

# 磷脂酶 D 催化反应中溶剂化效应的综合表征

王兴国 裘爱泳 陶文沂 沈蓓英

(食品资源科学与工程系)

**摘要** 考察了磷脂酶 D 催化反应中有机溶剂的疏水参数,如海德溶解参数  $\delta$ 、介电常数  $\epsilon$ 、偶极矩  $\mu$  和分配系数对数  $\log P$  与酶转化活性的关系。并应用相关分析、主成分分析等方法建立了磷脂酶 D 转化活性与各疏水性指标的综合关系式。

**关键词** 磷脂酶 D; 溶剂效应; 相关分析; 回归分析

**中图分类号** TQ645

## 0 前言

在前文<sup>[1]</sup>我们对磷脂酶 D 转化反应中的有机溶剂效应进行了探讨。在实际应用中,尽管有大量的潜在溶剂可供选择,但直到现在酶催化反应中溶剂的选择还是经验性的。Brink 和 Traniper<sup>[2]</sup>首先提出了利用海德堡溶解参数  $\delta$  来表征这种关系,他们发现低极性和高分子量( $D > 200D$ )的溶剂增加催化活性。同样 Laane 等<sup>[3]</sup>也发现溶剂的疏水性与生物催化剂的活性有关,他们提出具有高  $\log P$  ( $P$  是指定溶剂在水和辛醇两相体系中的分配系数)的溶剂对于酶活性最佳的。Deetz 和 Rozzel<sup>[4]</sup>认为介电常数与酶活性有关。所有这些处理方法并不完备,因为它们将所有溶剂都看成是连续介质而不是由单个分子所组成的非连续介质,而且没有顾及溶剂和溶质分子之间的专一性相互作用。在溶剂化复杂体系中不可能有单一的宏观物理参数能够在分子微观水平上计算溶质-溶剂相互作用的大小。迄今,溶剂化作用的复杂性仍然阻碍着推导可以计算发生于不同极性的溶剂中各种反应普遍适用的数学表示式。本文考察了24种有机溶剂的常见疏水性参数与磷脂酶 D 转化反应的关系,并应用多元统计的方法建立了磷脂酶 D 转化活性与各疏水性指标的综合关系式。

## 1 疏水性的定量

目前,普遍认为溶剂的亲水疏水性对酶催化反应有影响,常用的疏水性定量指标见表1<sup>[5]</sup>。本文所测试的24种有机溶剂的疏水性参数见表2,磷脂酶 D 相对活力的测定方法见[6]。

收稿日期:1995-03-17

表1 常见的疏水性指标

$\delta$	海德堡溶解参数	(Hildebrand solubility parameter)
$E_t$	染料溶剂化色度	(Solvatochromism of dye)
$\epsilon$	介电常数	(Dielectric constant)
$\mu$	偶极矩	(Dipolemoment)
$\log P$	分配系数的对数	(Logarithm of partition coefficient)

表2 常见有机溶剂的疏水性指标及相对活力

有机溶剂	$\delta$	$\epsilon$	$\mu$	$E_t$	$\log P$	$\eta$	相对活力(A)	
醚类	乙醚	7.4	4.335	1.15	34.6	0.85	1.3526	100
	异丙醚	7.8	3.88	1.21	33.0	1.9	1.3679	53
	正丁醚	7.6	3.06	1.17	34.0	2.90	1.3992	15
	异戊醚	7.7	2.82	1.19	33.4	3.90	1.4085	12
酯类	甲酸乙酯	9.4	7.1	1.93	40	0.16	1.3598	38
	乙酸乙酯	9.1	6.02	1.78	38.1	0.68	1.3723	95
	戊酸乙酯	8.9	5.87	1.64	36.6	2.2	1.4120	80
	庚酸乙酯	8.6	5.65	1.58	35.4	2.87	1.4100	42
	乙酸丁酯	8.5	5.01	1.56	34.9	1.32	1.3941	96
	丙酸乙酯	8.5	5.35	1.70	37.3	0.89	1.4221	93
	丁酸乙酯	8.6	5.01	1.67	36.8	1.32	1.4000	96
酮类	丙酮	9.6	20.7	2.88	42.2	-0.23	1.3588	14
	甲乙酮	9.3	18.5	2.76	41.3	0.29	1.3788	29
	甲异丙酮	8.8	15.4	2.56	40.9	0.80	1.3880	47
	甲正丙酮	9.1	16.8	2.68	41.1	0.80	1.3895	59
	甲异丁酮	8.6	13.11	2.50	39.4	1.3	1.3962	87
	甲正丁酮	8.9	14.3	2.60	40.1	1.3	1.4002	90
	戊酮-[3]	9.1	17.0	2.72	39.3	0.80	1.3924	104
	环己酮	9.9	18.3	3.01	40.8	0.96	1.4507	4
其它	丁二酮	11.1	22.5	3.36	45.7	-1.88	1.3951	12
	苯	9.2	2.28	0	34.5	2.0	1.5011	24
	正己烷	7.3	1.89	0	30.9	3.50	1.3751	15
	氯仿	9.3	4.81	1.01	39.1	2.0	1.4459	9
	二氧六环	10.0	2.21	0	36.0	-1.1	1.4136	1

