

血红素的电荷与其催化活性关系的研究

欧光南

(集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 研究血红素催化过氧化氢氧化愈创木酚反应动力学, 并对不同的血红素催化剂进行量子化学计算。结果表明, 顺式血红素具有更高效的催化作用, 反式血红素催化效果较差, 这种差异可能与铁卟啉的前线轨道能级有关。对于同一催化剂, 无论是顺式还是反式, 随着 pH 值升高, 反应活化能都降低, 铁卟啉所带的负电荷增加是其中因素之一。可见, 铁卟啉所带的负电荷与其催化活性具有相关性。

[关键词] 血红素; 催化活性; 量子化学; 反应动力学; 前线轨道能级

[中图分类号] O 643.36

Relationship of Catalytic Activity and Charge State of Hemin

OU Guangnan

(College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The kinetics of H_2O_2 -dependent oxidation of guaiacol catalyzed by hemin was investigated. The molecular frontier orbital energies of hemin were calculated using DFT. The results showed that the cis-hemin was more active than the trans one. It was found that there was excellent correlation between catalytic activity and frontier orbital energy. The activation energies of the same hemin, cis or trans, decreased with the increase of pH, indicating that the negatively charge was the key factor on activity.

Keywords: hemin; catalysis activity; quantum chemistry; reaction kinetics; frontier orbital energy level

0 引言

酶具有非常高的催化活性, 长期以来, 众多研究者认为, 过渡态的稳定作用 (transition-state stabilization, TSS) 是其主要因素^[1-3]。然而, 也有研究者持否定态度, 认为反应物的活化作用 (reactant-state destabilization, RSD) 占主导地位^[4-5]。不管持 TSS 观点, 还是 RSD 观点, 双方都认为酶催化作用的本质是静电相互作用^[2-4]。

显然, RSD 和 TSS 共同作用将极大地加速反应。此外, 根据反应微观可逆观点, 反应最后还必须经过产物的活化 (product-state destabilization, PSD) 阶段。因此, 酶催化过程要经历 3 个阶段: RSD→TSS→PSD。上述过程可能与酶结构中具有独特的电荷转接系统 (charge relay system) 有关。这可以从糜蛋白酶催化酰胺键水解的反应机理^[6]中得到启示: 在反应过程中, 反应物和产物受到带负电的天冬氨酸作用, 而过渡态则受到带正电的组氨酸作用。不同的电场必将对酶反应的反应物、过渡态和产物的分子轨道能级产生不同的影响。为了从静电场角度解释酶的催化作用, 2001 年, 文献

[收稿日期] 2019-04-02

[基金项目] 福建省自然科学基金项目 (2017J01635)

[作者简介] 欧光南 (1965—), 男, 副教授, 从事酶催化研究。

[7] 利用量子化学方法计算了模型分子甲醛的能级,发现正离子、负离子对甲醛分子轨道能级的影响各不相同,正离子(氢离子)能使甲醛分子轨道能级降低,而负离子(氢氧根离子)能使甲醛分子轨道能级升高。此结果与唐敖庆等^[8]对荷电不同的碳硼烷分子的轨道能级计算结果一致。结合酶反应过程中负电场、正电场交替作用的特点,文献[7]提出了酶催化的非等权电场催化模式(non-uniform potential field catalysis):负电荷中心是酶催化反应中反应物或产物的活性位,而正电荷中心则是过渡态的活性位,正负电场协同作用极大地降低反应的活化能。

活性酶有其特定的电离状态,分子表面存在负电基团。电离状态的改变会导致酶的活性降低,甚至完全失活。文献[9]发现,脂肪酶 *Candida antarctica* lipase B (CALB) 和 *Candida rugosa* lipase (CRL) 溶于碳酸甘油酯后表现出与水体系相当的酶活性,实验表明,碳酸甘油酯具有与水相当的电离-解离能力,溶剂的电离-解离能力影响酶的催化性能。随后,文献[10-11]提出了生物溶剂设计基本原则,设计并合成了羟甲基甲酰胺和羟烷基磺酸基离子液体,发现上述溶剂具有与水相当的电离-解离能力,脂肪酶 CALB 和 *Pseudomonas cepacia* lipase (PCL) 在上述溶剂中均表现出与水体系相当的酶活性。因此,笔者认为,电荷在酶催化反应中起了关键作用,应给予高度重视。

