

刘翠,邓雅珊,许慧,等.大豆荚膜过氧化物酶催化硫醚反应动力学模型[J].湖南科技大学学报(自然科学版),2022,37(4):110-118. doi:10.13582/j.cnki.1672-9102.2022.04.014

LIU C, DENG Y S, XU H, et al. Kinetic Model of Thioether Reaction Catalyzed by Soybean Pod Peroxidase[J]. Journal of Hunan University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2022, 37(4): 110-118. doi: 10.13582/j.cnki.1672-9102.2022.04.014

# 大豆荚膜过氧化物酶催化硫醚反应动力学模型

刘翠,邓雅珊,许慧,薛晓,李楷原,王繁业\*

(青岛科技大学 化工学院,山东 青岛 266042)

**摘要:**用大豆荚膜过氧化物酶(Soybean Pod Peroxidase, SPP)在微乳液中催化不对称氧化反应,在酶活性为3 200 U/mL, 50 ℃时反应5 h,产率为91.56%,对映体过量值为96.08%。SPP催化奥美拉唑硫醚不对称氧化反应生成S-奥美拉唑,其反应机制包括酶催化的SPP-I双电子还原反应、SPP-I单电子转移反应和非酶催化的化学反应。建立的动力学模型很好地拟合了试验数据,其平均相对偏差为5.44%。酶促反应动力学机制为带底物产物抑制的乒乓机制,而化学反应遵循幂律,过氧化氢产生底物抑制,S-奥美拉唑产生产物抑制。

**关键词:**动力学模型;大豆荚膜过氧化物酶;不对称亚砷氧化;手性亚砷;底物抑制

**中图分类号:**Q814.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9102(2022)04-0110-09

## Kinetic Model of Thioether Reaction Catalyzed by Soybean Pod Peroxidase

LIU Cui, DENG Yashan, XU Hui, XUE Xiao, LI Kaiyuan, WANG Fanyue

(College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

**Abstract:** In water-in-oil microemulsions the asymmetric oxidation catalyzed by soybean pod peroxidase (SPP) to form esomeprazole is carried out with the yield of 91.56% and e.e. of 96.08% at the activity of SPP of 3 200 U/mL, and 50 ℃ for 5 h. The mechanism with a two-electron reduction of SPP-I is accompanied with a single-electron transfer to SPP-I and nonenzymatic reactions. With 5.44% of the average relative deviation, a kinetic model fitting experimental data very well is developed. The enzymatic reactions may follow ping-pong mechanism with substrate inhibition of hydrogen peroxide and produce the inhibition of esomeprazole, while nonenzymatic reactions may follow a power law.

**Keywords:** kinetic model; soybean pod peroxidase; asymmetric oxidation; chiral sulfoxides; substrate inhibition

过氧化物酶是一种含有血红素的氧化还原酶,在过氧化氢(A)<sup>[1-2]</sup>的存在下,可以催化包括硫代胺、硫代茴香醚和酚类在内的各种有机化合物的氧化。大豆荚膜过氧化物酶(Soybean Pod Peroxidase, SPP)可以从大豆荚果中提取,大豆荚果是世界上产量非常高的天然资源之一,其产量远比可提取豆壳过氧化物酶(Soybean Hull Peroxidase, SHP)高。近年来,关于过氧化物酶催化氧化机理的报道很多。由过氧化氢键与硫

化物的异解裂解产生的氧从中间络合物转移的主要方式有 2 种<sup>[3]</sup>: (1) 两电子反应的一步氧转移机制; (2) 自由基阳离子中间体的两步氧转移机制<sup>[4]</sup>. 手性亚砷被广泛用作手性中间体、配体和药物, 如质子泵抑制剂 (Proton Pump Inhibitor, PPI). 具有手性亚砷结构的埃索美拉唑 ( $P_S$ ) 是奥美拉唑 ( $P$ ) 的 S-对映体, 用于治疗胃溃疡疾病. 手性亚砷现在主要采用化学方法合成, 这种方法存在着许多缺点, 尤其是对环境有危害. 采用单加氧酶可以催化不对称氧化反应, 但是需要昂贵的辅酶循环, 而过氧化物酶则不需要辅酶, 因此, 过氧化物酶催化的不对称亚砷氧化反应是制备手性亚砷的有效方法. 目前, 尚未见采用 SPP 催化不对称亚砷氧化法生产手性亚砷埃索美拉唑的报道.

目前, 已有研究人员对过氧化物酶催化硫醚氧化动力学开展了一些研究工作. Yang 等<sup>[4]</sup> 建立了 2 个初始速度方程, 但初始速度方程对动力学行为的描述显然不够; Fukuzumi 等<sup>[5]</sup> 建立了基于准一阶方程的简单动力学方程; Kong 等<sup>[6]</sup> 以水溶性离子液体为弱抑制剂, 对辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 催化氧化愈创木酚进行了研究, 建立了带非竞争性底物抑制的 Michaelis-Menten 方程.

本文试验在微乳液中进行, 采用 SPP 对奥美拉唑硫醚进行不对称亚砷氧化, 制备单一对映体 S-奥美拉唑, 对反应机理进行了探讨, 并尝试建立了不对称亚砷氧化反应动力学模型. 由于 SPP 不需要辅酶因子, 反应高效且成本低廉, 是一种有前景的绿色合成技术.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

奥美拉唑硫醚 (B) 购自中国济南沃德化工有限公司, 奥美拉唑 ( $P$ ) 和 S-奥美拉唑 ( $P_S$ ) 分别购自中国苏州维塔化工有限公司和山东寿光富康药业有限公司, 新鲜大豆豆荚购自某超市. PEG 4000 等其他试剂均为分析纯.