表1中第一个参数为海德堡经验溶解参数 $\delta$ ,它是由海德堡等<sup>[7]</sup>于1970年提出的,其关系式为:

$$\delta = \left(\frac{\Delta E_v}{V}\right)^{1/2} = \left(\frac{\rho(\Delta H_v - RT)}{M}\right)^{1/2} = \frac{\rho \Sigma G}{M} \quad (1)$$

式中:

$G$  为摩尔引力常数       $\Delta H_v$  为蒸发热       $\rho$  为溶剂密度  
 $V$  为溶剂的摩尔体积       $M$  为溶剂分子量       $R$  为气体常数

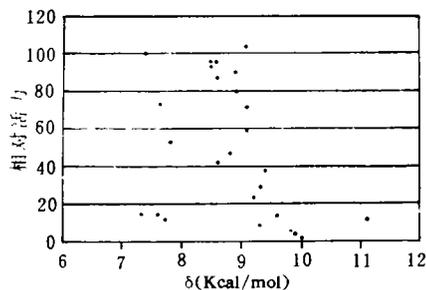
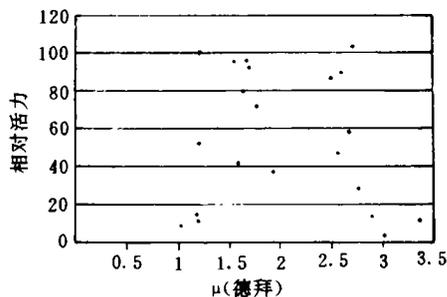
$\Delta E_v$  为摩尔内聚能,为一摩尔溶剂中与总的分子间相互作用有关的能量,或者为相同温度下溶剂相对于其理想蒸汽的能量。海德堡等发现对于一定的非电解质,优良的溶剂其 $\delta$ 值通常都接近于溶质的 $\delta$ 值。 $\delta$ 值可由蒸发热 $\Delta H_v$ 根据式(1)计算得到,或由摩尔引力常数 $\Sigma G$ 根据式(1)计算得到。常见的疏水碎片常数见表3。计算得到的 $\delta$ 值见表2。图1为 $\delta$ 与磷脂酶D相对碱基转移活性的关系。由图可知, $\delta$ 和相对转移活性的关系是离散型的,但是高的转移活性主要集中在 $\delta$ 值为9左右。第二个参数 $\mu$ 为分子的偶极矩,通常称分子具有永久偶极矩的溶剂为极性溶剂,而没有偶极矩的溶剂称为无极性或非极性溶剂。如果分子在

一切可能的构象中都有一个对称中心、一个以上  $n$  重对称轴或者有一个垂直于某一  $n$  重对称轴的对称面,则由于对称的缘故它们都不可能具有永久偶极矩。因而,只有那些属于点群  $C_1$ 、 $C_s$ 、 $C_n$  或  $C_{nv}$  的分子才可能有永久偶极矩。有机溶剂的永久偶极矩在  $0 \sim 5.5(D)$  德拜