卟啉(porphyrin)是由4个吡咯通过亚甲基相连而形成的共轭大环化合物。卟啉及其衍生物如血红素(铁卟啉)、血蓝素(铜卟啉)、维生素B12(钴卟啉)、叶绿素(镁卟啉)等广泛存在于生物体内,与细胞器的催化、氧的输运和能量转移等相关,是生命体新陈代谢过程中至关重要的部分。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)和肌红蛋白Mb结构上十分相似,都是由一条肽链和一个血红素辅基构成的单链蛋白质,但前者在生物体内起催化作用,后者起氧的运输作用。既然Mb在结构上与HRP十分相似,可以推测Mb也具有催化作用。本文以过氧化氢氧化愈创木酚反应为模型反应,考察Mb的催化性能,并与HRP、氯化血红素(hemin)进行比较研究,通过改变反应体系的pH值,调节Mb、HRP和hemin的可电离基团的电离状态,在荷电改变时,观察这3种催化剂催化活性的变化规律,以认识血红素的电荷与其催化氧化活性的关系。

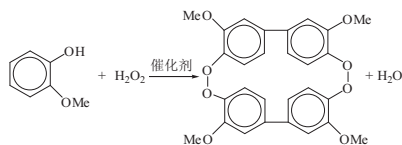
1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

辣根过氧化物酶(Type II, 150~250 U·mg⁻¹),肌红蛋白(取自马的心脏),血红素,愈创木酚购自Sigma。其他试剂均为分析纯。

紫外可见分光光度计(Beckman Coulter, DU800,带电子恒温模块),pH计(Mettler Toledo, FE20-K)。

1.2 催化动力学实验



模型反应为: 其产物四邻甲氧基连酚在470 nm处有强吸收,通过吸光度值测定不同温度下反应初速率。0.1 mol/L的磷酸钠(pH=7.2)缓冲系统,1.0 μmol/L的催化剂(Mb, HRP或Hemin),1.0 mmol/L愈创木酚,加入终浓度为6.0 mmol/L H₂O₂启动反应,于一定温度下,记录470 nm处吸光度值的变化,测定初速率。

1.3 DFT计算

辣根过氧化物酶和肌红蛋白的血红素辅基结构数据,采自蛋白质晶体结构:HRP(PDB 1ATJ)和Mb(PDB 1MYF),C端添加羧基后对羧基进行局部MM+几何优化。氯化血红素进行全局MM+几何优化。采用HyperChem 7.0软件包中的分子力学(MM+)进行几何构型优化。然后,对所得结构进行DFT计算。所有计算均利用HyperChem 7.0软件在PC机上运行。

2 结果与讨论

2.1 愈创木酚氧化反应活化能

愈创木酚氧化反应的活化能由不同温度的反应初速率 r_0 求得。根据反应动力学方程

$$r = kC_A^a C_B^b, \tag{1}$$

其中： r 为 t 时刻的反应速率； C_A 、 C_B 分别为 t 时刻反应物 A 和 B 的浓度； a 、 b 分别为反应物 A 和 B 的级数； k 为该温度下反应速率常数。对于同一催化剂，在不同温度下进行反应，其他条件都相同。

由式（1）可见，反应初速率 r_0 与反应速率常数 k 成正比，即 $\ln k$ 与 $\ln r_0$ 成正比。再由 Arrhenius 公式 $\ln k = -E_a/(RT) + B$ ，其中： E_a 为活化能； T 为温度； R 为气体常数； B 为常数。 $\ln r_0$ 对 $1/T$ 作图，由斜率可得反应活化能。由图 1 可见，相同 pH 值条件下，反应活化能 $\text{hemin} > \text{Mb} > \text{HRP}$ ，催化活性结果与王全林等^[12] 研究结果一致。

hemin、Mb 和 HRP 这 3 种催化剂的活性中心相同，均为铁卟啉，但催化性能却相去甚远。为究其原因，研究了 HRP 和 Mb 的晶体结构后，发现血红素辅基的结构存在差异：HRP（PDB 1ATJ）是由单亚基糖蛋白和氨基酸组成的过氧化物酶，含有 1 个顺式（2 个羧酸根负离子在卟啉环平面同侧）的血红素辅基（见图 2）；Mb（PDB 1MYF）也是由一条肽链和一个血红素辅基构成，不同的是血红素辅基为反式结构（2 个羧酸根负离子在卟啉环平面异侧，见图 2）。因此，综合实验结果和蛋白质晶体结构，可以推断：顺式血红素具有更高效的催化作用，反式血红素催化效果较差。这可能是因为反式结构中羧酸根负电荷分散在卟啉环平面两侧，削弱了电场效应，而顺式血红素羧酸根负电荷集中在卟啉环平面同侧，产生强的静电作用，从而提高其催化活性。