### 1.2 大豆荚膜过氧化物酶的分离纯化

新鲜大豆豆荚加入 1.3 倍体积的磷酸盐缓冲液 ( $\text{pH}=6.8$ ), 用高速食品搅拌机粉碎, 粉碎后在  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下浸提 2 h, 然后用  $25\text{ }\mu\text{m}$  的滤布过滤. 滤液经以下步骤分离纯化: 双水相分离纯化 ( $w(\text{PEG } 4\text{ }000) : w(\text{纯水}) = 12\%$ ,  $w(\text{K}_2\text{HPO}_4) : w(\text{纯水}) = 13\%$ )、锌离子除杂、超滤、Sephadex G-75 凝胶过滤层析和 DEAE 离子交换层析. 最后将浓缩酶液冷冻干燥后得到  $160\text{ U/mg}$  的大豆荚膜过氧化物酶粉末.

### 1.3 微乳液中过氧化物酶催化奥美拉唑硫醚制备 S-奥美拉唑

SPP 催化反应如下: 反应在 20 mL 的容量瓶中进行, 加入十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB, 1.265 g)、异辛烷 (7.8 mL)、正丁醇 (1.2 mL)、磷酸盐缓冲液 (1 mL,  $\text{pH}=7.6$ ) 和一定量的 SPP 粉末, 制得水与表面活性剂的摩尔比  $W_o = 16$  的 CTAB/异辛烷/正丁醇/水微乳液, 最终得到浓度为  $240\sim 3\text{ }200\text{ U/mL}$  的过氧化物酶和  $20\text{ mol/mL}$  的奥美拉唑硫醚. 加入过氧化氢引发反应, 反应温度为  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 水浴摇床转速为  $150\text{ r/min}$ , 反应时间为 5 h, 反应结束后在反应液中加入 3 倍体积的蒸馏水以停止反应, 然后离心将混合物分离为有机相和水相. 水相用乙酸乙酯萃取, 合并有机相, 进一步分离纯化得到目标产物. 所得样品用高效液相色谱 (HPLC) 分析计算转化率、产率以及对映体过量值 (enantiomeric excess, e.e.).

### 1.4 大豆荚膜过氧化物酶 (SPP) 活性的测定

采用 UV-2550 型分光光度计 (日本岛津) 在  $510\text{ nm}$  处测定 SPP 的活性. 测定原理: 在  $\text{pH}$  为 7.0 的磷酸盐缓冲液中, SPP 催化 4-氨基安替比林与苯酚发生显色反应, 加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  引发反应, 以  $1\text{ cm}$  石英试管在  $25\text{ }^\circ\text{C}$  下 5 min 内的吸光度变化值表示 1 个 SPP 活性单位 (U).

### 1.5 高效液相色谱 (HPLC) 分析

液相色谱仪为 Agilent 1200 系列二极管阵列检测器. 用手性色谱柱检测奥美拉唑硫醚的转化率, 以及 S-奥美拉唑和 R-奥美拉唑 ( $P_R$ ) 的产率. 手性色谱柱为 SA ( $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ , 日本 YMC), 检测波长为  $302\text{ nm}$ , 进样量为  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液 ( $V(\text{乙腈}) : V(\text{磷酸盐}) = 15 : 85$ ,  $\text{pH}=6.0$ ), 流速为  $0.6\text{ mL/min}$ . S-奥美拉唑和 R-奥美拉唑的保留时间分别为 5.8 和 6.9 min. 检测过氧化氢的色谱柱为

Inertsil ODS-SP 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水( $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 2 : 8$ ), 检测波长为 220 nm, 流速为 0.5 mL/min, 过氧化氢的保留时间为 3.7 min. 从反应溶液中提取样品并直接用于过氧化氢的 HPLC 分析.

## 2 模型开发

### 2.1 大豆荚膜过氧化物酶催化反应机理及模型

图 1 为大豆荚膜过氧化物酶催化奥美拉唑硫醚不对称氧化生成手性亚砷(对映体埃索美拉唑)的反应途径, 图 2 为所提出的过氧化物酶催化硫醚不对称氧化的反应机理. 由图 1 和图 2 可知: 该化学-酶反应体系包括 5 个酶反应和 2 个化学反应, 反应 1 和反应 2 构成反应组合 1, 其中, B 在 SPP(E) 催化下不对称氧化为手性亚砷; 反应 1、反应 3 和反应 4 构成反应组合 2, 其中 SPP 与 A 反应转化为 SPP-I( $E_1$ ), 然后 SPP-I( $E_1$ ) 与 B 反应生成 SPP-II( $E_2$ ) 和奥美拉唑硫化阳(正一价)离子(C), C 被 SPP-II( $E_2$ ) 转化为对映体  $P_S$  和  $P_R$ ; 反应 1、反应 3 和反应 5 构成反应组合 3, 其中 C 由 SPP(E) 分别转化为 SPP-I( $E_1$ ) 和 SPP-II( $E_2$ ) 后催化生成. 在反应 6 和反应 7 中, 2 个 C 反应生成奥美拉唑硫化阳(正二价)离子(R), 后者与水反应以化学方式生成外消旋对映体.