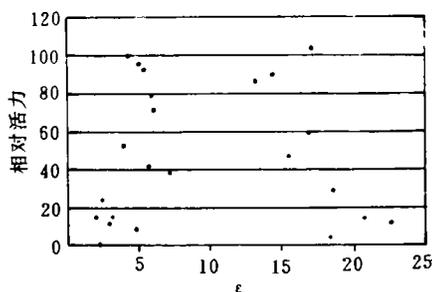
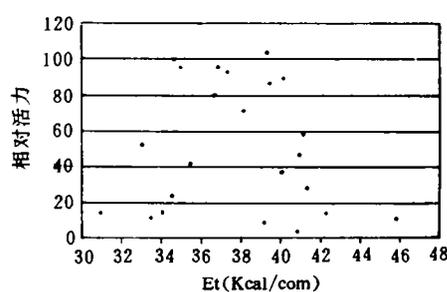
之间变化。图 2 为  $\mu$  与磷脂酶 D 相对转移活性的关系,偶极矩范围  $1 \sim 3.5$  德拜,高转移活性主要集中在  $1.5 \sim 2.5$  德拜之间。

表 3 常见基团的摩尔引力常数

基团	摩尔引力常数(G)	基团	摩尔引力常数(G)
-CH <sub>3</sub>	214	-C≡C-	222
-CH <sub>2</sub> -单键	123	甲苯	735
-CH<	28	二甲苯(邻、间、对)	658
>C<	-93	H	80-100
CH <sub>2</sub> =	190	O	70
-CH=双键	111	CO	275
>C=	19	COO	310
CH≡C	285	Cl	270

图 1  $\delta$  和转移活性关系图图 2  $\mu$  和转移活性关系图

第三个参数为介电常数  $\epsilon$ ,它在表示溶剂的特性方面起特别重要的作用。其重要性超过其他许多判据,是由于溶剂化静电模型简单,因而它们已成为衡量溶剂极性的有效量度。介电常数表示某种溶剂分离出电荷的能力和使它的偶极定向的能力。有机溶剂的介电常数大致在  $2 \sim 100$  间。图 3 为  $\epsilon$  与磷脂酶 D 相对转移活性的关系。其关系也是离散性的。

图 3  $\epsilon$  和转移活性关系图图 4  $E_t$  和转移活性关系图

第四个参数  $E_t$  为溶剂化色度指标是指随着介质极性的改变,在紫外/可见吸收谱带的位置(有时还有强度)上的显著变化。随着溶剂极性的增加,向波长较短方向(或向兰)位移通常称为负向溶剂化显色,反之向波长较长方向(或向红)位移通常称为正向溶剂化显色。由于电子跃迁而引起的光谱的溶剂效应主要取决于发色基和跃迁的性质( $\delta \rightarrow \delta^*$ ,  $n \rightarrow \delta^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  和电荷迁移吸收)。其中在紫外/可见光谱有意义的电子跃迁是  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  和电荷迁移吸收。Dimroth 等<sup>[8]</sup>根据吡啶-N-苯氧内盐染料的最长波长溶剂化显色吸收谱带的跃迁能,提出了一种溶剂极性参数  $E_t(30)$ (30 表示文献中染料序号)。其大小可由式(2)求得。

$$Et(30)(\text{kcal/mol}) = h \cdot c \cdot \bar{\nu} \cdot N \quad (2)$$

式中:

$h$  为普朗克(Plank)常数  $c$  为光速  
 $\bar{\nu}$  为使电子激发的光子的波数  $N$  为阿佛加德罗(Avogadro)常数

这种方法的优点是呈现溶剂化显色特性的范围大,并且溶剂化显色的大部分范围都在光谱的可见区内,所以能够目测溶剂的极性。图4为  $Et(30)$  与磷脂酶 D 相对转移活性的关系。高转移活性主要集中在35~41之间。

最后一个参数为  $\log P$  表示在标准辛醇-水两相体系中某种溶剂的分配系数的对数:  
 $P = [\text{浓度}]_{\text{辛醇}} / [\text{浓度}]_{\text{水}}$ 。对于简单分子  $\log P$  值可由疏水碎片常数(hydrophobic fragmental constants)计算或由实验测定,常见基团的疏水碎片常数(hfc)见表4。对于某化合物其各基团疏水常数之和,即为  $\log P$  值。图5为  $\log P$  与磷脂酶 D 相对转移活性的关系,由图可知在  $\log P$  小于1.5时,随  $\log P$  增大相对活性增加;在  $\log P$  大于1.5时  $\log P$  与相对活性成离散状态。