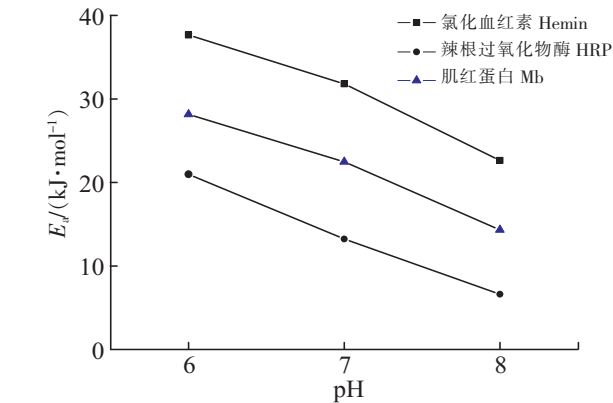


图 1 愈创木酚氧化反应活化能

Fig.1 Activation energy of guaiacol oxidation

对于同一催化剂，无论是 hemin、Mb，还是 HRP，随着 pH 值升高，反应活化能都降低，因为 pH 值变化会引起铁卟啉的丙酸侧链的电离发生变化，pH 值升高，电离度增大，铁卟啉所带的负电荷也增加。说明铁卟啉所带的负电荷与其催化活性具有相关性。当然，pH 值变化对蛋白质分子的构象也有重要影响，从而影响其活性。由于蛋白质表面可电离侧链的存在，蛋白质的电离状态受溶液 pH 值控制。每个蛋白质分子都存在一个 pH 值使它的表面净电荷为零，这就是等电点（point of isoelectric, PI）。当 $\text{pH} > \text{PI}$ 时，该蛋白质带负电荷；当 $\text{pH} < \text{PI}$ 时，该蛋白质带正电荷。试剂信息表明，辣根过氧化物酶（Type II）至少含有 7 种同工酶，其 PI 范围是 3.0 ~ 9.0，而肌红蛋白（来自马心脏）的 pI 是 6.8 和 7.2。可见，在实验 $\text{pH} = 6.0 \sim 8.0$ 范围内，蛋白质分子的构象变化不是其活性变化的主要因素，铁卟啉的丙酸侧链的电离状态的变化有可能是主要控制因素。

2.2 DFT 计算

量化计算（见图 2）表明，铁卟啉的前线轨道能级 $\text{hemin} > \text{Mb} > \text{HRP}$ ，与反应活性也存在负相关。王兰芝等^[13] 采用量化计算和分子模拟方法，设计、合成了 9 种不同结构的氯化金属卟啉铁催化

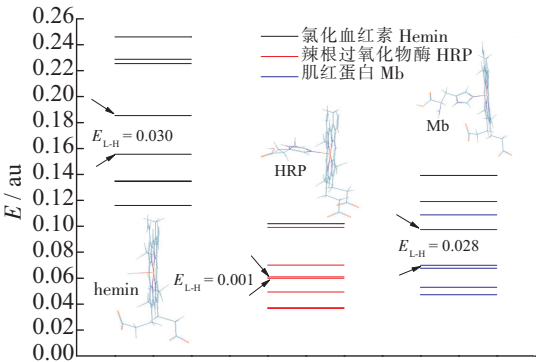


图 2 带负电血红素的前线轨道能量 DFT 计算

Fig.2 Frontier orbital energy of heme in its negatively-charged state by DFT

剂, 并对其前线轨道能量进行了计算, 将计算结果与其催化氧气液相氧化对硝基甲苯制取对硝基苯甲酸反应的活性数据相结合, 发现铁卟啉催化剂的催化活性与其分子前线轨道能量有很好的负相关性。这说明, 根据铁卟啉催化剂结构与活性关系可用来设计催化剂, 从分子层面上设计高活性和高选择性的金属卟啉仿生催化剂。