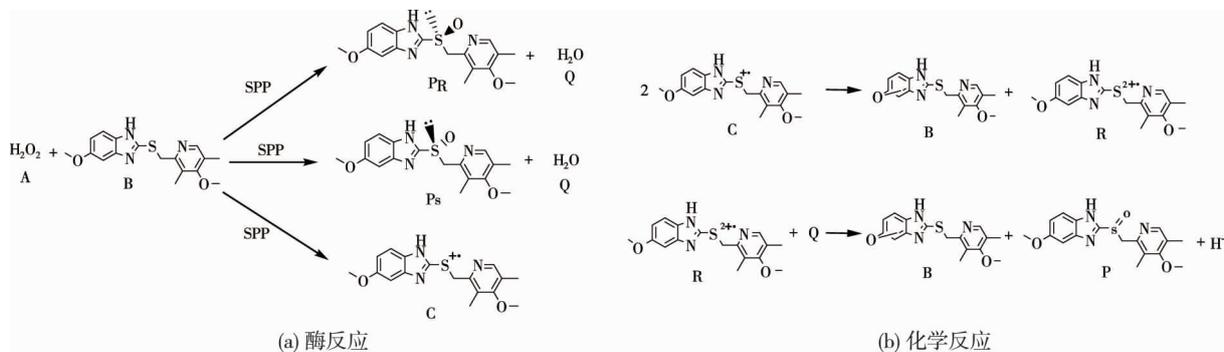


图 1 大豆荚膜过氧化物酶催化不对称亚砷

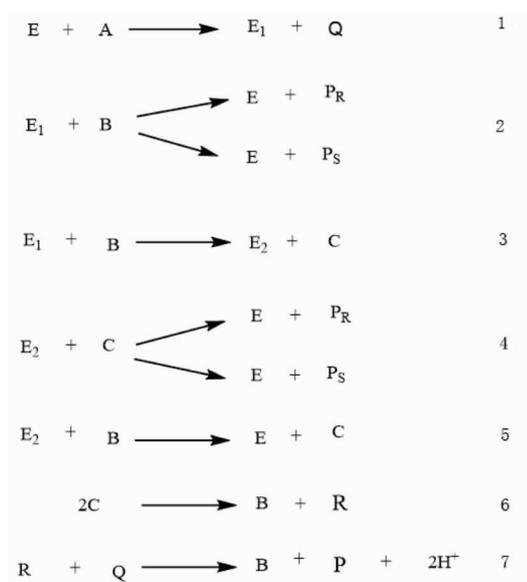


图 2 过氧化物酶催化硫醚不对称亚砷氧化生成氧化奥美拉唑硫醚制备 PS 手性亚砷的反应顺序

在反应 1 中,  $H_2O_2$  与 E 结合, 迅速生成水并将 E 转化为  $E_1$ . 因此, 有理由认为这个反应是不可逆的. 反应 2 和反应 4 是氧化反应, 一般来说是不可逆的. 反应 3 和反应 5 生成阳离子自由基, 反应应该是不可逆的. 在反应 6 中, 2 个奥美拉唑硫化阳(正一价)离子(C)反应生成奥美拉唑硫化阳(正二价)离子(R), 在反应 7 中反应生成亚砷, 反应 6 和反应 7 也被认为是不可逆的. 在本体系中, 有 4 种底物 A, B, C, Q( $H_2O$ )

和 5 种产物 B, C,  $H^+$ , Q,  $P_R$ ,  $P_S$ , 其中 B, C 和 Q 不仅是反应 2~反应 6 的底物, 还是反应 1、反应 3、反应 5 和反应 6 的产物。

试验表明: SPP 在氧化过程中活性的损失较大. 在结果和讨论中将详细阐述 SPP 的稳定性. 一般认为, 许多酶催化的反应遵循以下 2 种机制之一: 乒乓机制<sup>[7]</sup>和顺序机制<sup>[8]</sup>. 过氧化物酶催化硫醚氧化生成对映体亚砜时, 可能出现 2 种中间形态的过氧化物酶: 化合物 I 和化合物 II. 以下讨论大豆荚膜过氧化物酶催化奥美拉唑硫醚反应的机理.

对于图 2 中的反应 1 和反应 2, SPP (E) 催化硫醚氧化成手性亚砜的反应机制讨论如下. 过氧化物酶催化硫醚不对称亚砜氧化生成手性亚砜的乒乓机制如图 3 所示.