表4 常见基团的疏水碎片常数

基团	疏水碎片常数	基团	疏水碎片常数
CH	0.337	CH <sub>2</sub>	0.519
CH <sub>3</sub>	0.701	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	1.658
CH <sub>2</sub> =CH	0.856	O	-1.595
OH	-1.470	CO	-1.643
COO	-1.251	CHO	-1.172
Br	0.249	Cl	0.057

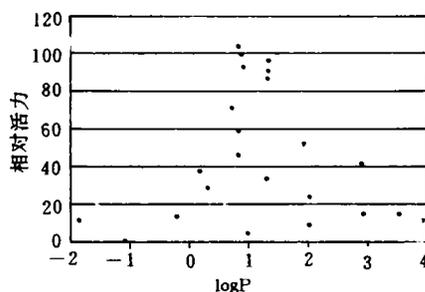


图5  $\log P$  和转移活性关系

## 2 溶剂化效应的综合表征

由上面分析可知,在磷脂酶 D 的碱基交换反应中,各个溶剂的单一物化指标难以描述相对转化活性的变化规律。用多元统计方法进行结构简化、分类、变量分组以及互依性分析,可以深入了解实验数据所提供的信息。

表2每个样本都具有7项属性,它们从不同方面反映了溶剂的物化特性及磷脂酶 D 碱基交换的特性。因而,相互必然存在某种关联,这种联系的紧密程度可以从相关系数(表5)看出。

表5 各因素的相关系数

	$\delta$	$\epsilon$	$\mu$	$Et$	$\log P$	$\eta$	$A$
$\delta$	1.000						
$\epsilon$	0.138	1.000					
$\mu$	0.160	0.916	1.000				
$Et$	0.178	0.884	0.828	1.000			
$\log P$	-0.307	-0.578	-0.454	-0.733	1.000		
$\eta$	0.066	-0.181	-0.248	-0.081	0.215	1.000	
$A$	0.139	-0.040	0.199	-0.057	-0.001	-0.259	1.000

在此基础上,通过聚类分析(Cluster Analysis),将溶剂的各项属性按照相关系数的大

小,通过一定的方式加以分析,从而得到如图6所示的树型图(Dendrogram)。由图明显看出,7个指标可以分成两大类,一类包括  $\log P$  和粘度,另一类包括  $Et$ 、 $\mu$ 、 $\epsilon$ 、 $\delta$  及相对活力,也就是说,磷脂酶 D 的相对活力与反映分子相互作用力的参数及结构参数关系更紧密。

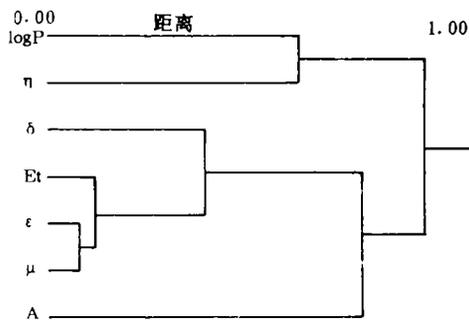


图6 聚类分析的树型图

由于各参数之间存在相互的关联,即所谓的“多元共线性”(Multicollinerity),使得酶活性难以直接与各变量进行回归分析得到显著的回归方程。解决这一问题的方法是先对变量进行主成分分析(Principal Component Analysis),求得若干相互正交的主成分,然后对酶活性进行回归。用  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\mu$ 、 $Et$  和  $\log P$  六项变量进行主成分分析,表6为各主成分所解释的变异(Variance),对应主成分的本征值(Eigenvalue)及解释变异的百分数。

从表中可看出前3个主成分已经能够解释全部原始数据的88.6%的变异,也就是说前3个主成分包含了原始6个变量提供信息的88.6%。为了确定主成分的意义,需对其进行旋转分析(Rotate Analysis),结果见表7。第一主成分  $P_1$  主要  $\epsilon$ 、 $\mu$ 、 $Et$ 、 $\log P$  由组成,可解释58.6%的变异,第二主成分  $P_2$  由  $\delta$  和  $\log P$  组成,可解释21.52%的变异,第三主成分主要由  $\eta$  组成,可解释19.81%的变异。通过对主成分的旋转分析不难发现各主成分实际上反映不同相互作用力。

