

磷脂酶 D 催化反应中的有机溶剂效应

王兴国 裘爱泳 陶文沂 沈蓓英

(食品资源科学与工程系)

摘要 对酶催化反应中的有机溶剂效应进行了深入讨论,引用溶剂化概念解释了有机溶剂对反应平衡状态,反应速率和反应选择性的影响。此外,考察了 24 种有机溶剂对磷脂酶 D 催化反应的影响,提出了有机溶剂作用机理,即有机溶剂使酶蛋白微粒和底物磷脂表面更具疏水性,从而增加了酶和底物的相互吸引。

主题词 磷脂酶 D;溶剂效应;作用机理

中图分类号 TQ645

0 前 言

磷脂是在食品和医药上有许多重要用途的天然表面活性剂,但是由于磷脂在结构上的相似性,从而使得由一般的化学方法难以制备纯净的单一磷脂,如目前卵磷脂生产,就是用乙醇反复多次萃取得到,即使这样也难以得到卵磷脂含量大于 90%的产品,且生产成本相当高。因此,从产业角度来说,利用磷脂酶 D 的专一性和碱基交换能力制备单一磷脂,具有很重要的现实意义。

1967 年 Dawson 等^[1]和 Yang 等^[2]的两个研究小组几乎同时都报道了磷脂酶 D 对磷脂的碱基交换作用。但是真正设想将磷脂酶 D 的这种碱基交换作用用于大规模化生产单一磷脂则是在高转换活性微生物磷脂酶 D 发现以后的事。80 年代后期许多学者利用这种磷脂酶 D 分别在实验室中制备了单一磷脂。如 Rakhimov 等^[3]、Fukuda 等^[4]、Fujita 等^[5]、Kudo 等^[6,7]、Tsunoda 等^[8]、Redemana 等^[9]、Juneja 等^[10]、Nakazato 等^[11]、Kdkuso 等^[12]、王兴国等^[13]先后报道了利用磷脂酶 D 制备卵磷脂(PC),脑磷脂(PE),肌醇磷脂(PI),甘油酰磷脂(PG)等。在传统概念中酶只能在水溶液中起作用,在有机溶剂中易发生变性。而许多化学合成是在有机相中进行,有些产物或底物在水中不易溶解,有些不稳定。因此,研究非水介质中酶的作用,对于扩大酶的应用领域具有很重要的意义,近十年中开展了大量的研究,取得了一定成绩,但是对于非水介质中酶作用的理论探讨还不足深入,鉴于此,本文对磷脂酶 D 的有机溶剂效应进行了的讨论。

收稿日期:1994-12-03

1 材料与amp;方法

1.1 材料

磷脂酶 D 产自假单胞菌,筛选过程见[14]。

所用的有机溶剂见表 1,均为分析纯。

1.2 仪器

TH-10 Iatroscan analyser 采用 Chromarod-S III 型号硅棒孔隙直径 60 Å,颗粒大小 5 μm,日本 Iatron Laboratories 公司。

1.3 方法

1.3.1 磷脂的测定 采用 TLC/FID 法,条件见[15]。

1.3.2 有机溶剂对磷脂酶 D 活力的影响 酶的活力测定用一种混合液来完成,它包括 1mg 卵磷脂、0.2ml 0.4mol 的醋酸缓冲液 (pH5.6),0.2ml 0.2mol 的 CaCl₂,0.08ml 50% 的甘油及 0.32ml 蒸馏水,同时分别加入 1ml 各种有机溶剂及 0.2ml 磷脂酶 D 发酵液离心后的上清液。

上述混合液在振荡器上振荡 1min 后在 25℃ 水浴中保温 1min,中间取出振荡一次。用沸水浴中止酶作用,然后,加入约 2ml 乙醚进行萃取,用振荡器振荡 1min 后,待其分层,取乙醚层(上层),浓缩,作磷脂测定用。根据磷脂酰甘油形成量计算活力。规定乙醚体系的活力为 100,各种有机溶剂的活力为相对于乙醚体系的活力,结果见表 1。