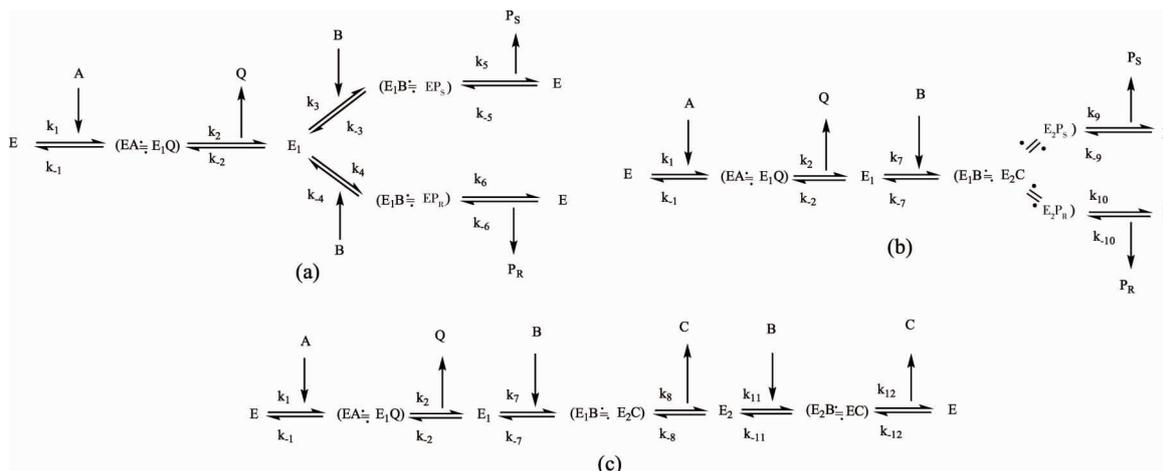


图 3 过氧化物酶催化硫醚不对称亚砜氧化生成手性亚砜的乒乓机制

由图 3a 可知: 反应 1 中的底物 A 首先与过氧化物酶 E 结合形成 EA, 然后 EA 转变为  $E_1Q$ , 其中 Q 为离去基团. 离去基团 Q 从  $E_1Q$  中释放, 然后与 B 结合生成过氧化物酶复合物  $E_1B$ , 这是乒乓机制的特征之一, 所以, 该反应可能属于乒乓机制. 反应 2 发生不对称亚砜氧化反应,  $E_1$  与底物 B 结合生成过氧化物酶复合物  $E_1B$ , 大部分产物为  $EP_S$ , 少量为  $EP_R$ , 这是因为 SPP 在水中的对映选择性更倾向于 S 构型. 最后, 产物  $P_R$  和  $P_S$  从过氧化物酶复合物中释放出来,  $E_1$  再生为其原始形式 E.

对于图 3b 所示的反应 1、反应 3 和反应 4, 由于反应 1 中有一个离去基团 Q, 因此, 该不对称氧化反应也可能是乒乓机制,  $E_1$  与 B 结合生成过氧化物酶复合物  $E_1B$ , 其中  $E_1$  变为  $E_2$ , 前手性分子 B 转化为 C, 然后分别氧化生成大量  $P_S$  和少量  $P_R$ , 当  $P_S$  和  $P_R$  都从酶复合物  $E_2P_S$  或  $E_2P_R$  中释放出来时,  $E_2$  恢复到 E.

最后, 对于反应 1、反应 3 和反应 5, 反应 3 和反应 5 都生成 C. 对于反应 3, 过氧化物酶与 B 相互作用使  $E_1B$  变成  $E_2C$ , 然后 C 从  $E_2C$  离去,  $E_2$  释放并再与 B 结合生成过氧化物酶复合物  $E_2B$ ,  $E_2$  与 B 相互作用使  $E_2B$  在反应 5 中转化成 EC, C 从 EC 中释放, 如图 3c 所示,  $E_2$  恢复到原来的 E.

E,  $E_1$  和  $E_2$  分别称为原酶、化合物 I 和化合物 II, 化合物 I 和化合物 II 分别是原酶<sup>[9]</sup>的变形, 在不同的文献中, E,  $E_1$  和  $E_2$  也分别被称之为  $R-PorFe^{II}$ ,  $R^{-\cdot} \cdot PorFe^{IV} = O$  和  $R-PorFe^{IV} = O$ <sup>[10]</sup>, 或者 SPP, SPP-I 和 SPP-II, 或者 HRP, HRP-I 和 HRP-II. 各种光谱方法被用来表征 HRP-I 和 HRP-II. 瞬态动力学试验结果证实了化合物 I 和化合物 II 的存在.

反应 6 和反应 7 为化学反应, 采用幂律动力学方程, 反应产物为外消旋产物, 即  $P_S$  与  $P_R$  的产量相等.

此外, 在酶催化反应中经常会出现底物和产物抑制, 这可能会显著地影响反应的动力学行为, 导致反应的动力学模型发生相应的变化<sup>[11]</sup>. 因此, 在建立过氧化物酶催化反应动力学模型时, 要考虑底物和产物的抑制作用. 本研究中, 过氧乙酸、过氧化氢和奥美拉唑硫醚可能有底物抑制作用, 而 S-奥美拉唑可能有产物抑制作用, 而 R-对映体浓度远低于 S-对映体, 故其抑制可忽略. 因此, 在建立动力学模型时, 考虑过氧化氢和奥美拉唑硫醚的底物抑制及 S-奥美拉唑的产物抑制.

以底物 A 为例, 对底物抑制机制进行讨论. 底物抑制剂 A 与过氧化物酶复合物如 EA,  $E_1B$ ,  $E_2C$  结

合,形成不反应的末端复合物即死端复合物,如 AEA, AE<sub>1</sub>B 和 AE<sub>2</sub>C,产生底物抑制.因此,尽管底物仍可与酶或酶复合物结合,但所得到的末端复合物不能进一步反应以产生所需的目标产物.与底物抑制类似,产物抑制剂 P<sub>s</sub> 分别与 EB, EP<sub>s</sub> 和 EQ 形成死端酶复合物 P<sub>s</sub>EB, P<sub>s</sub>EP<sub>s</sub> 和 P<sub>s</sub>EQ,阻碍产物形成和底物转化.

在 SPP 催化硫醚不对称氧化制备对映体亚砜的反应机制讨论的基础上,采用 King-Altman 方法建立了动力学模型.反应 1~反应 7 中底物和产物的动力学速率方程如式(1)~式(11)所示.式(8)~式(12)用于方便和直观地分析反应动力学模型的模拟结果.

