷.

2.3 水活度对酶促转酯反应的影响

酶蛋白的水化作用是酶催化活性构象稳定的重要因素. 没有水, 酶的催化作用不可能发生. 一般说来, 用有机溶剂替代水, 将破坏酶的活性构象, 从而导致酶变性失活. 为维持酶的活性, 分子表面需要有一层与酶紧密结合的水, 作为酶微环境的基本组成, 这一水化层将酶分子与大量可能使酶失活的反应介质隔离开来. 然而, 过量水的存在将导致酶的稳定性下降, 这是因为酶在水相中的“刚性”比其在有机相中的“刚性”小. 为了揭示反应体系

的水活度对酶促转酯反应的影响规律, 作者比较了在不同水活度的反应体系中的转酯反应 (图 3). 图 3 表明, 当体系的水活度较低时, 酶促反应速度随体系水活度的增加而迅速增加, 水活度超过 0.55 后, 反应速度受水活度的影响较小. 考虑到增加水活度对酶稳定性的影响, 该反应体系的水活度以 0.55 左右为宜.

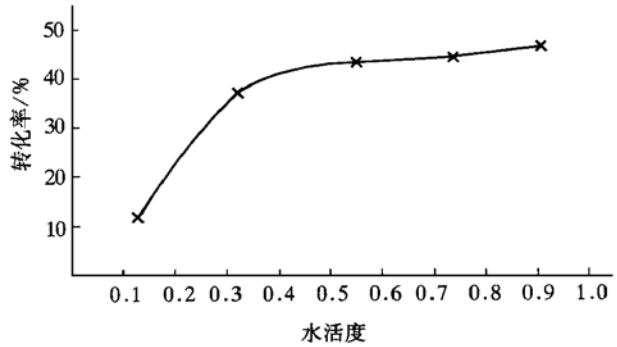


图 3 水活度对酶促转酯反应的影响
反应时间: 72 h; 底物: (±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇, 丁酸正戊酯; 反应介质: 正辛烷.

2.4 有机硅烷醇结构对酶促转酯反应的影响

一般认为, 脂肪酶对底物有很强的特异性, 为了研究 L-1754 对有机硅烷醇的特异性, 比较了在水饱和的正辛烷中其催化 (±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇、(±)-1-三甲基硅烷基-2-丙醇、(±)-1-三甲基硅烷基乙醇和 2-三甲基硅烷基乙醇与丁酸正戊酯的转酯反应, 结果如表 2. 当有机硅烷醇的碳链较长时, 由于空间障碍, 酶促转酯反应速度下降, 在相同的反应时间 72 h 内, 三甲基硅烷基乙醇为底物时的转化率大大高于三甲基硅烷基丙醇为底物时的转化率. 碳链长度相同, 羟基在 α 位形成的有机硅烷醇羟基负离子更稳定, 更有利于其向酰基酶复合物中间体的亲核进攻, 生成新的酯, 因而 (±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇的反应性强于 (±)-1-三甲基硅烷基-2-丙醇. 2-三甲基硅烷基乙醇的转化率比 (±)-1-三甲基硅烷基乙醇高, 这是因为后者是手性化合物, 而所用的酶具有一定的立体选择性.

表 2 有机硅烷醇结构对酶促转酯反应的影响	
底物	转化率/ %
(±)-1-三甲基硅烷基-2-丙醇	18.1
(±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇	24.7
2-三甲基硅烷基乙醇	45.1
(±)-1-三甲基硅烷基乙醇	35.4

2.5 底物酯的碳链长对酶促转酯反应的影响

底物酯的碳链长短对 L-1754 促转酯反应有显著的影响 (表 3)。丁酸乙酯为酰基供体时的转化率高与丙酸乙酯为酰基供体时的转化率。这是因为, 随着脂肪酸酯碳链的加长, 其疏水性增大, 故与脂肪酶疏水性活性中心之间的亲和力增大, 导致酶促反应速度的提高。然而随着碳链的进一步加长, 酶促反应速度下降。这是酶促反应的空间障碍随着底物分子碳链加长而增大的结果。

表 3 底物酯的碳链长对酶促转酯反应的影响

底物	转化率/%			
	丙酸乙酯	丁酸乙酯	戊酸乙酯	己酸乙酯
(±)-1-三甲基硅烷基-1-丙醇	23.0	34.0	14.5	10.0
(±)-1-三甲基硅烷基-2-丙醇	11.0	15.2	4.5	2.1

介质: 水饱和正辛烷; 反应时间: 48 h.