2.3 过氧化物模拟酶的构建

因为反式结构是血红素的稳定结构, 其中的羧酸根负电荷分散在卟啉环平面两侧, 削弱了电场效应。为提高模拟酶的反应活性, 首先要对血红素进行改性, 把反式结构变成顺式结构 (见图3), 使其负电荷集中, 进而产生强的静电作用, 从而提高其催化活性。然后, 再设计并合成外围基团为永久负离子的树枝状分子, 封装顺式血红素来模拟过氧化物酶, 使模拟的过氧化物酶具有类似于酶分子的非等势电场, 从而开发出类酶性能的树枝状分子催化剂。

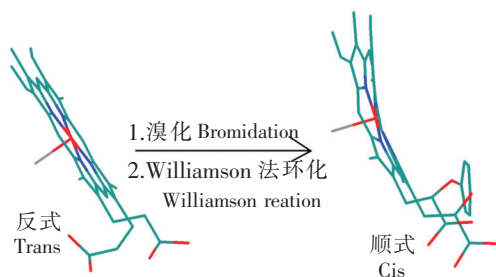


图3 血红素修饰以构建过氧化物模拟酶
Fig.3 Hemin modification for mimicking peroxidase

3 结论

顺式血红素具有更高效的催化作用, 反式血红素催化效果较差, 这种差异可能与铁卟啉的前线轨道能级有关。对于同一催化剂, 无论是顺式还是反式, 随着 pH 值升高, 反应活化能都降低, 因为 pH 值变化会引起铁卟啉的丙酸侧链的电离发生变化, pH 值升高, 电离度增大, 铁卟啉所带的负电荷也增加。说明铁卟啉所带的负电荷与其催化活性具有相关性。

[参考文献]

- [1] GARCIA-VILOCA M, GAO J, KARPLUS M, et al. How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations [J]. Science, 2004, 303(5655): 186-195. DOI:10.1126/science.1159747.
- [2] KAMERLIN S C L, SHARMA P K, CHU Z T. Ketosteroid isomerase provides further support for the idea that enzymes work by electrostatic preorganization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(9): 4075-4080. DOI:10.1073/pnas.0914579107.
- [3] WARSHEL A, SHARMA P K, KATO M, et al. Electrostatic basis for enzyme catalysis [J]. Chem Rev, 2006, 106(8): 3210-3235. DOI:10.1021/cr0503106.
- [4] WU N, MO Y R, GAO J L, et al. Electrostatic stress in catalysis: structure and mechanism of the enzyme orotidine monophosphate decarboxylase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(5): 2017-2022. DOI:10.1021/cr0503106.
- [5] LEHWESS-LITZMANN A, NEUMANN P, PARTHIER C, et al. Twisted Schiff base intermediates and substrate locale revise transaldolase mechanism [J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(10): 678-684. DOI:10.1038/NCHEMBIO.633.
- [6] AHERNK. Biochemistry [M]. New York: W. H. Freeman and Company, 2012.
- [7] 欧光南, 何碧烟, 曹学功. 电场增强催化作用探讨 [J]. 催化学报, 2001, 22(1): 81-83.
- [8] 唐敖庆, 李前树. 原子簇的结构规则和化学键 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1998.
- [9] OU G N, HE B Y, YUAN Y Z. Lipases are soluble and active in glycerol carbonate as a novel biosolvent [J]. Enzyme Microb Technol, 2011, 49(2): 167-170. DOI:10.1016/j.enzmictec.2011.04.011.
- [10] OU G N, HE B Y, YUAN Y Z. Design of biosolvents through hydroxyl functionalization of compounds with high dielectric constant [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166(6): 1472-1479. DOI:10.1007/s12010-012-9541-y.
- [11] OU G N, HE B Y, HALLING P. Ionization basis for activation of enzymes soluble in ionic liquids [J]. BBA-GEN Subjects, 2016, 1860(7): 1404-1408. DOI:10.1016/j.bbagen.2016.04.004.
- [12] 王全林, 刘志洪, 蔡汝秀, 等. 血红蛋白的过氧化物酶催化特性研究 [J]. 化学学报, 2003, 61(1): 34-39.
- [13] 王兰芝, 余远斌, 钟儒刚, 等. 铁卟啉催化剂前线轨道能量与其催化活性的关系 [J]. 化工学报, 2006, 57(6): 1339-1345.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)