$$E' = E_0 \exp(-0.127t). \quad (1)$$

$$dY_1/dt = -K_{11}Y_1Y_2B_0Y_2B_0[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0)]; \quad (2)$$

$$dY_2/dt = -K_{12}Y_1A_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0)] - K_{13}Y_1A_0Y_2B_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0+K_8Y_1A_0Y_2B_0Y_2B_0)] - K_{14}Y_1A_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0)] + K_{18}(Y_6B_0)^{K_{19}/B_0}; \quad (3)$$

$$dY_3/dt = K_{14}Y_1A_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0)] + K_{15}Y_1A_0Y_2B_0Y_5[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0+K_8Y_1A_0Y_2B_0Y_2B_0)] + K_{18}(Y_6B_0)^{K_{19}/B_0}; \quad (4)$$

$$dY_4/dt = K_{16}Y_1A_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0)] + K_{17}Y_1A_0Y_2B_0Y_5[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0+K_8Y_1A_0Y_2B_0Y_2B_0)] + K_{18}(Y_6B_0)^{K_{19}/B_0}; \quad (5)$$

$$dY_5/dt = K_{12}Y_1A_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0)] + K_{13}Y_1A_0Y_2B_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0+K_8Y_1A_0Y_2B_0Y_2B_0)] - K_{15}Y_1A_0Y_2B_0Y_5(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0+K_8Y_1A_0Y_2B_0Y_2B_0) - 2K_9(Y_5B_0)^{(2K_{10})}/B_0; \quad (6)$$

$$dY_6/dt = -K_{18}(Y_6B_0)^{K_{19}/B_0} + K_9(Y_5B_0)^{(2K_{10})}/B_0; \quad (7)$$

$$V_{S1} = K_{14}Y_1A_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0)]; \quad (8)$$

$$V_{S3} = K_{15}Y_1A_0Y_2B_0Y_5[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0+K_8Y_1A_0Y_2B_0Y_2B_0)]; \quad (9)$$

$$V_{S4} = K_9(Y_5B_0)^{(2K_{10})}/B_0; \quad (10)$$

$$V_{R1} = K_{16}Y_1A_0Y_2[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0)]; \quad (11)$$

$$V_{R3} = K_{17}Y_1A_0Y_2B_0Y_5[E'/(K_1+K_2Y_1A_0+K_3Y_1B_0+K_4Y_1A_0Y_2B_0+K_5Y_1A_0Y_1A_0+K_6Y_3B_0+K_7Y_2B_0Y_2B_0+K_8Y_1A_0Y_2B_0Y_2B_0)]. \quad (12)$$

式中: $E'$ 为过氧化物酶(E)的活性; $E_0$ 为过氧化物酶(E)的初始浓度; $Y_1$ 为A的相对剩余量; $K_1 \sim K_{19}$ 为动力学参数; $Y_2$ 为B的相对剩余量; $B_0$ 为奥美拉唑硫醚(B)的初始浓度; $A_0$ 为过氧化氢(A)的初始浓度; $Y_3$ 为C的相对剩余量; $Y_4$ 为P<sub>s</sub>的产率; $Y_5$ 为P<sub>R</sub>的产率; $Y_6$ 为R的产率; $V_{S1}$ 为由反应1生成P<sub>s</sub>的速率; $V_{S3}$ 为由反应3生成P<sub>s</sub>的速率; $V_{S4}$ 为由反应4生成P<sub>s</sub>的速率; $V_{R1}$ 为由反应1生成P<sub>R</sub>的速率; $V_{R3}$ 为由反应3生成P<sub>R</sub>的速率.

## 2.2 动力学模型参数的估计

根据大豆荚膜过氧化物酶催化奥美拉唑硫醚不对称反应生成对映体亚砜的试验数据,为了确定动力学模型,采用常微分方程数值解与最优化相结合的方法估计了动力学模型参数<sup>[7]</sup>,构建的目标函数为

$$F = \sum \sum \text{abs}((Y_{ij}^{\text{sim}} - Y_{ij}^{\text{exp}})/Y_{ij}^{\text{sim}}).$$

式中: $Y_{ij}^{\text{sim}}$ 为当*i*=1~4,*j*=1~12时,A,B,P<sub>s</sub>,P<sub>R</sub>的模拟剩余量或产率,无量纲; $Y_{ij}^{\text{exp}}$ 为当*i*=1~4,*j*=1~12,

A, B,  $P_S$  和  $P_R$  的试验剩余量或产生量,无量纲.

用 MATLAB 2019b 软件进行计算,用 ode45 求解微分方程数值解,而最优化采用 fmincon 程序.

### 3 结果和讨论

#### 3.1 大豆荚膜过氧化物酶反应一次后的剩余活性

图4给出了大豆荚膜过氧化物酶活性在一次反应(反应温度 50 °C, 搅拌速度 150 r/min,  $E_0 = 480$  U/mL)后的剩余值,平均值约为 53%,酶活性损失较大,因此,在建立动力学模型时必须考虑豆类过氧化物酶活性的损失.

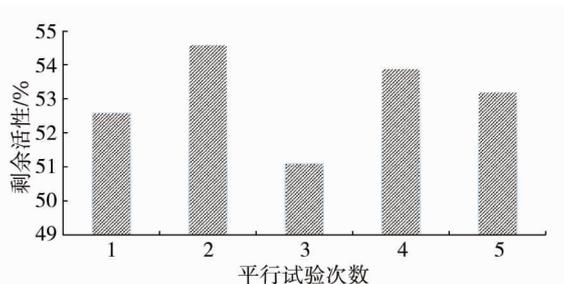


图4 一次反应后(5个平行试验)大豆荚膜过氧化物酶的剩余活性

过氧化氢对酶的稳定性有不利影响,会使过氧化物酶失活<sup>[12]</sup>.酶催化氧化中过氧化物酶的失活过程包括中间体Ⅲ的形成和随后不可逆失活的过氧化物酶<sup>[13]</sup>的积累2个阶段.如果酶暴露在高浓度的过氧化氢中,就会发生缓慢的酶失活<sup>[14]</sup>.酶失活是一个随时间逐渐变化的过程,氧化过程最终导致酶的二硫键被破坏,蛋白质一级结构丢失<sup>[15]</sup>.

将试验数据回归后,得到大豆荚膜过氧化物酶活性与时间的指数关系为

$$E' = E_0 \exp(-0.127t). \quad (13)$$

式中:0.127 为大豆荚膜过氧化物酶失活的速率常数,即酶随时间的变化失活曲线的斜率; $t$  为时间,h.