参 考 文 献

- 1 Colvin E W. Silicon Reagents in Organic Synthesis. New York: Academic press, 1988. 1~5
- 2 Tacke R, Zilch H. Sila-substitutions—a useful strategy for drug design. Endeavour, New Series, 1986, 10 (4): 191~197
- 3 Zong M H, Fukui T, Kawamoto T, *et al.* Bioconversion of organosilicon compounds by horse liver alcohol dehydrogenase: The role of the silicon atom in enzymatic reactions. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, 36 (1): 40~43
- 4 Fukui T, Zong M H, Kawamoto T, *et al.* Kinetic resolution of organosilicon compounds by stereoselective dehydrogenation with horse liver alcohol dehydrogenase. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 38 (2): 209~213
- 5 Uejima A, Fukui T, Fukusaki E, *et al.* Efficient kinetic resolu-

tion of organosilicon compounds by stereoselective esterification with hydrolases in organic solvent. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 38 (4): 482~486

- 6 Tanaka A, Fukui T, Zong M H, *et al.* Bioconversion of nonnatural organic compounds: esterification and dehydrogenation of organosilicon compounds. Ann N Y Acad Sci, 1992, 672: 431~435
- 7 Fukui T, Kawamoto T, Tanaka A. Enzymatic preparation of optically active silyl-methanol derivatives having a stereogenic silicon atom by hydrolase-catalyzed enantioselective esterification. Tetrahedron: Asymmetry, 1994, 5 (1): 73~82
- 8 邱树毅, 姚汝华, 宗敏华 (Qiu S Y, Yao R H, Zong M H). 固定化脂肪酶催化有机硅烷醇的酯化反应. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1996, 23 (4): 369~372
- 9 Lanne C, Boeren S, Vos K, *et al.* Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol Bioeng, 1987, 30 (1): 81~87

Transesterification of Organosilyl Alcohol Catalyzed by Lipase in Organic Phase. ZONG Min-Hua, CHENG Qian, LIN Ying (Department of Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China).

Abstract Transesterification of non-natural trimethylsilyl alcohol with fatty ester in organic phase could be catalyzed by lipase from *Candida cylindracea*. The transesterification reaction was apparently affected by the hydrophobicity of reaction medium, the water activity of the reaction system and the structure of the substrates. n-Octane was found to be the best medium for the reaction and the optimum water activity for the reaction is about 0.55.

Key words organic phase, lipase, organosilyl alcohol, transesterification

RNA 的错误剪接影响转基因的表达

卢一凡 田 毅¹⁾ 邓继先 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 利用 PCR 扩增方法获得 1.5 kb 人粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 基因组基因, 将其受控于 2.6 kb 的鼠乳清蛋白 (WAP) 基因的启动子下, 构建成乳腺表达载体。通过显微注射方法建立转基因鼠, PCR 及 DNA 印迹鉴定证实获得两只转基因阳性鼠。在其乳腺表达出极低的 G-CSF。为探讨低表达的原因, 采用 RT-PCR 方法, 从转基因鼠乳腺获得 G-CSF cDNA, 序列分析表明, 其 RNA 剪接出现错误, 将其第四外显子识别为内含子, 由此导致其低水平表达。

关键词 转基因鼠, 低表达, 粒细胞集落刺激因子, RNA 剪接

学科分类号 Q78

¹⁾中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100071. 收稿日期: 1998-02-23, 修回日期: 1998-06-05