表 1 常见有机溶剂的相对活力

有机溶剂	相对活力	有机溶剂	相对活力
38	乙醚	100	甲酸乙酯
异丙醚	53	乙酸乙酯	95
正丁醚	15	丙酸乙酯	93
异戊醚	12	丁酸乙酯	96
丙酮	14	戊酸乙酯	80
甲乙酮	29	庚酸乙酯	42
甲异丙酮	47	乙酸丁酯	96
甲正丙酮	59	苯	24
甲异丁酮	87	正己烷	15
甲正丁酮	90	氯仿	9
戊酮-[3]	104	二氧六环	1
环己酮	4		
丁二酮	12		

1.3.3 有机溶剂对磷脂酶 D 的失活影响 取需要量的磷脂酶 D 发酵上清液,加入等量的待试有机溶剂,振荡 2min,放置所需时间后,加入反应体系中其它所需量的物质,按酶活测定方法测定相应活力,然后计算失活率。结果见表 2。

表 2 各种溶剂对 PLD 的失活

溶 剂	失活率(%)	
	10(min)	30(min)
乙醚	11	30
丙醚	5	21
乙酸乙酯	3	6
正己烷	0	5
氯仿	12	22
戊酮-[3]	4	10

2 结果与讨论

2.1 有机溶剂效应对生物催化反应的影响形式

目前认为,有机溶剂影响催化有三种形式:

1) 溶剂直接与酶相互作用引起酶失活,这种情况溶剂改变了蛋白质的天然构象,影响了氢键和疏水键,因而导致了酶的活性和稳定性的降低。

2) 溶剂与反应的底物和产物的相互作用,改变了反应的平衡常数和速率常数,关于这方面的影响在2.2中讨论。

3) 有机溶剂直接与酶周围的必需水(essential water)的相互作用,这种作用并不直接影响酶而只是对催化起主要影响,特别是强极性溶剂能溶解大量水。从而剥夺了酶周围的必需水层而引起酶失活,相反疏水性溶剂不太容易去除或搅乱酶周围的水,因而不太能引起酶失活。

2.2 有机溶剂对底物和产物的影响

溶剂对产物和底物的作用涉及到底物和产物的溶剂化作用,所谓的溶剂化作用是指每一个被溶解的分子或离子被一层或松或紧地受束缚的溶剂分子所包围的现象。该溶剂层是溶质和溶剂之间的分子间力作用的结果。通常用溶剂化自由能 $\Delta G^\circ_{(\text{溶剂化})}$ 来量度某特定溶剂的溶剂化能力,它包括取向能、诱导能、色散能和氢键等。

2.2.1 有机溶剂对反应平衡状态的影响 如果考虑在溶剂 I 与溶剂 II 中的反应 $A+B \rightleftharpoons C+D$,此两种溶剂对底物和产物的溶剂化能力不同,则其对应的自由能曲线如图1所示。

由图1可直接推导出式(1):

$$-\Delta G_1 + \Delta G_{\text{底物溶剂化}} = \Delta G_{\text{产物溶剂化}} - \Delta G_2 \quad (1)$$

式中: $-\Delta G_1$ 为在溶剂 I 中的反应自由能;

$-\Delta G_2$ 为在溶剂 II 中的反应自由能;

$\Delta G_{\text{底物溶剂化}}$ 和 $\Delta G_{\text{产物溶剂化}}$ 为溶剂由 I 更换为 II 时所释放的溶剂化自由能。

经重排可得式(2):

$$\Delta G_1 - \Delta G_2 = \Delta\Delta G = \Delta G_{\text{产物溶剂化}} - \Delta G_{\text{底物溶剂化}} = \Delta\Delta G_{\text{溶剂化}} \quad (2)$$

因为在平衡时,平衡常数的对数与自由能 ΔG 有如式(3)的关系:^[16]