在本研究中反应温度为 50 °C,而辣根过氧化物酶的反应温度范围通常为 20~30 °C,因此,SPP 的热稳定性远高于辣根过氧化物酶.

#### 3.2 SPP 催化硫醚不对称氧化反应

在油包水微乳液中,成功地进行了 SPP 催化硫醚不对称亚砷生成对映体亚砷的试验.图5为底物 A 和底物 B 的模拟结果和试验数据的比较(反应温度 50 °C, 搅拌速度 150 r/min, ),图6为产物  $P_S$  和  $P_R$  的模拟结果和试验数据的比较(反应温度 50 °C, 搅拌速度 150 r/min,  $E_0 = 480$  U/mL).

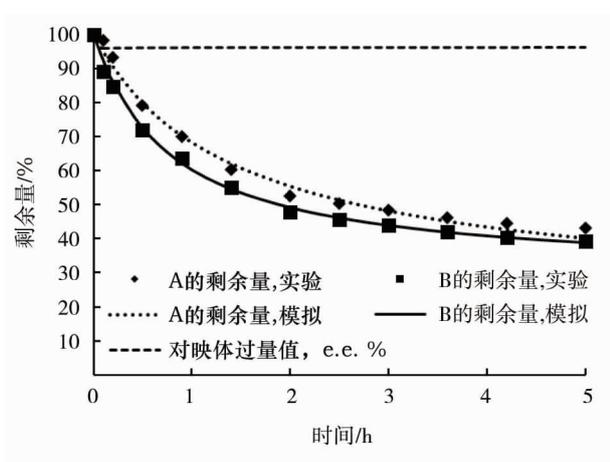


图5 A 和 B 在模拟和试验数据中的剩余量与时间的关系

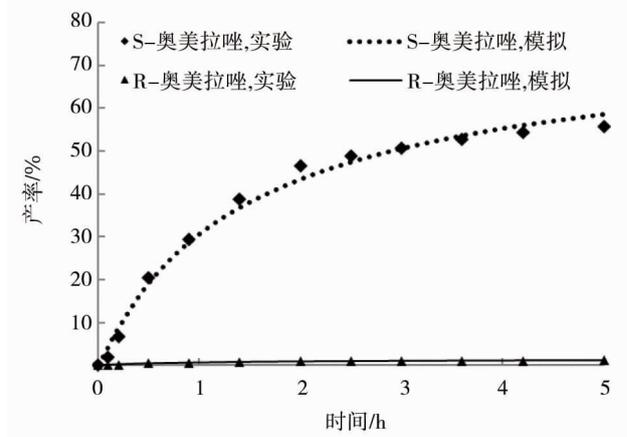


图6  $P_S$  和  $P_R$  的模拟产率和试验产率的比较

由图5和图6可知:所建立的动力学模型与试验数据拟合良好,模拟值与试验值的平均相对偏差为

5.44%,这说明所提出的模型是合理的、可以接受的。

图7是根据所建立的模型计算机模拟出的反应2、反应4和反应7对 $P_s$ 产率的贡献(反应温度 $50\text{ }^\circ\text{C}$ ,搅拌速度 $150\text{ r/min}$ , $E_0=480\text{ U/mL}$ ).由图7可知:反应2对 $P_s$ 产率的贡献最大,反应4次之,反应7最小.考虑反应2和反应4都是酶促反应,推测如果提高过氧化物酶的初始浓度,可能会进一步提高产率。

图8为过氧化物酶的初始浓度 $E_0$ 对 $P_s$ 产率的影响.由图8可知:随着过氧化物酶的初始浓度从 $480\text{ U/mL}$ 增加到 $3\ 200\text{ U/mL}$ (对应的过氧化物酶浓度为 $20\text{ mgU/mL}$ ), $P_s$ 的产率从 $59.10\%$ 增加到 $91.56\%$ ,e.e.值从 $96.23\%$ 略降到 $96.08\%$ 。

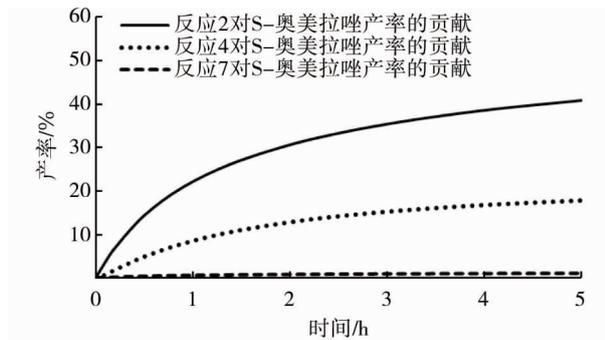


图7 反应2、反应4和反应7对 $P_s$ 产率的贡献

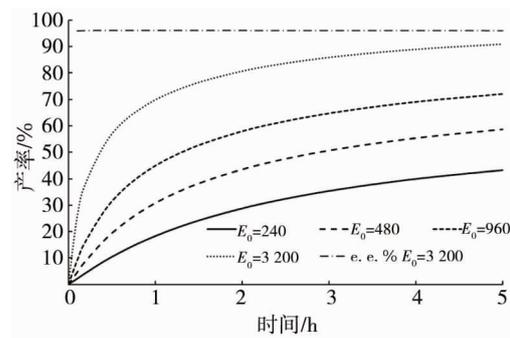


图8 过氧化物酶初始浓度 $E_0$ 对 $PS$ 产率的影响

所提出的反应机理包括7个相关反应,反应1、反应2、反应4、反应6和反应7已经被同位素标记试验证实:少量的 $^{18}\text{O}$ 从水中转移到亚砷<sup>[16]</sup>.瞬态动力学试验结果也证实了反应1和反应3~反应7的存在性,7个反应都用各种光谱方法进行了研究<sup>[17]</sup>。

