

马肝醇脱氢酶催化有机硅酮不对称还原反应动力学*

娄文勇** 宗敏华 王菊芳 吴 虹

(华南理工大学生物工程系, 广州 510640)

摘要 探讨了马肝醇脱氢酶 (HLADH) 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应动力学。结果表明, 在酶浓度低于 150 mg/L 时, 底物浓度与反应初速度的关系符合米氏动力学方程; HLADH 催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的 K_m 、 v_{max} 和 E_a 分别为 2.67 mmol/L、0.118 mmol/(L·min·mg) 和 37 kJ/mol, 其碳结构类似物的相应值分别为 3.56 mmol/L、0.084 mmol/(L·min·mg) 和 61 kJ/mol。

关键词 马肝醇脱氢酶, 三甲基硅乙酮, 不对称还原, 动力学, 活化能

学科分类号 Q556.1

有机硅化合物是一类非天然的化合物, 其在有机合成中占有非常重要的地位。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, 作为药物, 比碳结构类似物有更佳药效、更高的选择性和更低的毒性^[1]。由于有机硅化合物在诸多领域的重要性及酶催化的显著优势, 酶催化有机硅化合物的不对称生物合成与转化, 已成为近年来有机化学家及生物学家们的研究热点之一。20 世纪 90 年代初, Zong 等^[2]报道了马肝醇脱氢酶 (HLADH) 催化有机硅醇的脱氢反应, Fukui 等^[3]进一步用马肝醇脱氢酶在水/有机溶剂两相介质中, 通过对映体选择性脱氢反应, 对外消旋有机硅醇进行了动力学拆分。随后, 酶催化有机硅醇的酯化、转酯及含硅酯、含硅酰胺水解的报道相继出现^[4-8]。展现了酶催化有机硅化合物生物合成, 尤其是不对称合成的诱人前景。然而现有的研究仅限于探索各种酶催化某一类型的有机硅化合物生物转化的可能性, 或通过反复实验构建适宜的酶催化反应体系, 实现某一特定有机硅化合物的生物转化, 对有关的基础理论问题则涉猎很少。迄今, 国内外尚未见醇脱氢酶催化有机硅酮不对称还原反应动力学的研究报道。本文探讨了 HLADH 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应动力学, 以加深对酶催化有机硅化合物不对称还原过程的认识。

1 材料与方法

1.1 试剂

马肝醇脱氢酶 (HLADH) 购自 Sigma 公司; 还原辅酶 I (二钠盐) (NADH) 购自上海波奥生物科

技有限公司; 三甲基硅乙酮 (acetyltrimethylsilane, 97%) 购自 Aldrich 公司; 3, 3-二甲基-2-丁酮 (3, 3-dimethyl-2-butanone, 98%) 购自 Fluka 公司; 其他化学试剂均为市售分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 HLADH 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应动力学: 在 8 个 50 ml 带塞的三角瓶中将含有 1% 四氢呋喃 (THF)、不同浓度 (2、4、6、8、10、12、14、16 mmol/L) 底物、0.18 mmol/L NADH 的 3.4 ml 磷酸缓冲液 (pH=6.8) 于 30℃ 预热 3 min 后, 加入 0.1 mg HLADH (1.7 U/mg), 迅速混合均匀并用紫外分光光度计测其在 $\lambda=340$ nm 处的吸光度变化, 并据此计算酶催化反应的初速度。作反应初速度 v_0 与底物浓度 c_s 的 Lineweaver-Burk 双倒数图得 K_m 和 v_{max} ($\Delta\epsilon_{340}=6.22\times10^{-3}\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。

1.2.2 HLADH 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应的活化能: 在 2 个 50 ml 带塞的三角瓶中分别将含有 1% 四氢呋喃 (THF)、10 mmol/L 三甲基硅乙酮或 3, 3-二甲基-2-丁酮、0.18 mmol/L NADH 的 3.4 ml 磷酸缓冲液 (pH=6.8) 于不同温度 (30℃、25℃、20℃、15℃、10℃) 下, 恒温 30 min 后, 加入 0.26 U HLADH, 迅速混合均匀并倒入比色皿中, 立即用紫外分光光度计测反应初速度, 根据 Arrhenius 方程, 以 $\ln k$

* 国家自然科学基金 (20076019) 及广东省自然科学基金 (000444) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 020-87111452, E-mail: btmhzong@scut.edu.cn

收稿日期: 2002-11-08, 接受日期: 2002-12-28

对 $1/T$ 作图得一直线, 由其斜率求得此反应的活化能.

2 结果与讨论

2.1 酶浓度对反应初速度的影响

在酶浓度 (ρ_e) 低于 150 mg/L (0.34 ml 中含有 0.5 mg 酶) 的反应体系中, HLADH 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应初速度均随酶浓度的增加而提高, 即酶浓度与反应初速度有良好的线性关系 (图 1), 故在此范围内可认为反应是由动力学控制的.