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (3)$$

将式(3)代入(2)有:

$$\Delta\Delta G_{\text{溶剂化}} = -RT(\ln K_1 - \ln K_2) \quad (4)$$

由式(4)可得出下列结论:底物和产物的溶剂化自由能之差支配溶剂对平衡状态的影响。

当产物的溶剂化自由能大于底物的溶剂化自由能时,

$$\text{即 } \Delta\Delta G_{\text{溶剂化}} > 0 \quad (5)$$

将式(5)代入式(4)

$$\text{则有 } -RT(\ln K_1 - \ln K_2) > 0 \quad (6)$$

$$\text{即 } K_1 < K_2 \quad (7)$$

因而当由溶剂 I 更换为溶剂 II 时,平衡有利于产物的形成。

2.2.2 有机溶剂对反应速率的影响 应用反应动力学的过渡状态理论来处理溶剂效应对反应速率的影响。过渡状态理论的基本看法是^[15]: 当两个具有足够能量的反应物分子相互接近时, 分子的价键要经过重排, 能量要经过重新分配, 方能形成产物分子。在此过程必须经过一个过渡状态, 处于过渡状态的体系称为活化络合物。其反应的位能图如图2所示。

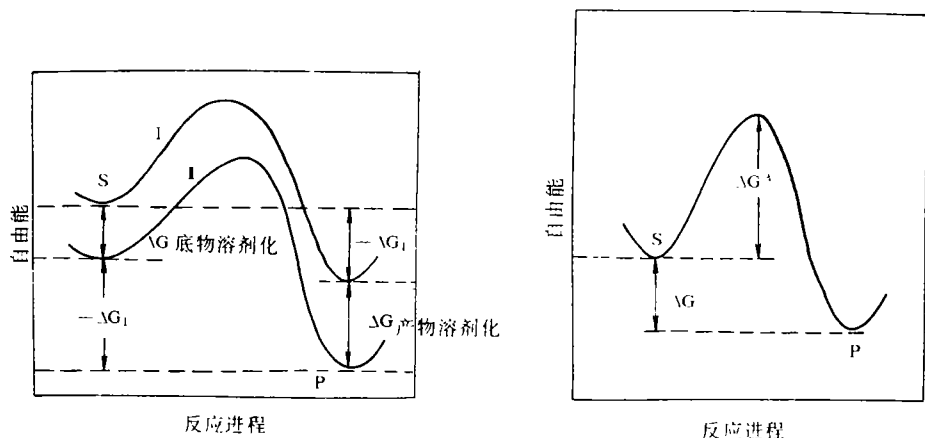
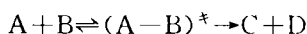


图1 化学反应在溶剂 I 与溶剂 II 中的自由能分布

图2 化学反应的自由能分布

对于反应:



由过渡状态理论可得式(8)^[16]

$$k = \frac{RT}{N_0 h} e^{-\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT}} \quad (8)$$

式中 k 为反应速率常数; h 为普朗克常数; N_0 为阿佛加德罗常数; R 为气体常数; T 为绝对温度; ΔG^{\ddagger} 为底物变成活化络合物的活化能变化。

根据式(8), ΔG^{\ddagger} 越小, 即底物变成活化络合物的活化能越小, 则反应速率越大。

由式(8)发生的反应, 由于底物和活化络合物在不同的溶剂中的溶剂化能力不同而被不同程度地溶剂化。这种不同的溶剂化作用可按图3所述的方式减慢或加速。

图(3a)和图(3b)中的两条曲线 I 表示对给定反应在一种理想 I 中, 底物和活化络合物都未被溶剂化时的自由能分布。如果在加一种溶剂中活化络合物被溶剂化, 就得到图(3a)中所示的曲线 II。其活化自由能 $\Delta G_{I, \ddagger}$ 由于溶剂化自由能 $\Delta \Delta G^{\ddagger}$ 而减小, 结果使反应加快。另一方面, 如果只有起始反应物被溶剂化, 就得到图(3b)所示的曲线 III, 其活化自由能 $\Delta G_{II, \ddagger}$ 由于溶剂化自由能 $\Delta \Delta G^{\ddagger}$ 而增加, 结果使反应速率减慢。产物的溶剂化对反应速率并无任何影响。由于实际上起始反应物和活化络合物都可以被溶剂化, 所以反应体系中反应速率取决于两者的溶剂化自由能之差。