由于过氧化物酶催化氧化反应的复杂性,多年来许多研究者对其反应机理进行了研究,提出了氧向硫化物转移的2种反应机理:(1)双电子氧化模式,即反应1和反应2;(2)3个反应,即反应1、反应3和反应4. Hubert等<sup>[3]</sup>在探讨了大豆壳亚砷酶催化S-氧化生成S-亚砷的机理后,优选机理2,但不能排除机理1. Fukuzumi等<sup>[5]</sup>提出了过氧化物酶催化硫化物氧化生成亚砷的3种可能机制:(1)反应1和反应2的HRP-I通过氧原子一步转移到硫化物,发生双电子还原;(2)反应1、反应3和反应4包括2步反应,即单电子转移到HRP-I,伴随着硫阳离子自由基的形成,HRP-II的氧阴离子或羟基自由基转移,这是针对细胞色素P-450催化的S-氧化提出的;(3)反应1、反应3和反应5中的阳离子自由基是通过硫代茴香醚与HRP-I和HRP-II反应生成的. $^{18}\text{O}$ 从水转移的同位素标记试验证实了氧原子从水转移到HRP-II上<sup>[18]</sup>. Hu等<sup>[19]</sup>的研究结果更倾向于反应1、反应3和反应5机理.同位素标记试验表明大多数 $^{18}\text{O}$ 来自过氧化氢.Samuni等<sup>[10]</sup>认为HRP介导的HXS氧化,通常通过3个相关反应进行,类似于反应1、反应3和反应5,其中HRP还原过氧化物生成HRP-I,HRP-I进一步还原为HRP-II.

结合本研究结果和其他研究者的研究结果,可以得出:SPP催化奥美拉唑硫醚不对称氧化反应机制包括3个相关反应,即酶催化的SPP-I的双电子还原反应、SPP-I单电子转移反应和非酶催化的化学反应.也就是说,3个相关的反应构成SPP催化的硫醚不对称氧化反应,体系中包括5个酶反应和2个化学反应.图2中,反应1和反应2为具有双电子还原的反应;单电子转移反应是反应1、反应3~反应5;化学反应是反应6和反应7.

### 3.3 SPP在油包水微乳中的对映选择性

如图8所示,产物e.e.值达 $96.08\%$ ,说明SPP催化硫醚的不对称氧化具有很高的对映选择性.如图2所示,在反应2和反应4中,硫醚在SPP的催化下不对称氧化生成手性亚砷,但在反应7中形成外消旋产物,该反应是化学反应,没有对映体选择性.如图7所示,在反应2、反应4和反应7中,反应2对 $P_s$ 产量的贡献最大,其次是反应4,反应7对 $P_s$ 产量的贡献很小。

在缓冲液中,大豆壳亚砷酶催化氧化硫化物,得到S-亚砷,其e.e.值约为 $90\%$ .HRP催化的硫醚氧化具有明显的对映选择性,在pH为7.0和4.5时,S-亚砷的e.e.值为 $60\% \sim 70\%$ ,比R-亚砷产率约高5倍。

溶剂对过氧化物酶的构型选择有很大影响.SHP 催化硫代胺在水中的不对称氧化有利于产生 S 构型,而在有机溶剂中则有利于产生 R 构型<sup>[20]</sup>.

在本研究中,SPP 处于微乳液的水核,是水环境而不是有机溶剂,因此,其对映体选择性应与在水中相同,SPP 的对映体优势构型为 S 构型.

### 3.4 动力学模型的分析

反应动力学常数揭示了反应机理的特点,对于理解酶促反应是极其重要的.表 1 为式(1)~式(14)的动力学模型参数.由表 1 可知:独立常数  $K_1 = 0$ ,这是乒乓机理的一个典型特征,这意味着油包水微乳中 SPP 催化亚砷氧化的动力学机理可能遵循乒乓机理.考虑  $K_1 = 0$  和有离去基团这 2 个特征,可以肯定 SPP 催化亚砷氧化遵循乒乓机理.

表 1 估计的动力学参数

参数	数值	单位	参数	数值	单位
$K_1$	0	无量纲	$K_{11}$	0.015	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{-2}$
$K_2$	34.480	$\text{mM}^{-1}$	$K_{12}$	0.028	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{-1}$
$K_3$	0.225	$\text{mM}^{-1}$	$K_{13}$	0.004	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{-2}$
$K_4$	0.051	$\text{mM}^{-2}$	$K_{14}$	0.130	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{-1}$
$K_5$	5.767	$\text{mM}^{-2}$	$K_{15}$	0.910	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{-2}$
$K_6$	436.610	$\text{mM}^{-1}$	$K_{16}$	2.70E-03	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{-1}$
$K_7$	0.030	$\text{mM}^{-2}$	$K_{17}$	1.50E-02	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{-2}$
$K_8$	0.860	$\text{mM}^{-3}$	$K_{18}$	7.05E-06	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{1-K_{19}}$
$K_9$	213.090	$\text{h}^{-1} \text{U}^{-1} \text{mL} \text{mM}^{1-2K_{10}}$	$K_{19}$	0.200	无量纲
$K_{10}$	1.780	无量纲			

酶反应经常受到底物和产物的抑制<sup>[7-8]</sup>,在本研究中也出现了底物和产物的抑制. $K_5 Y_1 A_0 Y_1 A_0$  和  $K_7 Y_2 B_0 Y_2 B_0$  分别为  $\text{H}_2\text{O}_2$  和奥美拉唑硫醚的底物抑制项.如表 1 所示, $K_5$  较大,表明  $\text{H}_2\text{O}_2$  有明显的底物抑制,实际上  $\text{H}_2\text{O}_2$  对过氧化物酶有损害<sup>[13]</sup>.相反, $K_7$  很小,说明奥美拉唑硫醚对底物的抑制作用可以忽略不计. $K_6 Y_3 B_0$  为  $\text{P}_s$  的产物抑制项, $K_6$  较大,表明  $\text{P}_s$  有明显的产物抑制.