从表中可看出前3个主成分已经能够解释全部原始数据的88.6%的变异,也就是说前3个主成分包含了原始6个变量提供信息的88.6%。为了确定主成分的意义,需对其进行旋转分析(Rotate Analysis),结果见表7。第一主成分  $P_1$  主要  $\epsilon$ 、 $\mu$ 、 $Et$ 、 $\log P$  由组成,可解释58.6%的变异,第二主成分  $P_2$  由  $\delta$  和  $\log P$  组成,可解释21.52%的变异,第三主成分主要由  $\eta$  组成,可解释19.81%的变异。通过对主成分的旋转分析不难发现各主成分实际上反映不同相互作用力。

表6 主成分本征值及解释变异

主成分序数	本征值	解释的变异(%)
1	3.333	55.553
2	1.091	18.177
3	0.893	14.877
4	0.547	9.114
5	0.078	1.293
6	0.059	0.983

表7 旋转后各主成分载荷及本征值

	$P_1$	$P_2$	$P_3$
$\delta$	0.069	0.956	0.065
$\epsilon$	0.962	0.036	-0.072
$\mu$	0.916	0.017	-0.132
$Et$	0.958	0.147	0.011
$\log P$	-0.650	-0.453	0.217
$\eta$	-0.103	0.035	0.990
本征值	3.119	1.144	1.053

以酶转化活性为自变量,  $P_1 \sim P_3$  3个主成分为应变量进行向后逐步多元回归分析,结果见表8,得到关于酶转化活性高度显著的线性模型。表示成函数形式即为:

$$A = 79.702 + 38.004P_1 - 55.416P_1^2 + 35.613P_1P_2 + 24.075P_2^2 + 87.601P_2P_3$$

由式可知第一主成分和第二主成分存在二次项,因此它们对酶活性影响较显著,而第三主成分不存在二次项,因此它对酶活性影响不显著。

表8 回归分析和方差分析数据

变 量	系 数	标准差	t 值	P
常 数	79.702	8.273	9.634	0.000
$P_1$	38.004	9.558	3.976	0.001
$P_1^2$	-55.416	11.689	-4.741	0.000
$P_1 \times P_2$	35.613	13.687	2.602	0.018
$P_2^2$	24.075	6.172	3.901	0.001

续表 8

变 量	系 数	标准差	<i>t</i> 值	<i>P</i>	
$P_2 \times P_3$	87.601	23.468	3.733	0.002	
方差分析					
方差来源	平方和	自由度	均方差	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
回 归	19243.947	5	3848.589	6.379	0.001
剩 余	10860.386	18	603.355		

### 3 结 论

在前文基础上,首先对磷脂酶 D 催化反应中 24 种有机溶剂的常见疏水参数  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $E_t$ 、 $\mu$ 、 $\log P$  与磷脂的转化活力进行了考察,并应用多元统计的方法建立了磷脂酶 D 转化活性与各疏水性指标的综合关系式,即  $A = 79.702 + 38.004P_1 - 55.416P_1^2 + 35.613P_1P_2 + 24.075P_2^2 + 87.601P_2P_3$ 。

#### 参 考 文 献

- 1 王兴国等. 无锡轻工业学院学报, 1995, 14(3)
- 2 Brink I. E S, et al. Biotechnol. Bioeng. 1985, 27: 1258~1269
- 3 Lanne C, et al. Trends in Biotechnolog, 1985, 3: 251~252
- 4 Deetz T S, et al. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York 1988, 542: 230
- 5 Panderm J R, et al. CRC handbook of physics and chemsity, CRC press, 1990
- 6 王兴国等. 无锡轻工业学院学报, 1995, 14(1)
- 7 Hildrand J H, et al. Reguar and Related Solution, Van Nostrand Reinhold Company, 1970
- 8 Dimroth H, et al. Solvents effects in organic chemsity, Monographs in Modern Chemistry, Verlag Chemie, Weinheim-New York, 1979

## Solvation Characteristic of Phospholipase D Catalysis

Wang Xingguo Qui Aiyong Tao Wenyi Shen Beiyong  
(Dept. food resources sci. & Eng.)

**Abstract** The relations between hydrophobic parameter of organic solvent and enzymatic transformation activity were tested in phospholipase D catalysis. The equation on relationship of enzymatic catalysis activity and hydrophobic parameter was established with the cluster, principal component and regression analysis.

**Subject-words** Phospholipase D; Solvent effect; Correlation analysis; Regression analysis