图4为考虑了底物和活化络合物溶剂化的自由能变化。由图可得到:

$$\Delta G_{I, \ddagger} + \Delta G_{I, \text{溶剂化}} = \Delta G_{II, \ddagger} + \Delta G_{II, \text{溶剂化}} \quad (9)$$

即

$$\Delta G_{I, \text{溶剂化}} - \Delta G_{II, \text{溶剂化}} = \Delta G_{II, \ddagger} - \Delta G_{I, \ddagger} = \Delta \Delta G_{\text{溶剂化}} \quad (10)$$

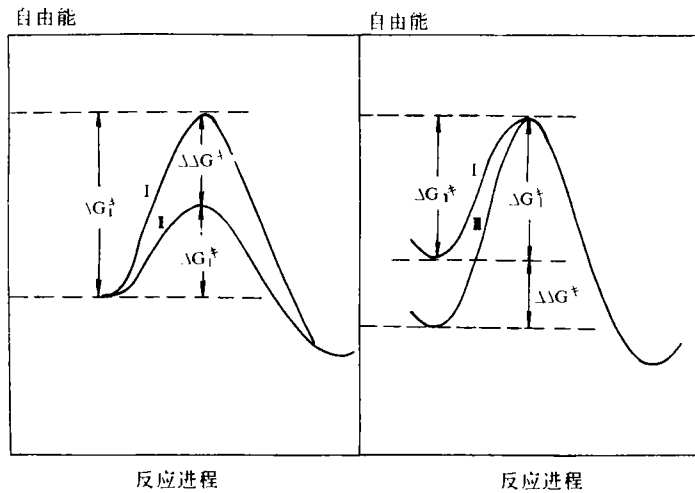


图3 反应体系的自由能分布曲线

(a) 曲线 I, 反应时活化络合物未被溶剂化; 曲线 II, 反应时活化络合物被溶剂化
(b) 曲线 I, 反应时反应物未被溶剂化; 曲线 II, 反应时底物被溶剂化。

将式(8)代入式(10)

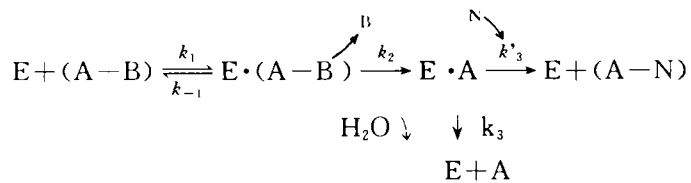
$$\Delta\Delta G_{\text{溶剂化}} = RT(\ln k_1 - \ln k_1) \quad (11)$$

当底物的溶剂化自由能大于活化络合物溶剂化自由能时

即 $\Delta\Delta G_{\text{溶剂化}} > 0$ 时, 有 $k_1 > k_1$

因而不利于反应进行; 反之, 当活化络合物溶剂化自由能大于底物溶剂化自由能时, 有利于反应进行。

2.2.3 有机溶剂对反应的选择性影响 1967年 Yang 等^[2]由游离¹⁴C-胆碱与磷脂酰胆碱中的胆碱的交换反应, 证实了磷脂酶 D 催化的碱基交换反应历程为:



式中: E 为磷脂酶 D; A 为磷脂酸; B 为磷脂中起始碱基; N 为反应物碱基; A-B 为底物磷脂; A-N 为产物磷脂; $k_1, k_{-1}, k_2, k_3, k_3$ 为各级反应的速率常数。

因此碱基交换速率为

$$r_{\text{trans}} = k_3 \cdot [\text{N}][\text{EA}] \quad (12)$$

水解速率为

$$r_{\text{hydro}} = k_3 [\text{H}_2\text{O}][\text{EA}] \quad (13)$$

由式(12)和式(13)可知, 由于有机溶剂的加入, 降低了 $[\text{H}_2\text{O}]$ 的量, 即降低了水解反应速率, 从而降低了水解反应产物的形成, 相对地提高了碱基交换反应产物的形成, 提高了反应的选择性。