动力学模型可以深入地分析反应过程. $K_{14}$  和  $K_{16}$  分别是反应 2 中  $\text{P}_s$  和  $\text{P}_r$  形成的动力学速率常数.由表 1 可以看出: $K_{14}$  远大于  $K_{16}$ ,说明在反应 2 中  $\text{P}_s$  的生成速率远大于  $\text{P}_r$ .同样,对于反应 4 中  $\text{P}_s$  和  $\text{P}_r$  生成的动力学速率常数  $K_{15}$  和  $K_{17}$ ,可以得出反应 4 中  $\text{P}_s$  的生成速率远远大于中  $\text{P}_r$  的生成速率的结论,因此,SPP 表现出很好的对映选择性,从而得到高达 96.08% 的 e.e. 值.

## 4 结论

1) 用 King-Altman 方法建立的反应动力学模型鲜有报道,对探索本研究反应机理具有重要意义,可用于分析放大生产对映体亚硫醚的反应且对类似模型的建立具有一定的指导意义.

2) 用大豆荚膜过氧化物酶在微乳液中催化奥美拉唑硫醚不对称氧化反应生成 S-奥美拉唑,收率高,成本低,经济效益明显.

3) 酶催化不对称反应一般伴随底物抑制和产物抑制,如何消除或减少抑制、提高反应效率是本类课题需要进一步深入研究的问题.

### 参考文献:

- [1] Kong M, Wang K, Dong R, et al. Enzyme catalytic nitration of aromatic compounds[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015: 73-74.
- [2] Dong S, Mao L, Luo S, et al. Comparison of lignin peroxidase and horseradish peroxidase for catalyzing the removal of nonylphenol from water[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(3): 2358-2366.

- [3] Hubert C B, Barry S M. New chemistry from natural product biosynthesis[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44(3):738–744.
- [4] Yang D, Wang Y, Huang W, et al. Model Compounds Study for the Mechanism of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Lignin Modification[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191:981–995.
- [5] Fukuzumi S, Mizuno T, Ojiri T. Catalytic Electron-Transfer Oxygenation of Substrates with Water as an Oxygen Source Using Manganese Porphyrins[J]. *Chemistry*, 2012, 18(49):15794–15804.
- [6] Kong M, Yang Z, Li Q, et al. Kinetics of Horseradish Peroxidase-Catalyzed Nitration of Phenol in a Biphasic System[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 27(2):297.
- [7] Zhang Y, Zhao Y, Jiang W, et al. Lipase-Catalyzed Oxidation of Cyclohexanone To Form  $\epsilon$ -Caprolactone and Kinetic Modeling [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(15):13294–13306.
- [8] Zhang Y, Zhao Y, Gao X, et al. Kinetic model of the enzymatic Michael addition for synthesis of mitomycin analogs catalyzed by immobilized lipase from *T. laibacchi*[J]. *Molecular Catalysis*, 2019, 466:146–156.
- [9] Ji L, Franke A, Brindell M, et al. Combined Experimental and Theoretical Study on the Reactivity of Compounds I and II in Horseradish Peroxidase Biomimetics[J]. *Chemistry – A European Journal*, 2014, 20(44):14437–14450.
- [10] Samuni U, Maimon E, Goldstein S. A kinetic study of the oxidation of hydroxamic acids by compounds I and II of horseradish peroxidase: Effect of transition metal ions[J]. *Journal of Coordination Chemistry*, 2018, 71(11/13):1728–1737.
- [11] Waghmare G V, Chatterji A, Rathod V K. Kinetics of enzymatic synthesis of cinnamyl butyrate by immobilized lipase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 183(3):792–806.
- [12] Oohora K, Hayashi T. Incorporation of modified and artificial cofactors into naturally occurring protein scaffolds[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1216:251–263.
- [13] Jin W, Wang R, Huang X. Horseradish peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of aniline in bicontinuous microemulsion stabilized by AOT/SDS[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 302:112529.
- [14] Drozd A, Erfurt K, Bielas R, et al. Chemo-enzymatic Baeyer-Villiger oxidation in the presence of *Candida antarctica* lipase B and ionic liquids[J]. *New Journal of Chemistry*, 2015, 39(2):1315–1321.
- [15] Toernvall U, Hedstroem M, Schillen K, et al. Structural, functional and chemical changes in *Pseudozyma antarctica* lipase B on exposure to hydrogen peroxide[J]. *Biochimie*, 2010, 92(12):1867–1875.
- [16] Lu Y Z, Chen W. Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(9):3594–3623.
- [17] Seelbach K, Deurzen M, Rantwijk F V, et al. Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 55(2):283–288.
- [18] Goswami D, Basu J K, De S. Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013, 33(1):81–96.
- [19] Hu C, Peng Q, Silvernail N J, et al. Effects of Imidazole Deprotonation on Vibrational Spectra of High-Spin Iron (II) Porphyrates[J]. *Inorganic Chemistry*, 2013, 52(6):3170–3177.
- [20] Harris D L, Loew G H. Identification of putative peroxide intermediates of peroxidases by electronic structure and spectra calculations[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(43):10588–10594.