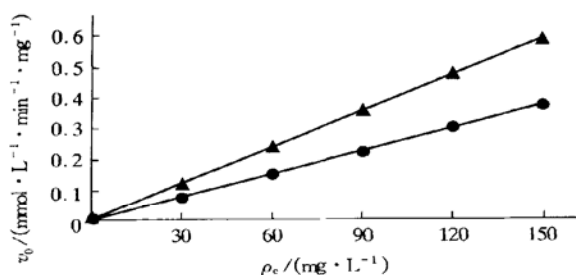


Fig 1 Effect of enzyme concentration on the initial reaction rate
reaction medium: 3.4 ml phosphate buffer (pH 6.8) containing 1% THF, 15 mmol/L acetyltrimethylsilane (or 3, 3-dimethyl-2-butanone, 0.18 mmol/L NADH). $t = 30^\circ\text{C}$. Δ — Δ : acetyltrimethylsilane; $\bullet$ — $\bullet$: 3, 3-dimethyl-2-butanone.

2.2 底物浓度与反应初速度的关系

由图 2 可知: 当三甲基硅乙酮的浓度小于 4 mmol/L 时, 反应初速度随底物浓度的增加而呈线

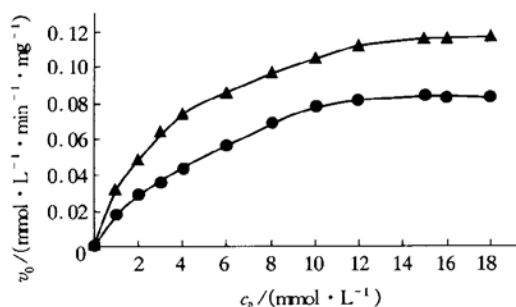


Fig 2 Effect of substrate concentration on the initial reaction rate
reaction medium: 3.4 ml phosphate buffer (pH 6.8) containing 1% THF, 0.18 mmol/L NADH, 0.1 mg HLADH; $t = 30^\circ\text{C}$. Δ — Δ : acetyltrimethylsilane; $\bullet$ — $\bullet$: 3, 3-dimethyl-2-butanone.

性急剧地增加, 当底物浓度大于 4 mmol/L 时, 其对反应初速度的影响变小. 当底物浓度达到 16 mmol/L 时, 反应初速度基本保持 0.117 mmol/(L·min·mg)

不变. 当其碳结构类似物的浓度低于 8 mmol/L 时, 反应初速度随底物浓度的增加迅速增加, 其后, 底物浓度对反应初速度的影响变小, 当底物浓度升高至 15 mmol/L 时, 反应初速度基本保持在 0.082 mmol/(L·min·mg) 不变. 由底物浓度 c_s 和反应初速度 v_0 的 Lineweaver-Burk 双倒数图可知 (图 3), HLADH 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应初速度与底物浓度的关系符合米氏动力学.

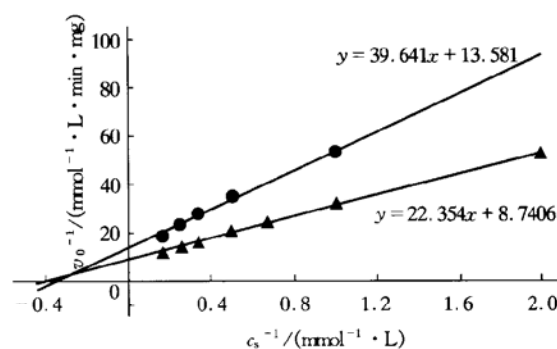


Fig 3 Reciprocal plot of initial reaction rate vs. substrate concentration

reaction medium: 3.4 ml phosphate buffer (pH 6.8) containing 1% THF, 0.18 mmol/L NADH, 0.1 mg HLADH; $t = 30^\circ\text{C}$. Δ — Δ : acetyltrimethylsilane; $\bullet$ — $\bullet$: 3, 3-dimethyl-2-butanone.

2.3 反应动力学常数

据图 3 两直线的斜率 ($K_m/v_{\max}$) 和截距 ($1/v_{\max}$) 可分别求得 HLADH 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应动力学参数 (K_m 、 $v_{\max}$). 表 1 说明, HLADH 催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的 K_m 比其碳结构类似物小, $v_{\max}$ 则反之, 即 HLADH 对三甲基硅乙酮的亲合力比对其碳结构类似物大, 所以三甲基硅乙酮是 HLADH 较好的底物. 这是由于硅原子的电负性较碳原子低, 且结合了 NADH 的 HLADH 有一个疏水性活性中心, 其与疏水性较强的三甲基硅乙酮有较强的亲和性, 故催化三甲基硅乙酮不对称还原反应速度较快.

2.4 反应活化能

为了进一步说明底物中的硅原子对酶反应的影响, 对比研究了 HLADH 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应的活化能. 根据 Arrhenius 公式 $k = k_{\max} \cdot e^{-E_a/(R \cdot T)}$ 或 $\ln(k/k_{\max}) = -E_a/(R \cdot T)$ (其中 k (s^{-1}) 为反应速度常数; $k_{\max}$ (s^{-1}) 为指前因子; E_a ($J \cdot mol^{-1}$) 为活化能; R ($8.314 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$) 为气体常数; T (K) 为绝

对温度), $\ln k$ 与 $1/T$ 线性关系的斜率为 $-E_a/R$, 故活化能可由相对反应速度 v (相对于 30 °C 下的

反应速度) 的对数对 $1/T$ 作图 (图 4) 所得直线的斜率计算得到.