由以上分析可以知道由于溶剂和生物催化, 反应体系之间的相互作用的复杂性, 因而预

测溶剂效应对反应体系的影响以及将这些效应与溶剂的内在性质加以联系都十分困难。

2.3 溶剂选择的一般原则

在确定哪一种溶剂最适合于指定反应时,必须考虑以下几方面因素:

1) 首先是溶剂与指定反应的适应性,例如,糖只溶于亲水性溶剂中,疏水性溶剂就不适合于糖类转化酶的催化反应;同样,反应产物与溶剂的适应性也是重要的,极性产物易吸附在酶周围,引起产物抑制作用或经历不必要的端链反应。

2) 选择的溶剂对反应来说还必须是惰性的,即不参加反应从而减少不必要的副产物。

3) 还必须考虑溶剂的比重、表面张力、粘度、毒性、生产安全性、消耗及成本等。

2.4 有机溶剂对磷脂酶 D 的影响

上面讨论了有机溶剂对酶催化反应的一般概况,对于本实验选择的有机溶剂与磷脂酶 D 的相对活力关系见表1。由表可知,除乙醚和乙酸乙酯外,一些酯、酮、醚等有机溶剂也可以产生较高的激活作用,这些溶剂都具有共同的结构特点,即都带有一个氧官能团,且氧官能团上都连有一定长度的脂肪碳链,由于接结的脂肪碳链 R 基团的长度不同,酶活呈现有规律的变化,见图5。具有对称结构的戊酮-(3)在所有试验的有机溶剂中产生最大的激活作用。

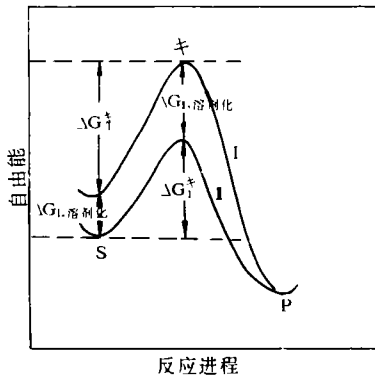


图4 化学反应在溶剂 I 和溶剂 II 中自由能分布图

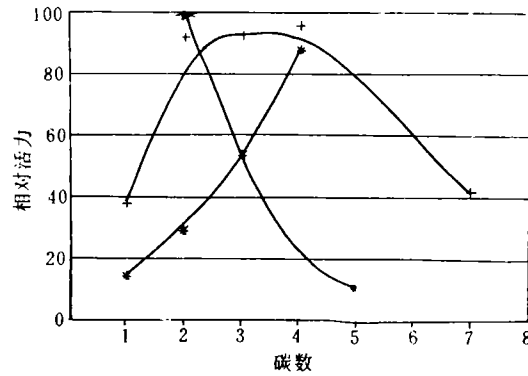


图5 不同 R 基团的酶转化活性
—·— 碳 —+— 酯 —*— 酮

2.5 有机溶剂浓度对磷脂酶 D 的影响

可以知道,溶剂化效应不同可引起磷脂酶 D 的催化活性不同。图6表示两种不同酶和底物浓度,且酶和底物浓度的比值相同时乙酸乙酯浓度对磷脂酰甘油形成速率的影响。得到的两条曲线形状相似,只是磷脂酰甘油形成的最大速率不同(图中的曲线1和曲线2),以速率 $v \sim v/V$ 作图,得到两条平行的曲线,如图7中曲线1和曲线2,将图中两条曲线外推到 $v/V = 0$,就得到最大反应速率,根据这一值可以确定图6中最大反应速率一半时的溶剂体积(相当于米氏常数 K_m),其值为0.43和0.45ml,两者非常接近,而与底物和酶浓度无关,这表明溶剂化可能是反应中的一个限制步骤。

2.6 有机溶剂对磷脂酶 D 的失活作用

我们对有机溶剂引起磷脂酶 D 的失活作用进行了考查,结果见表2。所有试验的溶剂对磷脂酶 D 的失活都不太大,乙酸乙酯、正己烷几乎没影响,乙醚引起磷脂酶 D 失活较大,这

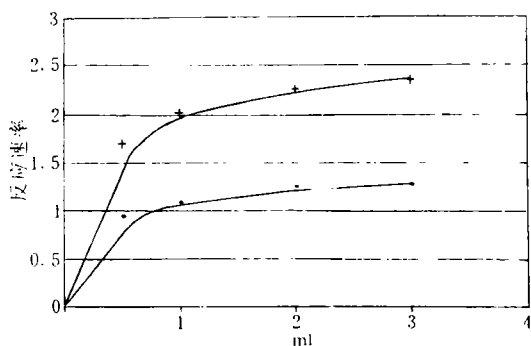


图6 不同底物和酶浓度的PG形成速率

--- E 0.2ml, PL 1.5mg
 ---+ E 0.4ml, PL 3.0mg

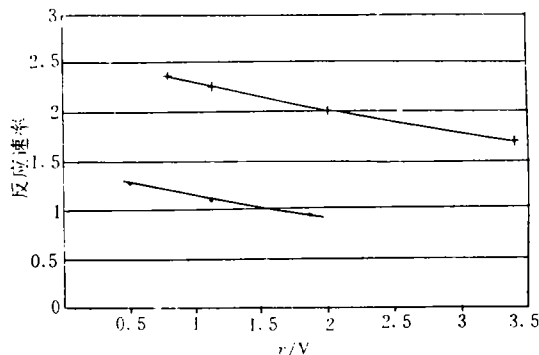


图7 $v \sim v/V$ 关系图

--- E 0.2ml, PL 1.5mg
 ---+ E 0.4ml, PL 3.0mg

一点还很难解释。

由表1和表2可以看到,溶剂对磷脂酶D的激活和失活之间没有必然联系,但是所有具有较大激活作用的溶剂使磷脂酶D失活都较低;有些溶剂如正己烷几乎不使磷脂酶D失活却没有激活作用。

2.7 磷脂酶D催化时有机溶剂的作用机理

关于有机溶剂激活机理,有人认为所有溶剂都使得酶与底物磷脂结合,反应是在凝聚体中发生。溶剂的改变由于降低了体系介电常数可能间接产生聚集体,或直接形成吸附复合物。溶剂的直接参与能由图6和图7表明,最大反应速率一半时的溶剂体积(相当于米氏常数 K_m)表明溶剂参与一步或更多中间速率限制步骤,如溶剂与底物及酶的可逆缔合。酶强烈吸附和限制乙酰以及乙酰蒸汽在磷脂单分子层上的强烈吸附在以前的实验中观察到。因此,在溶液体系中,可能存在溶剂、磷脂和酶吸附形成的复合体,这就为我们解释有机溶剂对磷脂酶D的影响提供了依据。在水介质中,底物磷脂和酶首先各自形成胶团,磷脂分子的胶团中极性基团(亲水基)伸向水相,脂肪链远离水相而相互聚集,如图8所示,酶蛋白分子也以同