Table 1 Kinetic parameters of HLADH catalyzed asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane and its carbon counterpart

Substrate	$K_m / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$v_{\max} / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$	$v_{\max} / K_m / (10^{-3} \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1})$
Acetyltrimethylsilane	2.67	0.118	44.19
3, 3-Dimethyl-2-butanone	3.56	0.084	32.81

通过计算, HLADH 催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应的活化能分别为 37 kJ/mol、61 kJ/mol. 可见, HLADH 催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的活化能比其碳结构类似物的相应值小很多.

乙酮受到硅原子的影响而比其碳结构类似物具有较强的疏水性, 易与 HLADH 的疏水活性中心结合, 是 HLADH 较好的底物, 故 HLADH 催化三甲基硅乙酮不对称还原反应的速度较快, 反应的活化能较低.

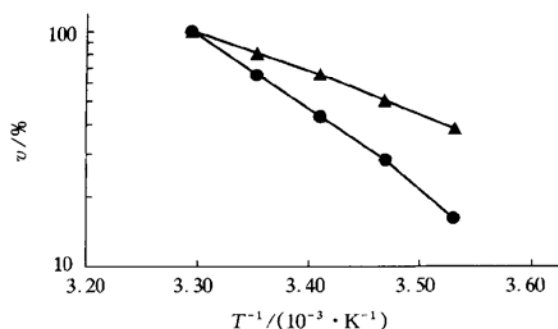


Fig. 4 Relative reaction rate vs. reciprocal reaction temperature
reaction medium: 3.4 ml phosphate buffer (pH 6.8) containing 1% THF, 10 mmol/L acetyltrimethylsilane (or 3, 3-dimethyl-2-butanone, 0.18 mmol/L NADH), 0.1 mg HLADH; The initial reaction rate at 30 °C is 100%. ▲ — ▲: acetyltrimethylsilane; ● — ●: 3, 3-dimethyl-2-butanone.

3 结 论

马肝醇脱氢酶催化三甲基硅乙酮及其碳结构类似物不对称还原反应均符合米氏动力学方程, 即 $v = 0.118 [S] / ([S] + 2.67)$ 和 $v' = 0.084 [S'] / ([S'] + 3.56)$ ($[S]$, $[S']$ 分别表示三甲基硅乙酮及其碳结构类似物的浓度), 但三甲基硅

参 考 文 献

- Colvin E W. Silicon Reagents in Organic Synthesis. New York: Academic Press, 1988. 1~ 5
- Zong M H, Fukui T, Kawamoto T, *et al.* Bioconversion of organosilicon compounds by horse liver alcohol dehydrogenase. Appl Microbiol Biotechnol, 1991, **36** (1): 40~ 43
- 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
- Tanaka A, Fukui T, Zong M H, *et al.* Bioconversion of non-natural organic compounds: esterification and dehydrogenation of organosilicon compounds. Ann N Y Acad Sci, 1992, **672**: 431~ 435
- 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
- 宗敏华, 程 潜, 林 影. 有机相中酶促有机硅烷醇的转酯. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26** (3): 259~ 261
- Zong M H, Cheng Q, Lin Y. Prog Biochem Biophys, 1999, **26** (3): 259~ 261
- Uejima A, Fukui T, Fukusaki E, *et al.* Efficient kinetic resolution of organosilicon compounds by stereoselective esterification with hydrolases in organic solvent. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, **38** (4): 482~ 486
- 邱树毅, 姚汝华, 宗敏华. 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, 1996, **23** (4): 369~ 372
- Qiu S Y, Yao R H, Zong M H. Prog Biochem Biophys, 1996, **23** (4): 369~ 372

Study on Kinetics of Asymmetric Reduction of Organosilyl Ketone Catalyzed by Horse Liver Alcohol Dehydrogenase^{*}

LOU Wei-Yong^{**}, ZONG Min-Hua, WANG Ju-Fang, WU Hong

(Biotechnology Department, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract The kinetics of asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane and its carbon analogue catalyzed by horse liver alcohol dehydrogenase were explored. It has been found that the relation between substrate concentration and initial reaction rate was in accordance with the Michaelis-Menten equation when enzyme concentration was below 150 mg/L and the K_m , v_{max} and E_a of HLADH-catalyzed asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane were 2.67 mmol/L, 0.118 mmol/(L·min·mg) and 37 kJ/mol respectively, while the corresponding parameters for its carbon analogue were 3.56 mmol/L, 0.084 mmol/(L·min·mg) and 61 kJ/mol.

Key words horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH), acetyltrimethylsilane, asymmetric reduction, kinetics, activation energy

^{*} This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (20076019) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (000444).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-20-87111452, E-mail: btmhzong@scut.edu.cn

Received: November 8, 2002 Accepted: December 28, 2002