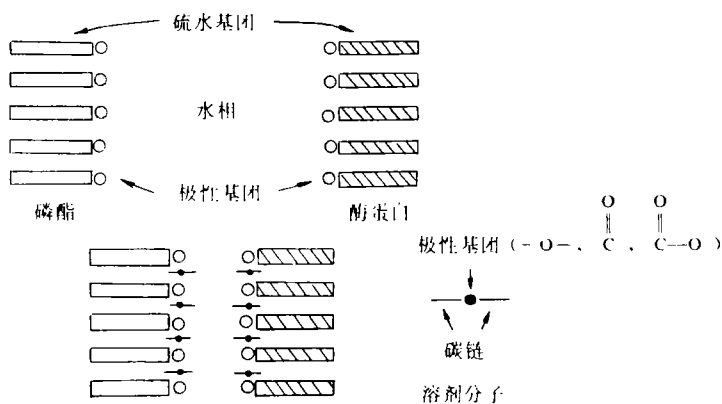


图8 溶剂、酶和磷脂相互作用

样方式存在水相中。磷脂和酶蛋白分子微粒表面带有的亲水基首先吸附水分子,形成水化胶团,并不相互吸引形成聚集体。如果使磷脂和酶蛋白微粒表面带上疏水的基团,那么它们会比水中更强烈地吸引,形成酶和磷脂聚集体,而激活溶剂就起到这样的作用。激活溶剂首先吸附在微粒表面,如图8所示,溶剂分子中的极性基团吸附到微粒表面的极性基团,其中的一个脂肪链伸向微粒内部,而另一个伸向溶液,这样使得磷脂和酶蛋白表面具有更大的疏水性,因此更易于形成酶和磷脂聚集体。这就解释了为什么只有两个碳脂肪链的氧官能团的溶剂能产生大的激活作用,而其它长碳链溶剂,则由于碳链直接伸入微粒内部,极性基团吸附在表面,不能使微粒表面具有更大疏水性,所以激活作用差,而烃类等其它非极性溶剂,不能吸附在微粒表面,而进入微粒内部,所以没有激活作用,也可以解释图5的规律。当-R 都较短时,R 伸入微粒内,没有足够的疏水性,当两个 R 都很长时,两个 R 基团都伸入胶团内,而使胶团表面没有疏水性。所以最有效的是连有适当长度 R-基团的对称醚、酮、酯,也就是为什么戊酮-[3]具有最大激活作用。能产生最大激活作用的化合物包括:具有双取代氧的基团,并连有一定长度的碳链,如直链脂肪醚、酮或酯,所有这些溶剂在反应条件下使磷脂酶 D 的失活较低。

3 结 论

从理论上对酶催化反应中的有机溶剂的影响进行了讨论,引用溶剂化的概念解释了有机溶剂对反应平衡状态、反应速率和反应选择性的影响。

考察了醚、酯、酮等四大类24种溶剂对磷脂酶 D 碱基转移活性的影响。找出了有机溶剂对磷脂酶 D 碱基转移活性的影响规律,即带有一个氧官能团,且氧官能团上连有一定长度脂肪链的化合物,并证实有机溶剂是酶催化反应的一个中间限制步骤;引用有机溶剂使酶蛋白微粒和底物磷脂表面更具疏水性,增加了酶和底物的相互吸引,从而加快了酶催化反应,解释了有机溶剂作用机理。

参 考 文 献

- 1 Dawson R M C, Biochem J. 1967,102:205
- 2 Yang S F, Freer S, Benson A A. J. Biol. Chem. 1967,212(3):477~484
- 3 Rakhimov M M, et al. Fiziol Rast. 1989, 36(3):502~511
- 4 Fukuda, Hideki, et al. 日本公开特许 JP02 02,1990,381
- 5 Fujita, Kenichi, et al. 日本公开特许 JP63 36,1988,792
- 6 Kudo, Satoshi, et al. 日本公开特许 JP63 219,1988,373
- 7 Kudo, Satoshi, et al. 日本公开特许 JP01 80,1989,285
- 8 Tsunoda, Akira, et al. 日本公开特许 JP63 91,1988,089
- 9 Redemann Carl PCT Int. Appl. WO89 01,1989,524
- 10 Juneja, Lekh Raj, et al. Biochim. Biophys. Acta. 1989,1003(3):277~83
- 11 Nakazato, Masato, et al. 日本公开特许 JP62 48,1987,390
- 12 Kdusho, Sumitaka, et al. 日本公开特许 JP63 123,1988,389

- 13 王兴国等. 第二届国际(无锡)食品科技交流会论文集. 1994
- 14 王兴国等. 无锡轻工业学院学报, 1995, 14(1)
- 15 王兴国等. 无锡轻工业学院博士学位论文, 1994
- 16 傅彩球等. 物理化学. 科学出版社, 1980

The Solvent Effect on Phospholipase D Catalysis

Wang Xingguo Qiu Aiyong Tao Wenyi Shen Peiying
(Dept. Food Resources Sci. & Eng.)

Abstract The effect of chemical equilibrium, reaction rate and selection caused by organic solvents in enzymatic catalysis were discussed with the concept of solvation. The rule of solvation on phospholipase D catalysis was found through testing 24 kinds of organic solvents. It was confirmed that the surface hydrophobicity caused by solvation resulted in stronger absorption between enzyme and substrates.

Subject-words Phospholipase D; Solvent effect; Reaction mechanism